Comparison of Body Fluid Differential Counts Using a Manual Counting Method or an Automated Hematology Analyzer

Jiwon Lee, Kibum Jeon, Jisoo Lee, Miyoung Kim, Han-Sung Kim, Hee Jung Kang, and Young Kyung Lee

Department of Laboratory Medicine, Hallym University Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, Anyang, Korea

Corresponding author:

Miyoung Kim
Department of Laboratory Medicine,
Hallym University Sacred Heart
Hospital, 22 Gwanpyeong-ro 170beon-
gil, Dongan-gu, Anyang 14068, Korea
Tel +82-31-380-1795
Fax +82-31-380-1798
E-mail rabbit790622@gmail.com

Received: October 23, 2019

Revised: December 20, 2019

Accepted: December 26, 2019

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.

Background: Two methods of counting cells in body fluids were compared; manual counting using a Neubauer chamber, and automated cell counting using an XN-350 hematology analyzer.

Methods: Cells from 32 body fluid samples were counted by manual examination and by an automated analyzer. Total cells (TC), white blood cells (WBC), red blood cells (RBC), polymorphonuclear leukocytes (PMN), mononuclear leukocytes (MN), neutrophils, lymphocytes, monocytes, and eosinophils were each counted by both methods. The results were compared using the Pearson correlation test, Bland-Altman regression analysis, and Passing-Bablok regression analysis.

Results: The two methods showed very strong correlation in TC, WBC, RBC, PMN, and MN counts, strong correlation in % neutrophils, and % lymphocytes, and weak correlation in % monocytes and % eosinophils. Using Bland-Altman regression analysis, the mean biases for TC, WBC, and RBC were -270, -257.4, and -1,256.09, respectively, and 0.15 for PMN and MN. Research parameters were compared as well: mean biases were -1.31, -2.46, -5.16, and -3.58 for % neutrophils, % monocytes, % lymphocytes, and % eosinophils, respectively. Passing-Bablok regression equations were $y=1.039x+20$, $y=1.037x+19$, $y=1.259x+0.0$, $y=0.983x+1.541$, and $y=0.983x+0.125$ for TC, WBC, RBC, PMN, and MN, respectively. The equations were $y=0.955x+2.194$ for % neutrophils, $y=0.965x+1.184$ for % monocytes, $y=1.003x+0.161$ for % lymphocytes, and $y=x+0.75$ for % eosinophils.

Conclusions: WBC differential count results performed by an automated hematology analyzer generally show good correlation with our reference method, Neubauer chamber counting.

(Lab Med Qual Assur 2020;42:26-32)

Key Words Body fluids, Differential count, Automated hematology analyzer

서론

체액세포의 감별계수는 혈액질환을 포함한 여러 질환들의 진단 및 감별진단, 치료방침 결정 및 추적관찰에 매우 중요하다. 뇌척수액의 감별계수는 뇌수막염을 진단하고 그 원인이 바이러스성인지

세균성인지를 감별할 수 있게 한다[1-3]. 관절강액의 감별계수는 관절염을 진단하고 그 원인이 비염증성인지, 염증성인지 또는 세균성인지 분류할 수 있게 한다[4]. 따라서 체액세포의 감별계수는 신속하고 정확하게 이루어져야 한다.

체액세포의 감별계수의 기준이 되는 표준검사법은 Neubauer

chamber와 현미경 관찰을 이용한 수기법이다[1-4]. 그러나 수기법을 이용한 검사는 정밀도가 낮고, 검사 소요시간이 길며, 검사 숙련도가 요구되며, 검사자 간 해석의 차이가 있을 수 있다. 또한 수기검사 시행 시 검사자가 검체에 직접적으로 노출되는 위험이 따르게 된다[1-4].

자동혈구분석기는 정밀도가 높고, 검사 소요시간이 짧으며, 객관적인 결과보고가 가능하며, 검사자의 검체조작이 최소화되는 점에서 수기법을 이용한 체액 감별계수를 대체할 수 있을 것으로 기대된다. 최근 여러 자동혈구분석기에서 체액의 혈구 분석모드가 장착되어 있으며, 이들 기기의 성능을 표준법인 수기법과 비교한 평가연구 또한 활발하다. 자동혈구계산기의 체액모드와 수기법을 비교한 기존의 연구들은 주로 흉강액, 뇌척수액 등 상대적으로 의뢰가 흔한 검체들을 대상으로 하고 있으며, 상대적으로 흔하지 않은 복막투석액, 관절강액, 담즙 등의 검체를 이용한 검사결과를 비교한 연구는 매우 드물다[1-4]. 본 연구에서는 비교적 드물게 의뢰되는 검체(복막투석액, 관절강액, 담즙, 객담 등)에서 수기법과 XN-350의 세포계수 및 감별계수를 비교 평가하였다. Total cell count (TC), white blood cells (WBC), red blood cells (RBC) 등의 계수와 polymorphonuclear leukocytes (PMN), mononuclear leukocytes (MN)의 differential count를 비교하였으며, 연구용 파라미터로 제공되는 neutrophils, monocytes, lymphocytes, eosinophils의 계수 및 감별계수도 비교하였다.

재료 및 방법

1. 대상

2017년 10월과 11월 한림대학교성심병원 진단검사의학과 진단혈액검사실에 혈구 수 계수 및 감별계수가 의뢰된 체액 검체를 대상으로 하였다. 총 32개의 검체로 복막투석액 14개, 관절강액 7개, 담즙액 2개, 고름 1개, 기관지폐포세척액 1개, 그 외 검체 7개가 포함되었다.

2. 방법

1) 검체 채취

모든 검체는 K₂ ethylenediamine tetracetic acid 항응고제가 포함된 진공채혈관에 채집되어 검체 채취 후 1시간 이내에 수기법과 자동혈구분석기를 이용하여 검사하였다.

2) 수기법을 이용한 분석

수기법은 미국 임상검사실 표준위원회(Clinical and Laboratory Standards Institute)에서 제시하는 표준검사법인

Neubauer chamber를 이용하여 TC, WBC, RBC, PMN, MN을 각각 계수하였다[5]. 9개의 정사각형 내에 200개 이하의 세포가 존재할 경우 9개의 칸 내에 있는 모든 세포 수를 계수하였고, 200개 이상이 존재할 경우 각 모서리에 있는 4개의 정사각형 내에 있는 세포의 수만 계수하였다. 1개의 정사각형 내에 200개 이상의 세포가 존재할 시에는 중심부의 5개의 칸 내에 있는 세포의 수만 세도록 했다. 수기법은 2명의 숙련된 검사자에 의해 실시되었고, 그 평균값을 구하였다.

3) 자동혈구분석기를 이용한 분석

자동혈구분석기는 XN-350 (Sysmex, Kobe, Japan)이 사용되었으며, 체액모드를 이용하였다. 검사는 제조사의 지침에 따랐다. XN-350 기기는 semiconductor laser를 이용한 flow cytometry system으로 세포를 계수, 감별계수한다. Forward scattered light (FSC), side scattered light (SSC)과 fluorescent light (SFL)을 이용해 분석하는데, FSC와 SSC는 세포의 크기, 표면, 핵의 모양, granularity 등을 분석하여 세포를 분석하며, SFL은 핵산의 양과 세포내구조물을 분석하여, TC, WBC, RBC로 분류하며, WBC는 PMN, MN으로 구별된다. WBC differential channel에서는 surfactant가 RBC를 용혈시키고, WBC의 세포막 내로 들어가 염색하여, 감별계수를 할 수 있게 한다. Body fluid mode는 whole blood mode에 비해 약 10배 많은 cell을 count하여, 낮은 수치에서도 안정적인 결과를 얻을 수 있게 하였다.

4) 통계학적 분석

두 검사법은 Pearson's correlation coefficient를 이용하여 상관관계를 분석하였다. 통계적으로 유의한 상관관계는 $P < 0.05$ 로 정의하였다. 또한 Bland-Altman analysis와 Passing-Bablok analysis를 이용하여, 두 검사법 간의 차이를 확인하였다[6,7]. 통계분석은 MedCalc Statistical Software ver. 18.9.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2018), Microsoft Excel 2007 (Microsoft, Redmond, WA, USA)를 사용하였다.

결과

자동혈구분석기와 수기법으로 감별계산을 시행한 결과 두 검사방법 간의 상관계수는 TC, WBC에서 0.99, RBC에서 0.90, PMN, MN에서 0.98로 유의하게 아주 높은 상관관계($P < 0.0001$)를 보였다. WBC 감별계수에서는 neutrophil, lymphocyte는 각각 상관계수 0.87, 0.74로 높은 상관관계 ($P < 0.0001$)를 보인 데

에 반해 monocyte는 상관계수 0.58로 낮은 상관관계를 보였고 eosinophil count는 상관계수 0.00으로 상관계수가 없는 것으로 나타났다. Neubauer chamber를 이용한 수기법과 자동혈구분석기 XN-350의 상관관계를 비교한 결과값은 Table 1에 정리되어 있다.

Bland-Altman 분석(x축, 수기법[manual count]; y축: 수기법-XN350 count) 결과 TC에서의 mean bias는 -270 (95% confidence interval [CI], -498.20 to -41.80; limits of agreement [LOA], -1,445.83 to 905.83)이었다. WBC count의 mean bias는 -257.4 (95% CI, -484.19 to -30.63; LOA, -1,425.95 to 911.12), RBC -1,256.09 (95% CI, -2,601.91 to -5,021.85; LOA, -7,356.04 to 4,843.86)였으며, 수기법으로 계수된 값이 클수록 mean bias의 절대값이 커지는 경향을 보였으며, RBC의 경우 일부 수기법의 값이 0에 가까운 검체에서도 자동혈구분석기는 10,000 이상의 RBC를 보고하였다. PMN에서는 -0.15 (95% CI, -2.76 to 2.46; LOA, -13.33 to 13.03), MN에서는 0.15

Table 1. Pearson's correlation between manual and XN-350 differential counts

Variable	r	P-value*	Equation
Total cells	0.99	<0.0001	$y=1.039x+20$
White blood cells	0.99	<0.0001	$y=1.037x+19$
Red blood cells	0.90	<0.0001	$y=1.259x+0$
Polymorphonuclear leukocytes (%)	0.98	<0.0001	$y=0.983x+1.541$
Mononuclear leukocytes (%)	0.98	<0.0001	$y=0.983x+0.125$
Neutrophils	0.87	<0.0001	$y=0.955x+2.194$
Monocytes	0.58	0.0005	$y=0.965x+1.184$
Lymphocytes	0.74	<0.0001	$y=1.003x+0.161$
Eosinophils	0.00	1.0000	$y=x+0.750$

r means Pearson's correlation coefficient.

*P<0.05 (statistically significant).

Fig. 1. Comparison of manual and XN-350 differential counts of total cells (/μL) (A), white blood cells (/μL) (B), red blood cells (/μL) (C), % polymorphonuclear leukocytes (D), and % mononuclear leukocytes (E). x-axis: manual differential count; y-axis: difference between manual and XN-350 differential counts (manual differential count-XN-350 differential count). Thick solid line: mean; dotted line: 95% limit of agreement. Abbreviation: SD, standard deviation.

(95% CI, -2.46 to 2.76; LOA, -13.03 to 13.33)으로 나타났다. 이들은 수기법 값과 mean bias의 값이 특정 경향을 보이지는 않았다(Fig. 1).

수기법과 XN350의 연구용 파라미터들을 각각 비교한 결과 % neutrophils의 mean bias는 -1.31 (95% CI, -7.90 to 5.28; LOA, -37.13 to 23.14), % monocytes -2.46 (95% CI, -9.44 to 4.52; LOA, -40.40 to 35.48), % lymphocytes -5.16 (95% CI, -12.09 to 1.77; LOA, -42.84 to 32.52), % eosinophils -3.58 (95% CI, -6.27 to 0.88; LOA, -18.24 to 11.08)로 나타났다. % Neutrophils와 % monocytes는 수기법 값과 mean bias가 특정 경향을 나타내지는 않았다. % Monocytes의 경우에는 수기법 값이 0인 검체에서 자동혈구분석기가 70%까지 보고한 검체가 관찰되었다. 반면, % lymphocytes는 수기법 값이 커질수록 mean bias가 음성에서 양성으로 증가하는 경향을 보이며 그 절대값 또한 커지는 경향을 보였다. % Eosinophils은 수기법에서 계수되지 않아 그 차이가 컸다(Fig. 2).

두 검사방법을 이용한 혈구 수 감별계산의 결과값 차이는 Passing-Bablok 회귀공식(paired model: x축, 수기법; y축, XN350)은 TC에서는 $y=1.039x+20$ (95% CI, 1.0005 to 1.2205 for 1.039; -74363 to 53.9864 for 20)로 나타났으며 WBC에서는 $y=1.037x+19$ (95% CI, 0.9986 to 1.2094 for 1.037; -8.6612 to 27.1364 for 19)으로 나타났다. RBC에서 $y=1.259x+0.0$ (95% CI, 0.9524 to 5.8824 for 1.259), PMN에서 $y=0.983x+1.541$ (95% CI, 0.917 to 1.028 for 0.983; -1.084 to 3.892 for 1.541), MN에서는 $y=0.983x+0.125$ (95% CI, 0.917 to 1.028 for 0.983; -1.716 to 4.442 for 0.125)으로 나타났다(Fig. 3).

또한 % neutrophils에서의 regression equation은 $y=0.955x+2.194$ (95% CI, 0.837 to 1.016 for 0.955; -1.027 to 5.670 for 2.194), % monocyte는 $y=0.965x+1.184$ (95% CI, 0.791 to 1.127 for 0.965; -1.353 to 3.610 for 1.184), % lymphocytes는 $y=1.003x+0.161$ (95% CI, 0.9952 to 1.116 for 1.003; -1.098 to 1.164 for 0.161), % eosinophils는 $y=x+0.75$

Fig. 2. Comparison of manual and XN-350 differential counts (%) of neutrophils (A), monocytes (B), lymphocytes (C), and eosinophils (D). x-axis: manual differential count; y-axis: difference between manual and XN-350 differential counts (manual differential count-XN-350 differential count). Thick solid line: mean; dotted line: 95% limit of agreement. Abbreviation: SD, standard deviation.

Fig. 3. Comparison of manual and XN-350 differential counts of total cells (μL) (A), white blood cells (μL) (B), red blood cells (μL) (C), % polymorphonuclear leukocytes (D) and % mononuclear leukocytes (E). Results of regression analyses are presented as Passing-Bablok plots. x-axis: manual differential count; y-axis: XN-350 differential counts.

였다(Fig. 4).

고찰

체액세포의 감별계수검사와 백혈구 감별계산은 검사실에서 흔하고 간편하게 실행되는 검사로 혈액질환을 포함한 여러 질환의 진단과 치료, 치료효과 모니터링 시 유용하게 사용될 수 있다. 자동혈구분석기는 체액, 혈액의 감별계산에 있어 시간과 비용 면에서 효율적이고 재현성과 정확도가 뛰어난 것으로 알려져 여러 병원에서 수기검사를 대체하는 방법으로 제시되고 있다. 자동혈구분석기에 의한 백혈구 감별계산과 수기법과의 비교 평가는 많은 보고가 있어 왔으나, 대부분은 뇌척수액, 흉강액, 복강액 등의 검체에 대한 것이다[1-3,8-10]. 본 연구에서는 복막투석액, 관절강액, 담즙, 객담 등의 검체를 이용하여 수기법과 XN-350의 세포계수 및 감별계수를 비교 평가하였다.

본 연구에서 자동혈구분석기와 수기검사의 결과 간의 상관관계를 비교했을 때 검체의 TC, WBC, RBC, PMN, MN에서는 모두 높

은 상관관계를 보였으나 monocyte, eosinophil의 상관계수는 상대적으로 더 낮게 나타났다. 이는 monocyte, eosinophil을 제외한 파라미터들의 경우는 세포 숫자 자체가 많기 때문에 통계적으로 상관관계가 더 높게 나타나는 경향이 있었을 것이라고 추측된다. Monocyte는 백혈구 백분율 중 차지하는 비율이 적기 때문에 다른 혈구세포들에 비해 상대적으로 낮은 상관관계를 보였을 것으로 생각된다. 실제로 monocyte의 경우 이전의 국내 보고 다수에서도 상관계수가 약 0.55–0.6678 사이로 보고되어 있다[11-13]. Eosinophil의 경우 수기검사에서는 식별이 불가능하여 모든 결과값이 0으로 보고되기 때문에 자동혈구분석기와의 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 기존의 수기검사법으로는 eosinophil을 구분할 수 없는 만큼 기기를 이용해 측정한 결과값의 정확성 측면은 추후 추가적으로 검증이 필요할 것으로 생각된다.

수기검사법과 자동혈구분석기의 TC, WBC, RBC 모두에서 negative mean bias를 보여 자동혈구분석기가 수기법에 비해서 세포계수를 더 많이 하는 경향이 있는 것을 알 수 있다. 이 경향은 연구용 파라미터의 계수결과에서도 동일하게 나타났는데

Fig. 4. Comparison of manual and XN-350 differential counts. % Neutrophils (A), % monocytes (B), % lymphocytes (C) and % eosinophils (D). Results of regression analysis are presented as Passing-Bablok plots. x-axis: manual differential count; y-axis: XN-350 differential counts.

mean bias가 모두 음수로 나타났으나 그 차이가 다른 파라미터에 비해서 더 크지는 않았고 특정 경향을 찾아보기도 어려웠다. 단 lymphocyte의 경우 수기법 값이 커질수록 positive mean bias로 바뀌는 양상을 볼 수 있었고 절대값 또한 증가하였다. PMN과 MN %의 경우 XN-350 혈구분석기가 수기법보다 MN %가 더 높아 분석기가 PMN을 MN으로 분류하는 경향이 있는 것을 확인할 수 있었으나 그 차이는 크지 않았다.

최근 같은 기종의 body fluid mode와 수기법과의 상관관계를 분석한 연구결과들이 발표되었다. Takemura 등[2]이 60개의 뇌척수액 검체를 이용하여 동일 기종인 XN의 body fluid mode와 high-sensitive analysis mode를 수기법과 비교하였을 때, 세포의 수 계수에서는 우수한 상관관계를 보임을 보고하였다. 이 연구에서는 이 기기를 이용한 PMN, MN의 감별계수 비교는 하지 않았다. Cho 등[14]은 515개의 다양한 종류의 체액 검체를 이용하여 XN-9000의 body fluid mode와 수기법을 비교했을 때, TC, RBC, PMN, MN과 연구용 파라미터의 수기법과의 상관관계는 r 값

이 0.81–0.98로 우수한 상관관계를 보였다고 보고하였다. Buoro 등[9]은 51개의 뇌척수액 검체를 이용하여, XN의 body fluid mode와 수기법을 비교하였을 때, 이들의 PMN, MN 수에 대한 상관성은 우수하였다. 다만, 각 연구와 우리의 검체종류의 차이가 있으며, 수기법 시행 시 염색방법과 이용한 chamber의 종류(또는 cytopsin)의 차이가 있다.

본 연구의 한계는 감별계수 비교에 있어 cytopsin을 시행하지 못한 점이다. TC, WBC, RBC의 계수는 manual chamber count와 비교 가능한 지표이나, PMN, MN과 연구용 파라미터인 백혈구 감별계수(neutrophil, monocyte, lymphocyte, eosinophil) 항목은 manual chamber count로는 구별이 어렵다. 후속연구에서 검체를 cytopsin하여 자동화기기의 값과 비교하여 분석하면 더욱 신뢰성 있는 결과를 제시할 수 있을 것으로 생각된다.

체액분석에 대해 자동혈구분석기와 수기법의 상관관계를 평가한 연구는 이미 다수 시행되었다. 본 연구의 특징은 다음 네 가지로 요약할 수 있다. (1) XN-350 모델의 body fluid mode와 수

기검사법의 상관관계를 최초로 평가한 연구이다. (2) 연구용 파라미터인 % neutrophils, % eosinophils, % monocytes, % lymphocytes의 검사값도 함께 비교하였다. (3) 검사법을 비교를 위해 일반적으로 널리 쓰이는 Pearson's correlation analysis 외에도 Bland-Altman analysis와 Passing-Bablok analysis를 시행하여 두 검사법의 차이를 확인하였다[6,7]. (4) 기존의 연구에서 흔히 평가에 포함되지 않은 복막투석액, 관절강액, 담즙액, 기관지폐포세척액, 농 등의 검체를 이용하였다.

그러나 이러한 검체를 이용한 검사는 상대적으로 흔하게 시행되지 않기 때문에 분석에 사용된 검체 수가 총 32개로 적은 편이었으며, 다양한 종류의 검체를 이용한 결과를 비교한 만큼 분석결

과에 있어서도 여러 차이가 나타날 수밖에 없었다. 그럼에도 본 연구에서는 여러 통계적 경향성을 확인할 수 있었다. 추후 더 많은 수의 검체를 이용하여 연구를 진행하면 자동혈구분석기를 이용한 체액분석의 상용화 가능성을 더 확실히 할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 대한임상검사정도관리협회의 2018년 학술연구비 지원을 받아 시행한 연구결과(실험연구, 과제번호 2018-14)를 바탕으로 작성되었다.

REFERENCES

1. Boer K, Deufel T, Reinhoefer M. Evaluation of the XE-5000 for the automated analysis of blood cells in cerebrospinal fluid. *Clin Biochem* 2009;42:684-91.
2. Takemura H, Ai T, Kimura K, Nagasaka K, Takahashi T, Tsuchiya K, et al. Evaluation of cell count and classification capabilities in body fluids using a fully automated Sysmex XN equipped with high-sensitive Analysis (hsA) mode and DI-60 hematology analyzer system. *PLoS One* 2018;13:e0195923.
3. Zimmermann M, Ruprecht K, Kainzinger F, Heppner FL, Weimann A. Automated vs. manual cerebrospinal fluid cell counts: a work and cost analysis comparing the Sysmex XE-5000 and the Fuchs-Rosenthal manual counting chamber. *Int J Lab Hematol* 2011;33:629-37.
4. Abdullah S, Young-Min SA, Hudson SJ, Kelly CA, Heycock CR, Hamilton JD. Gross synovial fluid analysis in the differential diagnosis of joint effusion. *J Clin Pathol* 2007;60:1144-7.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Body fluid analysis for cellular composition; approved guideline: CLSI document H56-A. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006.
6. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)* 2015;25:141-51.
7. Bilie-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med (Zagreb)* 2011;21:49-52.
8. Walker TJ, Nelson LD, Dunphy BW, Anderson DM, Kickler TS. Comparative evaluation of the Iris iQ200 body fluid module with manual hemacytometer count. *Am J Clin Pathol* 2009;131:333-8.
9. Buoro S, Peruzzi B, Fanelli A, Seghezzi M, Manenti B, Lorubbio M, et al. Two-site evaluation of the diagnostic performance of the Sysmex XN Body Fluid (BF) module for cell count and differential in Cerebrospinal Fluid. *Int J Lab Hematol* 2018;40:26-33.
10. Buoro S, Mecca T, Azzara G, Seghezzi M, Dominoni P, Crippa A, et al. Cell Population Data and reflex testing rules of cell analysis in pleural and ascitic fluids using body fluid mode on Sysmex XN-9000. *Clin Chim Acta* 2016;452:92-8.
11. Lee WG, Kim MH, Kim WB, Lee DW, Kang DY. Evaluation of leukocyte differential count by Coulter counter model Stack-S. *Korean J Clin Pathol* 1990;10:343-51.
12. Park JY, Lee KH, Lee YK, Cho HC. Laboratory evaluation of the Coulter GEN-S system five-part differential. *Lab Med Qual Assur* 1992;14:135-43.
13. Lee MK, Kim MH, Lee HJ, Suh JT. A study on Coulter STKS differential counts. *Korean J Hematol* 1993;28:325-34.
14. Cho YU, You E, Jang S, Park CJ. Validation of reflex testing rules and establishment of a new workflow for body fluid cell analysis using a Sysmex XN-550 automatic hematology analyzer. *Int J Lab Hematol* 2018;40:258-67.