Impact of Whole Blood Storage Conditions in Flow Cytometric Analysis for Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria

Sewon Yoon^{ID}, Jimyung Kim^{ID}, Seon Young Kim^{ID}, Jinsook Lim^{ID}, Gye Cheol Kwon^{ID}, and Sun Hoe Koo^{ID}

Department of Laboratory Medicine, Chungnam National University Hospital, Daejeon, Korea

Corresponding author:

Jimyung Kim
Department of Laboratory Medicine,
Chungnam National University Hospital,
282 Munhwa-ro, Jung-gu, Daejeon
35015, Korea
Tel +82-42-280-7998
E-mail jmkim@cnuh.co.kr

Received: February 10, 2021

Revised: April 12, 2021

Accepted: April 26, 2021

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: We evaluated the effect of four blood storage conditions (refrigeration, fixation [with the Cyto-Chex and TransFix tubes], and physiologic stabilization using Ficoll polymer PM70) for 72 hours in flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH).

Methods: Peripheral whole blood (WB) was collected in Cyto-Chex tubes (Streck, USA), TransFix tubes (Cytomark, UK) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes (Becton Dickinson, USA) from 20 patients with a PNH clone ($\geq 1.0\%$) and 15 controls. PM70 (10%; GE Healthcare, USA)-EDTA WB was prepared. Samples were stored at room temperature (RT) or 4°C for 72 hours. Flow cytometric analysis was performed within 4 hours and 72 hours.

Results: The percentage of PNH clones was stable in stored WB at RT without systemic error, except for those stored in EDTA WB. A substantial correlation was observed between the fresh WB and stored WB. The mean fluorescence intensity of CD235a in red blood cells (RBCs) and CD15 in neutrophils decreased in stored WB, while CD59, CD24, and fluorescent aerolysin of the PNH clone showed no significant difference. The percentage of CD15 (+) neutrophils was not different between the fresh WB and stored WB. However, the viability of granulocytes was more than 90% in the refrigerated EDTA WB.

Conclusions: Stable measurement of PNH clones in RBCs and neutrophils is possible in refrigerated the EDTA WB for up to 72 hours. In the case of storage at RT, physiological stabilization using 10% PM70 can be an alternative method for WB fixation.

(Lab Med Qual Assur 2021;43:143-151)

Key Words Paroxysmal hemoglobinuria, Flow cytometry, Stabilization, Fluorescence

서론

발작성야간혈색뇨증(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)은 phosphatidylinositol glycan class A (PIGA) 유전자의 돌연변이로 인한 드문 혈액질환으로 적혈구의 CD59 및 백혈구의 fluorescein-labeled proaerolysin (FLAER) 발현을 측정하는 유세포 분석법이 PNH를 진단하는 표준방법이다

[1]. 유세포 분석 검사는 혈액 검체를 이용하여 적혈구 및 백혈구 세포에서 발현되는 보체활성 억제 단백을 분석하므로 채혈 후 혈구세포의 안정성이 유지되는 시간 내에 검사가 이루어져야 정확한 결과를 도출할 수 있다. 분석 허용시간에 대한 International Clinical Cytometry Society (ICCS) 가이드라인에 의하면 적혈구 분석은 검체를 냉장 온도에서 보관할 경우 최대 7일까지 성공적으로 수행될 수 있다. 그러나 백혈구는 적혈구에 비해 체외 안정

성이 취약하므로 백혈구 분석은 48시간 이내 수행하도록 제시한다[2]. 검체 보관기간에 대한 연구가 제한적이므로 대부분의 국내 임상검사실에서 PNH 진단을 위한 유세포 분석 검사는 일반적으로 당일에 시행되며, 당일 시행이 어려운 경우는 ICCS 가이드라인을 근거하여 냉장보관 조건을 기준으로 48시간 이내 검사되도록 허용한다.

PNH 진단을 위한 유세포 분석 검사가 48시간까지 검사 시행의 연장이 허용되지만, 금요일이나 연휴 전일 오후에 늦게 검사실로 접수되는 검체의 경우 접수일에 검사가 수행되지 않는다면 유세포 분석 검사는 48시간 경과 후 시행되게 된다. 특히 유세포 분석 검사를 자체 수행하지 않고 외부기관으로 의뢰하는 임상검사실은 검체 수송과정을 고려하면 냉장보관 및 48시간 기준을 충족하기 어려운 경우가 자체 수행 검사실보다 높은 빈도로 발생할 수 있다. 또한 유세포 분석 검사실은 일반적으로 단수의 장비를 운용하며, 임상검사실 내 운용 경험을 가진 검사자의 수가 적어 장비나 인력 운용의 문제 발생 시 신속하게 대체하는 것이 어려워 48시간 규정을 초과하는 상황도 가능하다.

그러므로 기존의 기준인 냉장, 48시간 검사 가능 조건을 극복하는 방안이 필요하나 현재 시간 및 온도에 따른 PNH 세포의 안정성에 관한 연구는 적으며, 한 국내 연구는 검체를 냉장보관하면 호중구 분석 시 PNH 클론의 크기가 72시간까지 안정되게 측정된다고 보고하였으나 분석 검체의 수가 적었다[3].

유세포 분석이 지연되고 실온에서 검체가 운송되는 경우 유핵세포의 세포표지자를 안정화시키고 세포 변성을 막는 최적의 방법은 TransFix나 Cyto-Chex 등의 상품화된 채혈관을 사용하는 것이며, 이러한 채혈관은 보고에 의하면 실온에서 72시간까지 백혈구 세포의 세포표지자 발현과 세포 구분이 안정되게 유지되었으며 림프구 수는 7일까지 유의한 변화가 없었다[4,5]. 그러나 별도의 특수 채혈관은 임상검사실에 적용할 경우 추가적인 소모품 비용의 상승을 초래한다. 또한 특수한 채혈관의 사용은 검체 채취과정에서 혼란이 초래될 수 있어 유세포 분석에 도입하는 것이 용이하지 않다.

최근 TransFix나 Cyto-Chex 등의 세포 안정화 시약 외에 혈액의 보관 중 발생하는 세포의 물리화학적 변화를 억제하여 세포의 체외 생존도를 향상시키는 방법이 소개되었다. 이는 세포의 활성화가 혈소판의 응집 및 백혈구의 변성을 초래한다는 것에 기초한 것으로 질량이 작은 중합체(polymer)를 첨가하여 혈구세포의 유동학적 특성(rheological property)을 조정함으로써 혈구세포의 침강(sedimentation)을 억제하고 세포 생존도를 향상시키는 것이다[6,7].

실제로 조혈모세포의 세포 군집 형성(colony formation) 연구에서 일반적으로 사용되는 중합체인 메틸셀룰로오스를 바탕으로

하는 배지는 조혈모세포가 배지에서 서로 뭉치지 않고 분리되도록 한다[8]. 또한 중성 전하와 고도의 친수성으로 생체적으로 적합한 다당류 Ficoll을 이용한 연구에서 Ficoll 중합체는 실온에서 72시간 동안 혈액세포를 안정하게 보존하는 것으로 보고되었다[6]. 별도의 특수 채혈관에 비해 Ficoll 중합체는 필요한 경우 채혈된 검체에 추가적으로 가하게 되므로 임상검사실에서 필요에 따라 적용하는 것이 용이하며 비용이 절감되는 장점이 있다.

본 연구의 목적은 국내 임상검사실의 실정을 고려하여 PNH 환자군 및 비환자군에서 별도의 채혈관에 채혈하는 방법과 Ficoll 중합체를 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 전혈에 첨가하는 방법이 시간 경과에 따라 검사결과에 미치는 영향을 비교하고자 한다. 이를 통해 유세포 분석법에서 분석의 안정성을 72시간 이상 확보할 수 있는 첨가제로써 Ficoll 중합체의 적용이 적절한지 검토하고자 한다.

재료 및 방법

1. 검체 준비

2019년 5월부터 11월까지 PNH 유세포 분석 검사가 의뢰되고 적혈구 혹은 호중구에서 1% 이상의 의미 있는 PNH 클론을 가지는 환자군 20명(50.9 ± 19.1 세, 남:녀=10:10)과 의미 있는 PNH 클론을 가지지 않는 비환자군 15명(52.7 ± 19.0 세, 남:녀=7:8)에서 EDTA 채혈관(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA), Cyto-Chex 채혈관(Streck, La Vista, NE, USA), TransFix 채혈관(Cytomark, Buckingham, UK)에 각각 3 mL, 5 mL, 3 mL의 전혈을 채혈하였다.

EDTA 전혈에 첨가제로 사용할 Ficoll 중합체 용액의 제조하기 위해 우선 phenol red를 포함하지 않는 RPMI 1640 Medium (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA)에 최종 농도 10 mM로 HEPES (Thermo Fisher Scientific)를 가한 후 여과를 거쳐 무균액을 준비하였다. 준비된 무균액에 Ficoll PM70 (GE Healthcare, Chicago, IL, USA)을 녹여 20% Ficoll PM70 stock solution을 제조하였다. EDTA 전혈과 20% Ficoll PM70 stock solution을 1:1의 비율로 섞고 10~15분간 충분히 혼합하여 10% Ficoll PM70을 포함하는 EDTA 전혈 검체를 준비하였다[6].

이전 보고에서 상품화된 채혈관은 실온 조건에서 안정성이 평가되었으므로[4,5], 준비된 3종의 검체(10% PM70 전혈, Cyto-Chex 전혈, TransFix 전혈)는 실온, 72시간 보관 조건에, EDTA 전혈 검체는 2개로 분주하여 각각 실온과 냉장 온도에서 72시간 보관 조건에 두고 안정성을 평가하였다.

2. 적혈구 및 호중구의 PNH 유세포 분석

통상적인 PNH 유세포 분석 검사는 채취된 EDTA 전혈 검체에 대해 채혈 후 4시간 이내에 시행되었다[9]. 또한 채혈 후 72시간이 경과된 시점에 4종의 검체(EDTA 전혈, 10% PM70 전혈, Cyto-Chex 전혈, TransFix 전혈)를 대상으로 PNH 유세포 분석 검사를 시행하였다.

적혈구에서 CD59의 발현을 검사하기 위해 우선 10 μ L의 전혈을 990 μ L의 phosphate-buffered saline (PBS)와 혼합하여 희석하였다. 희석된 전혈 100 μ L를 검사용 튜브에 분주하고 5 μ L CD235a-fluorescein isothiocyanate 항체(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) 및 3 μ L CD59-phycoerythrin (PE) 항체(Thermo Fisher Scientific)를 넣은 후 혼합하였다. 실온 암소에서 20분간 반응시킨 후 500 μ L PBS를 가하고 5분간 1,500 g에서 원심하여 세포를 세척하였으며 세척과정은 2차례 시행하였다.

세척된 원침액에 1 mL PBS를 가하고 light scatter (forward scatter 및 side scatter [SSC])와 CD235a 발현을 이용하여 적혈구를 gating하였다. 최소 500,000개의 적혈구에서 CD59의 발현 정도를 분석하였으며, CD235a 양성 적혈구 중 PNH 클론(type II 또는 type III PNH 적혈구의 합)의 백분율을 측정하였다.

호중구에서 FLAER의 발현을 검사하기 위해 100 μ L의 전혈에 5 μ L Alexa 488 labeled FLAER (Cedarlane, Burlington, ON, Canada), 10 μ L CD15-PE-Cyanine 5 (PC5) 항체(Beckman Coulter), 10 μ L CD24-PE 항체(Beckman Coulter), 10 μ L CD45-PE-Cyanine 7 (PC7) 항체(Beckman Coulter)를 가하고 20분간 실온 암소에서 반응시켰다. 이후 TQ Prep 장비(Beckman Coulter)를 이용하여 적혈구 용혈을 시행하였다. 적혈구 용혈 후 1 mL의 PBS를 가한 백혈구 부유액에서 SSC, CD45 및 CD15 발현을 이용하여 CD15 양성 호중구를 gating하였다. 최소 50,000개의 CD15 양성 호중구에서 CD24 및 FLAER의 발현 정도를 분석하여 PNH 클론의 백분율을 측정하였다. 매 검사 시 음성 대조로 정상인의 검체를 함께 검사하였다.

3. 채혈 후 시간 경과에 따른 표지자의 형광 강도 및 호중구의 세포 생존율

적혈구 및 호중구에서 PNH 유세포 분석에 사용된 표지자의 형광 강도가 72시간 동안 실온 및 냉장 조건의 검체에서 변화하는지 비교하기 위해 적혈구 및 호중구에서 사용된 표지자의 mean fluorescence intensity (MFI)를 측정하였다. 분석된 적혈구의 표지자는 CD235a이며 호중구의 표지자는 CD15였다. 또한 적혈구의 PNH 클론에서 CD59, 호중구의 PNH 클론에서 CD24, FLAER의 MFI를 측정하였다.

실온 및 냉장보관한 4종의 검체에 대해 72시간 경과 시점에

7-aminoactinomycin D (7-AAD)를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 세포 생존율 분석을 위해 전혈 100 μ L에 7-AAD 시약 20 μ L를 넣고 잘 혼합한 후 실온에서 20분간 반응시켰다. 이후 적혈구 용혈을 시행하고 1차례 세척 후 1시간 이내에 분석하였다. 호중구는 과립구의 대부분을 구성하는 점에 착안하여 먼저 SSC와 CD45 분획으로 과립구 구역을 구분하고 과립구 중 7-AAD 발현이 낮은 과립구의 분율을 호중구의 생존율로 규정하였다.

4. 통계 분석

통계 분석은 MedCalc ver. 19.6 (MedCalc Software, Mariakerke, Belgium)을 이용하였으며, 자료는 중앙값(범위)으로 나타내었다. 비교 검체 간 PNH 클론 백분율의 상관성은 Pearson correlation analysis를 이용하여 분석하였으며, Bland-Altman plot으로 평균 차이 및 95% 일치한계를 구하였다. 연속변수의 비교는 t-test 및 Wilcoxon test를 이용하였으며, P값이 0.05 미만인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 판정하였다.

결과

1 검체의 PNH 클론

당일 분석 EDTA 전혈 검체를 기준으로 환자군에서 GPI (glycosylphosphatidylinositol)-anchored protein의 발현이 감소된 비정상 PNH 클론의 중앙값(범위)은 적혈구에서 56.05% (0.09%–99.46%), 호중구에서 89.70% (0.14%–99.71%)였다. 환자군 중 14명은 적혈구 및 호중구 모두에서 1% 이상의 PNH 클론을 가졌으나, 6명은 적혈구 혹은 호중구(2명은 적혈구, 4명은 호중구) 중 하나에서만 1% 이상의 PNH 클론이 검출되었다. 비환자군에서 PNH 클론의 중앙값(범위)은 적혈구에서 0.00% (0.00%–0.70%), 호중구에서 0.05% (0.03%–0.32%)로, 비환자군 중 3명(20.0%)만이 0.1% 이상의 측정값을 보였으며 대부분은 0.1% 미만이었다.

2. 당일 분석 EDTA 전혈 검체와 72시간 보관 전혈 검체 간 PNH 클론의 백분율 비교

환자군 및 비환자군의 72시간 동안 보관된 전혈 검체에서 적혈구 및 호중구의 PNH 클론 백분율은 Table 1과 같다. 환자군에서 적혈구의 PNH 클론 백분율 중앙값은 실온보관 EDTA 전혈 검체를 제외하고 모든 보관 검체에서 상승되는 경향성을, 호중구의 PNH 클론 백분율은 감소하는 경향성을 보였으나 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 실온보관된 EDTA 전혈 검체의 적혈구 및 호중구 중 PNH 클론 백분율 중앙값은 당일 분석결과보다 유익하게 낮았다($P < 0.001$). 비환자군에서 PNH 클론의 백분율은 모든

Table 1. PNH clones (%) of RBCs and neutrophils of the patients and controls at 5 different storage conditions

Variable	Fresh EDTA WB	EDTA WB (4°C, 72 hr)	EDTA WB (RT, 72 hr)	10% PM70 WB (RT, 72 hr)	Cyto-chex WB (RT, 72 hr)	TransFix WB (RT, 72 hr)
Patients (N=20)						
RBCs	56.05 (0.09–99.46)	57.08 (0.07–99.33)	53.18 (0.07–90.38)	56.52 (0.08–99.29)	58.28 (0.08–99.38)	56.94 (0.07–99.39)
P-value		0.067	<0.001	0.062	0.135	0.940
WBCs	89.70 (0.14–99.71)	88.68 (0.14–98.44)	86.25 (0.10–95.11)	88.55 (0.15–99.54)	88.37 (0.18–99.17)	88.84 (0.19–97.44)
P-value		0.079	<0.001	0.108	0.058	0.062
Controls (N=15)						
RBCs	0.00 (0.00–0.70)	0.00 (0.00–0.80)	0.00 (0.00–0.65)	0.00 (0.00–0.79)	0.00 (0.00–0.77)	0.00 (0.00–0.81)
P-value		0.151	0.078	0.194	0.151	0.151
Neutrophils	0.05 (0.03–0.32)	0.05 (0.03–0.42)	0.04 (0.00–0.25)	0.05 (0.03–0.46)	0.06 (0.00–0.40)	0.07 (0.03–0.49)
P-value		0.249	0.022	0.117	0.330	0.131

Values are presented as median % (range %).

Abbreviations: PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; RBCs, red blood cells; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; WB, whole blood; RT, room temperature; WBCs, white blood cells.

Table 2. Correlation of PNH clones (%) between unstored whole blood specimen and stored (4°C) whole blood specimens in the patient group

Fresh EDTA WB vs.	RBCs			Neutrophils		
	Slope (95% CI)	Intercept (95% CI)	r	Slope (95% CI)	Intercept (95% CI)	r
EDTA WB (4°C, 72 hr)	1.0253 (0.9947 to 1.0558)	0.3895 (–1.1812 to 1.9601)	0.9982	0.9745 (0.9548 to 0.9941)	–0.0104 (–1.4852 to 1.4644)	0.9992
EDTA WB (RT, 72 hr)	0.9399 (0.9079 to 0.9718)	0.4698 (–1.1729 to 2.1125)	0.9977	0.9517 (0.9375 to 0.9658)	–0.0185 (–1.0794 to 1.0423)	0.9996
10% PM70 WB (RT, 72 hr)	1.018 (0.9981 to 1.0384)	0.2292 (–0.8072 to 1.2655)	0.9986	0.9930 (0.9853 to 1.0007)	–0.1603 (–0.7408 to 0.4202)	0.9995
Cyto-chex WB (RT, 72 hr)	1.0235 (0.9946 to 1.0524)	0.0829 (–1.4049 to 1.5706)	0.9973	0.9818 (0.9574 to 1.0062)	0.0939 (–1.7385 to 1.9262)	0.9984
TransFix WB (RT, 72 hr)	1.0197 (0.9890 to 1.0503)	0.1845 (–1.3940 to 1.7631)	0.9971	0.9814 (0.9566 to 1.0061)	0.2315 (–1.6263 to 2.0894)	0.9987

Abbreviations: PNH, paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; RBCs, red blood cells; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; WB, whole blood; CI, confidence interval; RT, room temperature.

Fig. 1. (A–H) Comparison of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) clone (%) in red blood cells (RBCs) and granulocytes between fresh specimen and 4°C/room temperature (RT) stored specimens. Abbreviations: WB, whole blood; SD, standard deviation.

보관 검체에서 1% 미만으로 안정되게 유지되었다.

환자군에서 당일 분석 EDTA 전혈 검체와 각 보관 전혈 검체 간 PNH 클론 백분율의 상관성을 비교한 결과, 적혈구 및 호중구 모두에서 상관계수는 0.99 이상($P<0.001$)으로 우수한 상관성을 보였다(Table 2).

당일 분석 검체에 대한 각 보관 검체별 적혈구 PNH 클론 백분율의 평균 차이(95% 일치한계)는 냉장보관 EDTA 검체 -0.8 (-4.1 to 2.5), 실온보관 10% PM70 검체 -0.8 (-3.7 to 2.2), 실

온보관 Cyto-Chex 검체 -0.9 (-4.8 to 3.0), 실온보관 TransFix 검체 -0.6 (-4.3 to 3.1)으로 음의 차이를 나타냈으나 유의한 계통적 차이는 없었다.

당일 분석 검체에 대한 각 보관 검체별 호중구 PNH 클론 백분율의 평균 차이(95% 일치한계)는 냉장보관 EDTA 검체 0.9 (-2.6 to 4.3), 실온보관 10% PM70 검체 0.7 (-1.9 to 3.4), 실온보관 Cyto-Chex 검체 0.6 (-3.4 to 4.7), 실온보관 TransFix 검체 0.5 (-3.1 to 4.1)로 양의 차이를 나타냈으나 유의한 계통적 차이는

Fig. 2. (A-E) Comparison of mean fluorescence intensity (MFI) of cell surface markers (CD235a, CD15, CD59, CD24, and FLAER) among fresh (a) and 4°C/room temperature (RT) stored whole blood (WB) specimens (b: ethylenediaminetetraacetic acid [EDTA] WB in 4°C; c: EDTA WB in RT; d: 10% PM70 WB in RT; e: Cyto-Chex WB in RT; f: TransFix WB in RT). In a box-and-whisker plot, the central box represents the values from the lower to upper quartile (25 to 75 percentile). The middle line represents the median. A line extends from the minimum to the maximum value.

없었다. 적혈구 및 호중구에서 PNH 클론 백분율의 최대 차이는 1%–20% 이하 백분율 구간에서 ± 2 이내, 20% 초과 백분율 구간에서 10% 이내였다(Fig. 1).

3. 환자군의 적혈구에서 PNH 클론의 CD59 발현 강도

당일 분석 검체에서 적혈구에 발현되는 CD235a의 MFI는 64.6 (47.9–96.3)이었으나, 실온보관 EDTA 검체의 MFI는 56.1 (39.5–85.3)로 유의하게 감소되었다($P < 0.001$). 냉장보관 EDTA 검체 및 실온보관 10% PM70 검체의 MFI도 각각 60.35 (39.0–93.3), 60.95 (45.5–92.3)로 유의하게 낮았다($P < 0.001$). 또한 실온보관 Cyto-Chex 검체 및 TransFix 검체의 MFI도 각각 56.1 (39.0–85.3), 57.2 (36.7–83.5)로 유의하게 낮았다($P < 0.001$, $P < 0.001$).

적혈구 중 PNH 클론에 속하는 세포에서 발현되는 CD59 형광의 MFI는 당일 분석 검체에서 1.70 (1.13–5.08)이었으며, 실온 및 냉장보관 EDTA 검체, 실온보관 10% PM70 검체의 MFI는 각각 1.68 (1.00–4.69), 1.69 (1.09–4.91), 1.71 (1.01–4.95)로 유의한 차이는 없었다. 또한 실온보관 Cyto-Chex 검체 및 TransFix 검체의 MFI도 각각 1.63 (1.02–4.95), 1.76 (0.94–5.01)으로 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

4. 환자군의 호중구에서 PNH 클론의 CD24 및 FLAER 발현 강도

당일 분석 검체에서 호중구에 발현되는 CD15의 MFI는 109.5 (75.2–147.0)였으나 실온보관 EDTA 검체의 MFI는 93.0 (79.2–125.1)으로 유의하게 낮았다($P < 0.001$). 또한 냉장보관 EDTA 검체, 실온보관 10% PM70 검체, 실온보관 Cyto-Chex 검체, 실온보관 TransFix 검체의 MFI도 각각 94.5 (82.4–133.1), 97.7 (79.0–155.1), 97.9 (76.5–126.1), 94.5 (72.2–169.1)로 유의한 차이를 나타냈다($P = 0.004$, $P = 0.012$, $P = 0.001$, $P = 0.001$).

호중구 중 PNH 클론에 속하는 세포에서 발현되는 CD24 및 FLAER의 MFI는 당일 분석 검체에서 각각 2.80 (1.26–4.04), 0.57 (0.34–2.76)이었다. 실온보관 EDTA 검체는 CD24의 MFI가 2.68 (1.23–3.72), 0.5 (0.3–2.6)로 중앙값은 낮으나 유의한 차이는 없었으며($P = 0.07$), FLAER의 MFI는 0.56 (0.33–3.63)으로 차이가 없었다. 냉장보관 EDTA 검체, 실온보관 10% PM70 검체, 실온보관 Cyto-Chex 검체, 실온보관 TransFix 검체에서 CD24의 MFI는 각각 2.89 (1.18–4.11), 2.88 (1.33–4.68), 2.76 (1.33–3.82), 2.71 (1.43–3.86)로 당일 검체와 보관 검체 간에 유의한 차이는 없었다. 또한 FLAER의 MFI도 각각 0.58 (0.30–2.63), 0.66 (0.34–2.62), 0.52 (0.33–3.63), 0.56 (0.41–2.70)으로 당일 검체와 보관 검체 간에 유의한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 2).

5. CD15 양성 호중구의 분율

당일 검체에서 유핵세포 중 CD15 양성 호중구의 분율은 38.6% $\pm$ 14.8%이었다. 72시간 보관 시점의 냉장보관 EDTA 전혈 검체에서 CD15 양성 호중구의 분율은 39.3% $\pm$ 14.9%로 당일 검체와 비교하여 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 72시간 보관 시점의 실온보관 10% PM70 전혈, Cyto-Chex 전혈, TransFix 전혈 검체에서 CD15 양성 호중구의 분율도 각각 38.6% $\pm$ 14.8%, 39.4% $\pm$ 14.6%, 39.0% $\pm$ 14.6%로 차이를 나타내지 않았다.

6. 호중구의 세포 생존도

72시간 보관 시점의 냉장보관 EDTA 전혈 검체에서 SSC/CD45 gating으로 구분된 호중구 세포의 생존율은 95.8% (92.0%–98.3%)로 양호한 생존율을 유지하였으나, 실온보관 검체에서 호중구 세포의 생존도는 10% PM70 전혈 15.7% (9.8%–21.7%), Cyto-Chex 전혈 8.1% (4.4%–9.3%), TransFix 전혈 8.3% (5.2%–10.2%)로 냉장보관 EDTA 전혈 검체와 비교하여 유의하게 낮았다($P < 0.001$).

고찰

PNH의 진단 및 추적관찰 시 검사법으로 시행되는 유세포 분석법과 관련된 주요 한계점은 검체의 보관 및 운반과정이 지연될 경우 유발될 수 있는 세포표지자의 불안정성이다. 림프구 아형 분석의 경우 미국질병관리예방센터는 EDTA 및 헤파린 전혈 검체에 대한 검사를 72시간 내 시행하도록 가이드라인으로 제시한다[10]. 그러나 백혈구는 시간이 경과하면 scatter와 항원 표현이 변화할 수 있으므로 채취 후 48시간 이상 경과된 검체가 유세포 분석 검사에 적절한지에 대한 의문은 지속적으로 제기되어 왔으며, 이를 보완하기 위해 특수 채혈관을 이용한 전혈 고정법이 소개되었다.

상품화된 특수 채혈관은 Cyto-Chex 및 TransFix 채혈관이 가장 대표적이며 특수 채혈관의 전혈 검체는 림프구의 scatter signal 및 세포표지자의 발현 정도를 7–10일까지 안정되게 유지하였다[5,11]. 반면, 과립구는 림프구와 달리 시간 경과에 따라 SSC 값의 감소가 관찰되었으며, 세포막의 투과도 증가로 형태학적 변화가 나타났다. 그러나 TransFix 전혈 검체에서 CD45 발현을 이용하면 과립구의 적절한 검출은 가능하였고, 이는 과립구 세포의 형태학적 변화가 세포표지자의 발현에 미치는 영향이 크지 않음을 반영하였다[11]. 또한 Cyto-Chex 전혈 검체도 세포표지자의 발현이 비교적 안정되게 유지됨이 보고되었다[12].

이와 같이 세포를 고정하는 상품화된 특수 채혈관은 세포표지자를 분석하는 유세포 분석에서 장점이 있지만 현재 유세포 분석법을 수행하는 국내의 많은 임상검사실의 경우 검사 건수 및 채

혈관의 비용 등을 고려할 때 특수 채혈관 도입은 용이하지 않다. 본 연구에서는 TransFix나 Cyto-Chex 등의 물질 대신 질량이 작은 Ficoll 중합체 PM70을 첨가하여 세포를 고정하는 방법이 세포의 구분 및 표지자 발현의 유지에 적합한지 평가하였으며, 10% PM70 중합체를 이용한 방법이 특수 채혈관과 유사한 세포 고정 효과를 나타냄을 입증하였다.

본 연구에서는 낮은 PNH 클론 백분율(0.1%~1.0%)을 나타낸 검체의 수가 매우 적어 1.0% 이상의 PNH 클론을 나타낸 검체만을 대상으로 보관조건별 PNH 클론 백분율의 변화를 비교하였다. 전혈 검체의 PNH 클론 백분율은 실온보관 EDTA 전혈 검체 외의 다른 보관 검체에서 당일 검체에 비해 중앙값이 적혈구 수에서는 증가하고 호중구에서는 감소하는 경향성을 보였으나 차이가 유의하지 않았으며 검체별 차이가 절대값 기준으로 2 미만이거나 10% 미만이었다. 그러나 실온보관한 EDTA 전혈 검체의 경우 백분율이 적혈구 및 호중구 모두에서 감소하였으며 그 차이가 유의하였다. 실온보관된 EDTA 전혈 검체는 PNH 클론 분석에서 부적합하였으나, 냉장보관할 경우 EDTA 전혈 검체는 72시간 내에서 PNH 클론의 안정적 분석이 적혈구뿐만 아니라 호중구에서도 가능하였다. 이전의 한 국내 연구는 적혈구는 실온보관해도 7일까지 분석이 안정하다고 보고하였으나[3], 본 연구에서는 실온보관은 호중구뿐 아니라 적혈구에서도 PNH 클론의 백분율을 낮추어 PNH 클론 분석 시 EDTA 전혈 검체는 냉장보관하는 것이 추천되었다.

이전 연구에서 호중구의 PNH 클론의 크기는 대상 검체가 2개로 적었지만 냉장보관하면 72시간까지 안정되게 측정된다고 보고하였는데[3], 20명의 환자 검체를 평가한 본 연구에서도 같은 결과를 얻어 PNH 분석 가능 조건은 냉장보관, 72시간까지로 적용할 수 있다고 판단하였다. 실온보관 조건에서는 10% PM70 중합체 및 특수 채혈관을 이용한 세포고정법을 적용한 검체가 PNH 분석에 적절하였으며 10% PM70 중합체 이용이 특수 채혈관의 대안이 될 수 있었다.

세포고정법은 유세포 분석에서 임상 검체를 안정화하는 방법으로 제안되어 왔으며, NEQAS 같은 외부정도관리 프로그램에서 적용되어 왔다[13,14]. 그러나 이전 연구에서 세포고정법은 세포표지자의 MFI를 낮춘다고 보고되었으며 특수 채혈관 검체에서도 일부 백혈구 세포표지자의 MFI는 시간 경과에 따라 감소되었다[4,15,16]. 본 연구에서도 10% PM70 중합체를 첨가한 전혈이나 특수 채혈관의 전혈 검체에서 호중구 표지자인 CD15의 MFI는 시간 경과에 따라 감소하여 EDTA 전혈 검체와 유사하였다. 또한 적혈구 표지자인 CD235a의 MFI도 세포고정법이 적용되더라도 보관 검체에서 감소하였다.

반면, PNH 클론에서 CD59, CD24, FLAER의 MFI는 당일 검체

에 비교해 유의한 차이가 없었는데, 이는 관련 표지자의 발현이 감소된 PNH 클론에서는 MFI 감소의 영향이 결과에 크게 반영되지 않는다고 추측하였다. 그러나 상대적으로 높은 MFI로 발현되는 표지자의 경우 특수 채혈관을 사용하더라도 MFI의 감소는 예방할 수 없다고 생각하였다.

비록 보관 검체에서 호중구의 CD15 발현 강도가 유의한 감소를 보였으나 발현의 감소가 림프구나 단구와 중첩되는 수준은 아니었고 백혈구 중 호중구의 분율은 유의한 변화를 나타내지 않아 충분한 세포를 획득하여 호중구의 PNH 클론을 분석할 수 있었다. 이는 보관 검체에서 특정 세포군의 분율이나 세포 수가 일정 기간 유지되었다는 이전 연구결과와 일치하는 것이었다[11,12]. 호중구 세포의 생존율은 10% PM70 전혈 검체가 특수 채혈관 전혈 검체에 비해 높았지만, 세포고정법을 적용한 검체 모두가 냉장보관 EDTA 전혈에 비해 유의하게 낮아 불량한 세포 생존율을 보였다. 세포고정법을 적용한 검체는 실온보관하더라도 세포 분획과 표지자의 발현 유지를 통해 유세포 분석은 가능하지만 세포의 막 투과성 증가와 변성을 막는 데 한계가 있었다. 비록 10% PM70 전혈 검체가 호중구의 세포막 손상을 줄이는 것으로 보고되었지만[6], 본 연구에서는 저분자량 Ficoll 중합체 PM70을 이용한 세포 생존율의 개선효과가 냉장보관에 비해 불량하여 냉장보관 조건이 호중구의 세포 생존율을 유지하는 데 최적임을 알 수 있었다.

결론적으로, PNH 유세포 분석이 지연되는 경우 전혈 검체를 냉장보관하면 72시간까지 PNH 클론의 안정적인 정량분석이 가능하였다. 실온보관 조건에서 10% PM70을 포함한 검체는 TransFix나 Cyto-Chex 채혈관의 대안이 될 수 있었다. PNH 클론에서 감소되는 세포표지자의 형광 발현의 강도와 호중구의 분율은 모든 보관 조건에서 유지되었다. 호중구의 세포 생존도는 냉장보관 조건에서만 양호하였다.

감사의 글

본 연구는 2019년 대한임상검사정도관리협회의 연구비 지원을 받아 수행되었다.

ORCID

Sewon Yoon	https://orcid.org/0000-0001-6091-3395
Jimyung Kim	https://orcid.org/0000-0003-0530-3425
Seon Young Kim	https://orcid.org/0000-0001-5459-9635
Jinsook Lim	https://orcid.org/0000-0003-2814-3284
Gye Cheol Kwon	https://orcid.org/0000-0002-4886-0590
Sun Hoe Koo	https://orcid.org/0000-0003-3715-7151

REFERENCES

1. Devalet B, Mullier F, Chatelain B, Dogne JM, Chatelain C. Pathophysiology, diagnosis, and treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a review. *Eur J Haematol* 2015;95:190-8.
2. Borowitz MJ, Craig FE, Diguseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, et al. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2010;78:211-30.
3. Lee SH, Bang HI, Shin YJ, Shin WY, Kim J, Park R, et al. Evaluation of time and temperature stability of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells by flow cytometry. *Lab Med Online* 2019;9:57-62.
4. Diks AM, Bonroy C, Teodosio C, Groenland RJ, de Mooij B, de Maertelaere E, et al. Impact of blood storage and sample handling on quality of high dimensional flow cytometric data in multicenter clinical research. *J Immunol Methods* 2019;475:112616.
5. Warrino DE, DeGennaro LJ, Hanson M, Swindells S, Pirruccello SJ, Ryan WL. Stabilization of white blood cells and immunologic markers for extended analysis using flow cytometry. *J Immunol Methods* 2005;305:107-19.
6. Wong KH, Sandlin RD, Carey TR, Miller KL, Shank AT, Oklu R, et al. The role of physical stabilization in whole blood preservation. *Sci Rep* 2016;6:21023.
7. Toth K, Wenby RB, Meiselman HJ. Inhibition of polymer-induced red blood cell aggregation by poloxamer 188. *Biorheology* 2000;37:301-12.
8. Pamphilon D, Selogie E, McKenna D, Cancelas-Peres JA, Szczepiorkowski ZM, Sacher R, et al. Current practices and prospects for standardization of the hematopoietic colony-forming unit assay: a report by the cellular therapy team of the Biomedical Excellence for Safer Transfusion (BEST) Collaborative. *Cytotherapy* 2013;15:255-62.
9. Sutherland DR, Illingworth A, Marinov I, Ortiz F, Andreasen J, Payne D, et al. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 2 - reagent selection and assay optimization for high-sensitivity testing. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94:23-48.
10. Mandy FF, Nicholson JK, McDougal JS; CDC. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep* 2003;52(RR-2):1-13.
11. Canonico B, Zama L, Burattini S, Granger V, Mannello F, Gobbi P, et al. Evaluation of leukocyte stabilization in TransFix-treated blood samples by flow cytometry and transmission electron microscopy. *J Immunol Methods* 2004; 295:67-78.
12. Davis C, Wu X, Li W, Fan H, Reddy M. Stability of immunophenotypic markers in fixed peripheral blood for extended analysis using flow cytometry. *J Immunol Methods* 2011;363:158-65.
13. Jani V, Janossy G, Iqbal A, Mhalu FS, Lyamuya EF, Biberfeld G, et al. Affordable CD4+ T cell counts by flow cytometry. II. The use of fixed whole blood in resource-poor settings. *J Immunol Methods* 2001;257:145-54.
14. Reilly JT, Barnett D. UK NEQAS for leucocyte immunophenotyping: the first 10 years. *J Clin Pathol* 2001;54:508-11.
15. McCarthy DA, Macey MG, Cahill MR, Newland AC. Effect of fixation on quantification of the expression of leucocyte function-associated surface antigens. *Cytometry* 1994;17:39-49.
16. Schumacher A. Effect of ex vivo storage and Cyto-Chex on the expression of P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) on human peripheral leukocytes. *J Immunol Methods* 2007;323:24-30.