Cellular Hemoglobin Is a Useful Alternative Parameter when Lipemia Interferes with Hemoglobin Measurement

Byong Ho Choi¹, Sung Ran Cho², and Il Joong Park²

¹Department of Laboratory Medicine, Ajou University Hospital; ²Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

Background: Saline replacement is a difficult and time-consuming procedure employed to measure hemoglobin (Hb) levels when lipaemia interferes with the accurate determination of Hb content. As an alternative method, we tested the reliability of cellular Hb (cHb) measurement.

Methods: Forty-eight lipemic blood samples were analysed with the LH780 (or DxH 800; Beckman Coulter Inc., USA) and ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, USA) instruments. We compared the Hb measurements obtained following saline replacement (srHb) with the cHb measurement and with the value of one-third of the hematocrit (1/3Hct).

Results: The bias estimate outcomes of cHb with srHb were found to be acceptable at all medical decision points. The average difference between the value of 1/3Hct and initial Hb, srHb, and cHb were $19.7\% \pm 3.3\%$, $2.3\% \pm 1.6\%$, and $-0.1\% \pm 1.1\%$, respectively.

Conclusions: cHb measurements may be a feasible alternative to srHb, when lipemia interferes with accurate Hb determinations.

(J Lab Med Qual Assur 2017;39:9-15)

Key Words: Interference, Hyperlipidemias, Hemoglobins

Corresponding author:

Il Joong Park

Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine, 164 World cup-ro, Yeongtong-gu, Suwon 16499, Korea

Tel: +82-31-219-5792

Fax: +82-31-219-5778

E-mail: pij0304@daum.net

pISSN: 2384-2458

eISSN: 2288-7261

Received November 8, 2016, **Revision received** January 2, 2017, **Accepted** January 23, 2017

서론

혈색소는 적혈구를 구성하는 주요 구성성분으로, 산소 및 이산화탄소를 운반하는 역할을 한다[1]. 혈색소의 측정은 빈혈을 포함하는 다양한 혈액질환에서 요구되며, 현재 다양한 자동혈구분석기에 의해 자동 측정된다[2]. 검사장비마다 약간의 차이는 있으나 특정 파장의 흡광도를 분광광도법으로 측정하는 원리를 사용하기 때문에 고농도의 지질이나 빌리루빈에 의

한 간섭이 발생할 수 있다[2,3]. 이와 같은 간섭이 발생하면 해결방법으로 식염수교환법을 사용하게 되는데, 식염수교환법은 원심분리 혈장을 제거하고 동일한 양의 식염수를 첨가하여 잘 섞어준 후 다시 검사해야 하는 까다롭고 번거로운 수기를 요한다[4]. Advia 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL, USA)는 flow cytometry법과 2개의 다른 각을 갖는 빛 산란을 이용한 적혈구 지도를 통하여 cell hemoglobin concentration mean (CHCM)을 구하며 cellular hemoglobin

(cHb)으로 계산된다. 산출과정에 흡광도법이 사용되지 않는 cHb은 지질과 빌리루빈 같은 간섭물질의 영향을 받지 않는다[2].

저자들은 Advia 2120i에서 제공되는 cHb과 식염수교환법을 통한 혈색소(saline replaced hemoglobin, srHb) 간의 교환 가능성을 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guideline EP09-A3에 따라 평가하여[5], cHb 값이 srHb 값을 대체할 수 있는지 알아보려고 한다.

재료 및 방법

1. 대상 및 분석장비

2014년 8월부터 2016년 5월까지 mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)가 36 g/dL을 초과하고 검체가 우유 빛으로 혼탁하여 고지혈 검체로 판단한 검체 48예(MCHC의 평균±표준차: 39.9 ± 3.9 g/dL)를 대상으로 하였다. 해당 기간 중 식염수교환법을 시행하였던 황갈색 검체 2예는 검체수 부족으로 제외하였다.

검사장비는 2014년 8월부터 2016년 1월까지 43예는 LH780 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)과 Advia 2120i를, 2016년 1월부터 5월까지 5예는 DxH800 (Beckman Coulter Inc.)와 Advia 2120i를 사용하였다. 본 검사실의 주 장비인 LH780 또는 DxH800으로 식염수교환법 전과 후의 혈색소, hematocrit (Hct) 및 MCHC를 측정하였고, Advia 2120i는 식염수교환법 시행 전 검체의 cHb의 측정에 사용되었다.

2. 식염수교환법

대상 검체를 원심분리(2,265 g, 10분) 후 상층 혈장을 제거하고 동일한 양의 식염수를 첨가한 후 잘 섞는다. 이 과정을 혼탁함이 제거될 때까지 2-3회 반복한 후 혈색소검사를 LH780 또는 DxH800으로 시행하였다.

3. 바이어스검증

CLSI guideline EP09-A3에서 제시하는 다음의 추정 바이어스 판별기준에 따라 검증하였다[5] (Fig. 1).

1) Outcome A

바이어스의 95% 신뢰구간이 제로 바이어스를 포함하고, 허용 바이어스 안에 포함되는 경우로, 유의한 바이어스 없음으로 판단한다.

2) Outcome B

바이어스의 95% 신뢰구간이 제로 바이어스를 포함하지 않으나, 허용 바이어스 안에 포함되는 경우로, 바이어스는 적합

함으로 판단한다.

3) Outcome C

바이어스의 95% 신뢰구간이 허용 바이어스를 벗어났으나, 바이어스의 평균은 허용 바이어스 안에 포함되는 경우로, 바이어스는 적합함으로 판단한다.

4) Outcome D

바이어스의 평균은 허용 바이어스를 벗어났으나, 95% 신뢰구간이 허용 바이어스에 걸친 경우로, 바이어스는 적합함으로 판단한다. 그러나 신뢰성은 outcome C보다 못한 것으로 판단한다.

5) Outcome E

바이어스의 95% 신뢰구간이 허용 바이어스에 전혀 걸쳐있지 않은 경우로, 부적합으로 판단한다.

관정을 위한 의학적 결정 값으로 아주대학교병원의 여성 참고치 하한 값인 10.7 g/dL, 남성 참고치 하한 값인 12.5 g/dL, 여성의 진성적혈구 증가증의 기준인 16.0 g/dL, 남성의 진성적혈구 증가증의 기준인 16.5 g/dL로 하였고[6], 허용한계치는 5%를 적용하였다. 바이어스 검증은 outlier를 평가한 후 다음 2단계로 진행하였다. Outlier 사례는 제거한 후 다시 진행

Fig. 1. Possible bias estimate outcomes of Clinical and Laboratory Standards Institute guideline EP09-A3. Outcome A: no significant bias; outcome B: the bias is acceptable; outcome C: the bias is acceptable, but an alternate conclusion that an inappropriate percentage of sample results will have bias outside the limits is also possible; outcome D: the bias is acceptable, but there is less confidence in this conclusion than for outcome C; outcome E: the performance of the candidate measurement procedure is not acceptable for the defined application. Abbreviations: MD, medical decision level; CI, confidence interval.

하였다. 1단계에서는 현재 권장되는 srHb 결과를 기준으로 초기 혈색소(initial hemoglobin, iHb)와 cHb의 바이어스를 검증하였다. 혈색소 측정에서 지질 등의 간섭을 알려주는 지표로 $Hb \times 3 \neq Hct \pm 3$ 의 수식이 사용된다[2]. 이는 지질 등의 간섭을 받지 않는 측정원리를 이용하는 적혈구 수와 mean corpuscular volume (MCV)의 계산으로 산출되는 Hct(적혈구 수 $\times$ MCV/10)도 지질 등의 간섭을 받지 않기 때문이다. 따라서 2단계에서는 식염수교환법의 수기과정 중에 발생 가능한 오차를 고려하여, 이러한 간섭의 영향 없이 혈색소 값을 추정하는 Hct의 3분의 1 값($1/3Hct$)을 기준으로 iHb, cHb과 srHb의 바이어스를 검증하였다.

4. $1/3Hct$ 에 대한 혈색소 지표들의 차이 평가

각 지표들의 오차를 추정하기 위하여 앞에서 언급한 $1/3Hct$ 과 iHb, srHb 및 cHb의 차이의 평균 및 95% confidence interval (CI)를 구하였다. 또한 outlier 사례의 $1/3Hct$ 과 iHb, srHb 및 cHb의 차이를 통하여 outlier 발생사유를 추정하였다.

결과

1. srHb에 대한 혈색소 지표들의 바이어스 추정 평가

의학적 결정 값 10.7 g/dL, 12.5 g/dL, 16.0 g/dL 및 16.5 g/dL에서 iHb은 srHb에 대해 모두 outcome E인 부적합 바이어스를 보였다. cHb은 srHb에 대해 의학적 결정 값 10.7 g/dL 및 12.5 g/dL에서 outcome B를, 16.0 g/dL 및 16.5 g/dL에서 outcome A로 적합한 바이어스를 보였는데, 하나의 사례가 cHb은 9.6 g/dL인 반면 srHb은 11.9 g/dL의 결과로 outlier로 평가되었다. Outlier 1예를 배제한 후 cHb의 srHb에 대한 평가결과는 10.7 g/dL에서 outcome B를 보였고 12.5 g/dL, 16.0 g/dL 및 16.5 g/dL에서 outcome A의 적합한 결과를 보였다(Fig. 2).

2. $1/3Hct$ 에 대한 혈색소 지표들의 바이어스 추정 평가

의학적 결정 값 10.7 g/dL, 12.5 g/dL, 16.0 g/dL 및 16.5 g/dL에서 iHb은 $1/3Hct$ 에 대해 모두 outcome E인 부적합 바이어스를 보였다. srHb은 $1/3Hct$ 에 대해 의학적 결정 값 10.7 g/

Fig. 2. Bias estimate outcome of Hb parameters compared with srHb. Initial Hb showed unacceptable bias with srHb at all MDs. Cellular Hb showed no significant bias with srHb at three MDs and acceptable bias at one MD. (A) Initial Hb with srHb. (B) Cellular Hb with srHb before outlier elimination. (C) Cellular Hb with srHb after outlier elimination. Abbreviations: MD, medical decision level; CI, confidence interval; Hb, hemoglobin; srHb, saline replaced hemoglobin.

dL 및 12.5 g/dL에서 outcome A를, 16.0 g/dL 및 16.5 g/dL에서 outcome C의 적합한 바이어스를 보였다. cHb은 1/3Hct에 대해 의학적 결정 값 10.7 g/dL 및 12.5 g/dL에서 outcome B를, 16.0 g/dL 및 16.5 g/dL에서 outcome C의 적합한 바이어스를 보였다(Fig. 3).

3. 1/3Hct에 대한 혈색소 지표들의 차이 평가

1/3Hct과의 차이의 95% CI는 iHb에서 $19.7\% \pm 3.3\%$, srHb에서 $2.3\% \pm 1.6\%$, cHb에서 $-0.1\% \pm 1.1\%$ 를 보여 iHb은 srHb 및 cHb과 유의한 차이를 보였다. iHb, srHb 및 cHb의 오차한계는 각각 3.3%, 1.6% 및 1.1%로 iHb에서 가장 높았고 cHb에서 가장 낮았다. Outlier 사례의 1/3Hct과 iHb의 차이는 17.8%로 iHb의 95% CI인 $19.7\% \pm 3.3\%$ 의 범위 안에 있었으나, 1/3Hct과 srHb의 차이는 14.9%로 해당 오차한계의 9.3배였고, 1/3Hct과 cHb의 차이는 -5.0%로 해당 오차한계의 4.5배였다(Fig. 4).

고찰

College of American Pathologists에서는 고지혈에 의해 혈색소의 측정이 간섭받을 때 다음의 세 가지 조치를 권장한다. 첫째, 혈색소는 보고하지 않고 적혈구 용적률만 보고한다. 둘째, 고지혈의 영향을 받지 않는 전혈 혈색소로 측정한다. 셋째, 식염수교환법을 시행한다[4].

본 연구에서도 최초의 혈색소 값은 식염수교환법을 시행한 혈색소 값과 연구자들이 정한 모든 의학적 결정 값에서 부적합함을 보였다. 이는 고지혈 등에 의한 혈색소 검사결과가 영향을 받는 상황에서 적합한 조치를 취하지 않고 최초의 혈색소 값이 보고된다면, 환자 진료에 부적합한 판단을 유도할 수 있음을 보여준다. 그러나 이러한 간섭현상을 해결할 수 있는 식염수교환법은 복잡한 절차와 주의를 필요로 하고 시행과정에 또 다른 오류를 보일 수 있다는 단점이 있다[4].

본 연구에 사용된 장비의 적혈구 지표는 직접 측정되는 지표인 혈색소, 적혈구 수 및 MCV와 측정된 지표를 사용하여 계산되는 지표인 mean corpuscular hemoglobin (MCH), MCHC

Fig. 3. Bias estimate outcome of Hb parameters compared with the value of 1/3Hct. SrHb showed no significant bias with 1/3Hct at two MDs and acceptable bias at two MDs. Cellular Hb showed acceptable bias with 1/3Hct at all MDs. (A) Initial Hb with 1/3Hct. (B) SrHb with 1/3Hct. (C) Cellular Hb with 1/3Hct. Abbreviations: MD, medical decision level; CI, confidence interval; Hb, hemoglobin; 1/3Hct, one-third of the hematocrit; srHb, saline replaced hemoglobin.

Fig. 4. Difference evaluation of iHb, srHb, and cHb with the value of 1/3Hct. The difference between iHb with 1/3Hct was significantly larger than that between srHb with 1/3Hct and that between cHb with 1/3Hct (* $P < 0.05$). The outlier case showed a higher positive difference in terms of srHb, but a lower negative difference in terms of cHb. Abbreviations: iHb, initial hemoglobin; srHb, saline replaced hemoglobin; cHb, cellular hemoglobin; 1/3Hct, one-third of the hematocrit.

및 Hct로 구분할 수 있다. 혈액소 측정기는 LH780, DxH800과 Advia 2120i는 모두 modified cyanmethemoglobin법으로 시행되며 사용되는 파장이 LH780과 DxH800은 525 nm, Advia 2120i는 546 nm로 약간의 차이가 있다. 이러한 분광광도법의 검사원리를 사용하는 혈액소 측정기는 혈액 내 고농도의 지질 등에 의한 간섭을 피할 수 없으며[7], 혈액소 값을 사용하여 계산되는 지표인 MCH (Hb/적혈구 수 $\times 10$)과 MCHC (Hb/Hct $\times 100$) 역시 간섭을 받게 된다. 반면, 적혈구 수 및 MCV는 LH780과 DxH800에서는 전기저항법으로 측정되고 Advia 2120i에서는 flow cytometry법으로 측정되어 지질 등에 의한 간섭이 없으며, 계산 지표인 Hct(적혈구 수 $\times$ MCV/10) 역시 간섭이 발생하지 않는다[2].

Advia 2120i는 flow cytometry법과 2개의 다른 각을 갖는 빛 산란을 이용한 적혈구 지도를 통하여 CHCM을 구하며, CHCM은 기존 MCHC에 해당된다고 할 수 있다. MCHC가 앞에 언급한 것처럼 혈액 내의 지질과 빌리루빈에 간섭을 받는 것과 달리 CHCM은 간섭에 영향을 받지 않는다. CHCM은 일반적으로 환자결과에 보고되지 않으나 간섭의 영향이 있을 때 MCHC를 점검하는 지표로 사용될 수 있고, cHb의 계산을 위해 사용된다. 산출과정에 흡광도법이 사용되지 않는 cHb는 지질과 빌리루빈 같은 간섭물질의 영향을 받지 않는다[2].

CLSI 가이드라인은 검사방법 간 바이어스를 평가할 때 상관관계수만으로 판단하는 것이 아니라 1차 회귀방정식의 기울

기와 절편을 고려하고, 특정 결과 바이어스의 95% 신뢰구간과 허용하는 오차범위의 관계를 통하여 결정된 바이어스가 적합한지 또는 부적합한지 판단한다. 또한 바이어스가 적합한 경우에도 바이어스의 95% 신뢰구간과 허용오차의 관계에 따라 신뢰의 차이를 부여하고 있다[5]. 본 연구에서는 srHb과 cHb은 10.7 g/dL를 제외한 모든 의학적 결정 값에서 유의한 바이어스가 없는 결과로 가장 우수한 교환 가능성을 보였다. 의학적 결정 값 10.7 g/dL에서도 바이어스는 적합한 결과를 보여 srHb 대신 cHb을 사용함이 적합하다고 할 수 있었다.

식염수교환법은 원심분리, 혈장제거, 동량의 식염수 첨가 및 혼합의 과정을 반복하게 되는데 이러한 수기과정에서 오차요인이 발생할 수 있다. 혈액소 측정에서 지질 등의 간섭을 알려주는 지표로 'Hb $\times 3 = \text{Hct} \pm 3$ '의 수식이 사용된다[2]. 이는 지질 등의 간섭을 받지 않는 측정원리를 이용하는 적혈구 수와 MCV의 계산으로 산출되는 Hct도 지질 등의 간섭을 받지 않기 때문이다. 본 연구에서는 srHb과 cHb의 오류 가능성을 평가하기 위하여 1/3Hct과 oHb, srHb 그리고 cHb의 차이를 구하였다. 1/3Hct에 대한 srHb의 차이의 오차한계는 1.6%로 cHb의 오차한계인 1.1%보다 높았는데, 이는 식염수교환법에서 발생할 수 있는 여러 오차요인에 의한 것으로 판단된다. 특히 srHb과 cHb의 바이어스 평가에서 발생한 outlier 사례는 srHb의 1/3Hct과의 차이에서 오차한계의 9.3배를 벗어나는 차이를 보였고, 이는 식염수교환법 이후에도 간섭물질 잔류에 의한 임의오류 가능성을 보여준다고 판단된다. 그러나 srHb의 1/3Hct에 대한 바이어스 평가는 cHb보다 적은 바이어스를 보였는데, 이는 srHb의 전반적인 신뢰도가 cHb보다 높을 가능성을 보여준다고 판단된다. 혼탁물질에 의한 간섭 영향이 없이 정확한 혈액소 값을 구하는 제3의 방법으로 srHb과 cHb을 비교한다면 어떠한 지표의 신뢰도가 높은지 확인할 수 있을 것으로 생각된다.

본 검사실은 MCHC 결과가 36 g/dL를 초과한 사례에서 혈장을 육안으로 관찰하여 우유빛으로 혼탁하거나 황갈색 검체의 경우 식염수교환법을 시행하고 있다. 그러나 식염수교환법을 시행한 검체의 지질농도와 빌리루빈에 대한 측정은 시행하지 않아 간섭물질의 농도에 따른 오류의 정도는 확인할 수 없었다. 또한 본 연구기간 중 황달 검체로 판단되는 황갈색 검체의 식염수교환법 시행 사례는 2건이 있었으나, 황달 검체에서 식염수교환법과 cHb의 교환 가능성을 평가하기에는 검체 수가 적다고 판단하여 제외하였다. 향후 황달 검체의 추가 사례 분석을 통하여 다양한 원인에 의해 간섭받는 상황에서 식염수교환법과 cHb의 교환 가능성을 평가할 수 있을 것으로 생각된다.

결론적으로, 지질 검체에서 식염수교환법이 요구될 때, Advia 2120i를 이용한 cHb은 기존 수기인 식염수교환법을 대체 가능하다고 생각된다. 특히 식염수교환법에서 요구되는 수기절차를 시행하지 않아 보고시간이 단축되고, 임의오류 발생 가능성이 적으며, 검사자의 노력이 적다는 장점이 있다.

REFERENCES

1. McPherson RA, Pincus MR, Henry JB. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22nd ed. Philadelphia (PA): Elsevier/Saunders, 2011.
2. Keohane EM, Smith LJ, Walenga JM. Rodak's hematology: clinical principles and applications. 5th ed. St. Louis (MO): Elsevier/Saunders, 2016.
3. Bull BS. Reference and selected procedures for the quantitative determination of hemoglobin in blood: approved standard. 3rd ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2000.
4. Savage RA. CAP TODAY. http://www.captodayonline.com/Archives/q_and_a/qa_07_04.html (Accessed October 21, 2016).
5. Budd JR. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples: approved guideline. 3rd ed. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
6. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016;127:2391-405.
7. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem* 1994;40(11 Pt 1):1996-2005.

고지질혈증에서 혈색소 측정이 간섭받을 때 Cellular Hemoglobin의 유용성

최병호¹ • 조성란² • 박일중²

¹아주대학교병원 진단검사의학과, ²아주대학교 의과대학 진단검사의학교실

배경: 고지질 검체와 같은 혼탁한 검체의 혈색소 측정은 힘들고 시간이 오래 걸리는 식염수교환법이 요구된다. 이에 저자들은 cellular hemoglobin (cHb)이 식염수교환법을 대체할 수 있는지 평가하였다.

방법: 48개의 지질 검체를 LH780(또는 DxH800; Beckman Coulter Inc., USA) 및 ADVIA 2120i (Siemens Healthcare Diagnostics, USA) 장비로 혈색소를 측정하였다. 식염수교환법을 시행한 혈색소(saline replaced hemoglobin, srHb) 검사와 cHb을 비교하였고, 적혈구 용적률의 3분의 1 값(one-third of the hematocrit, 1/3Hct)과 비교하였다.

결과: cHb의 srHb과의 추정 바이어스 결과는 모든 의학적 결정 값에서 모두 적합하였다. 1/3Hct과 혈색소 값들의 차이 평가결과는 초기 혈색소, srHb 및 cHb이 각각 $19.7\% \pm 3.3\%$, $2.3\% \pm 1.6\%$ 및 $-0.1\% \pm 1.1\%$ 이었다.

결론: 지질 검체에서 식염수교환법이 요구될 때, cHb 측정은 유용한 대체방법이 될 것으로 판단된다. (J Lab Med Qual Assur 2017;39:9-15)

교신저자: 박일중

우)16499 수원시 영통구 월드컵로 164, 아주대학교 의과대학 진단검사의학교실
Tel: 031)219-5792, Fax: 031)219-5778, E-mail: pij0304@daum.net