

Coulter[®] LH 750[™]에 의한 백혈구 감별계산 및 Suspect Flags의 평가

분당제생병원 진단검사의학과

홍승복 · 최종태 · 이성규 · 김현수

Evaluation of Coulter[®] LH 750[™] on Leukocyte Differential Count and Suspect Flags

Seung-Bok Hong, Jong-Tae Choi, Seong-Kyu Lee, and Hyun-Soo Kim

Department of Laboratory Medicine, Pundang Jesaeng General Hospital, Seongnam 463-774, Korea

Automatic hematology analyzers provide the leukocyte differential count and the useful flags of the various hematological parameters. We compared LH 750 (Beckman Coulter Co., Miami, FL, USA) with manual method on differential leukocyte counts and evaluated the usefulness of the suspect flags, provided by this instrument. The comparison of leukocyte differential counts between two methods showed good correlation coefficient (r), which were 0.95 (neutrophil), 0.92 (lymphocyte), 0.82 (monocyte) and 0.95 (eosinophil). The frequency of the total flags displayed on LH 750 were 15.5%, which included immature granulocyte/left shift 63.5%, nucleated RBC 14.6%, platelet clumps 13.1%, variant lymphocyte 50% and blast 16.6%. This instrument showed higher positive predictive value in the flags such as platelet clumps 68.8%, immature granulocyte/left shift 61.5%, nucleated RBC 27.3%, variant lymphocyte 50% and blast 16.7%. In this study, the leukocyte differential counts of LH 750 showed good correlation with manual method and the suspect flags also showed a good performance for applying the criteria of re-examination in the clinical laboratory.

Key Words : Hematological analyzer, LH 750, Leukocyte differential count, Suspect flags

I. 서 론

오늘날 대부분의 병원에서 일반혈액검사 및 백혈구 감별계산은 혈액 질환을 포함한 모든 환자들의 가장 기본적인 검사로 진단, 치료 및 추적 관찰시 매우 유용하게 이용되고 있다. 백혈구 감별계산은 현재까지 도말표본을 관찰하는 것이 참고방법으로 알려져 있으나 (NCCLS, 1997) 검체 수가 많은 병원에서 모든 검체를 수기법으로 검사하는 데는 시간과 인력이 많이 요구되므로 대부분의 병원에서는 선별검사로 자동혈구분석기를 사용하고 있

며 이 자동혈액분석기의 세포감별기술, definitive flags와 suspect flags 결과로 검사의 효율성 증가 및 인건비, 검사 단가의 절감 등을 얻게 되었다. 그러나 자동혈구분석기에 의한 백혈구 감별계산이 완벽하게 수기법을 대체할 수는 없으며(Hyun 등, 1991), 한 검사실에서 다양한 방법의 자동혈구 분석기를 사용할 경우 나타나는 문제점도 보고되었다(Reardon 등, 1987). 결국 자동혈구분석기에 의한 백혈구 감별계산은 수기법에서 필요한 인력 및 시간에 대한 부담을 줄인다는 장점은 있지만 flags의 위 양성 또는 위 음성률이 높을 경우 신뢰도가 떨어져 일일이 확인해야 하므로 검사실 운영에 지장을 초래하게 된다.

최근에 분당제생병원 진단검사의학과에서는 LH 750[™] 자동혈액분석기(Beckman Coulter Co., Miami, FL, USA)를 사용하게 되어 저자들은 이 기기의 백혈구 감별능 및

교신저자 : 홍승복, (우)463-774 경기도 성남시 분당구 서현동 255-2, 분당제생병원 진단검사의학과
Tel : 031-779-0254, 011-9321-7056
E-mail : sbhong8646@hanmail.net

suspect flags의 유용성을 보기위해 수기법과 비교 평가하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

분당제생병원 진단검사의학과에 2005년 3월부터 6월 까지 일반혈액검사 및 백혈구 감별검사가 의뢰된 입원환자 및 외래환자 총 1,144명의 검체를 Coulter® LH 750™으로(이하 LH 750) 검사하여 suspect flags 표시가 1에 이상 나타난 검체를 대상으로 flag의 빈도를 구하였으며, 그 중 검체량이 충분한 117명의 환자 검체를 슬라이드 도말하여 수기법과 비교하였다.

2. 방법

K3 EDTA 진공 채혈관에 채혈한 혈액을 채혈 후 6시간 이내에 LH 750으로 분석하였다. 수기법은 각 검체의 도말표본을 Wright's 염색하여 임상병리사 1인이 각각 200개의 백혈구를 감별 계산하여 %를 구하였으며 슬라이드(이하 동일)에서 보이는 백혈구와 기기에서 측정되는 5-differential 결과를 비교하기 위해서 슬라이드에서 관찰되는 전골수구, 골수구, 후골수구는 호중구에 그리고 비정형 림프구는 림프구에 포함시켜 계산하였다.

Flags의 분석은 전체 대상 1,144명 중 flags가 나타난 177명의 검체로 빈도를 구하였으며, 이 중 검체 량이 충분한 117명의 검체에 대해 도말표본을 만들어 flags를 분석하였다. 117명의 검체 중 두 종류 이상의 flags가 표시된 경우가 있어 총 flags 수는 141개였다. LH 750에서 나타나는 flags 중 IMM NE 1(10% 미만의 band형 호중구가 나타나는 경우), IMM NE 2(10% 이상의 band형 호중구, 전골수구, 골수구, 후골수구가 나타나는 경우), variant LY (비정형 림프구가 나타나는 경우), 유핵 적혈구 및 혈소판응집 등을 참고방법인 수기법과 비교하여 양성 예측도, 음성 예측도, 민감도 및 특이도는 다음과 같이 계산하였으며 양성기준은 Buttarello 등이 설정한 기준(Buttarello 등, 1997)을 변형하여 임상적인 중요도에 따라 설정하였다(Table 1).

Table 1. Criteria for the definition of the morphologic flags by LH750 and reference methods.

Coulter LH 750™	Reference Limit (%)
Blasts	Blasts > 0
Immature granulocytes	Immature granulocytes Metamyelocytes >1 or Myelocytes > 1
Left shift	Bands > 5
Atypical lymphocytes	Atypical lymphocytes > 1.5
Normoblasts or platelet clump	Normoblasts > 0.5

$$\begin{aligned} \text{양성 예측도} &= [\text{진 양성}/(\text{진 양성} + \text{위 양성})] \times 100 \\ \text{음성 예측도} &= [\text{진 음성}/(\text{진 음성} + \text{위 음성})] \times 100 \\ \text{예민도 (\%)} &= [\text{진 양성}/(\text{진 양성} + \text{위 음성})] \times 100 \\ \text{특이도 (\%)} &= [\text{진 음성}/(\text{진 음성} + \text{위 양성})] \times 100 \\ \text{유효도 (\%)} &= [(\text{진 양성} + \text{진 음성})/(\text{진 양성} + \text{위 양성} \\ &+ \text{위 음성} + \text{진 음성})] \times 100 \end{aligned}$$

3. 통계처리

통계분석은 Excel 2000 statistics package(Microsoft Co., Redmond, WA, USA)를 이용하여 직선성 평가는 일반선형모델로 회귀분석을 실시하였고, 상관성 검증은 회귀분석을 통하여 Pearson 상관계수(r)를 구하였다. Paired t-test를 이용하여 두 방법간 차이의 p-value를 구하였으며 p<0.01를 유의 수준으로 하였다.

III. 결 과

1. LH 750과 수기법에 의한 백혈구 감별계산의 비교

LH 750에서 flags가 나타난 117명의 환자검체를 비교한 결과 수기법에 의한 감별계산과의 상관계수(r)는 호중구 0.952, 림프구 0.918, 단구 0.821, 호산구 0.948 및 호염기구 0.265 이었다(Fig. 1). Paired t-test 결과 호중구는 수기법에서, 단구는 기기 산출법의 비율이 유의하게 높았다. 림프구, 호산구 및 호염기구의 비율은 두 방법 간에 차이가 없었다(Table 2).

Table 2. Leukocyte differential count in LH 750 and manual methods (n=117)

	Mean \pm SD		p-value
	LH 750	manual	
Neutrophil	70.0 \pm 19.3	72.0 \pm 18.6	<0.001
Lymphocyte	19.4 \pm 14.2	18.9 \pm 14.2	0.45
Monocyte	8.1 \pm 6.6	6.2 \pm 6.3	<0.001
Eosinophil	2.2 \pm 5.1	2.2 \pm 5.4	0.99
Basophil	0.4 \pm 0.4	0.4 \pm 0.7	0.57

2. Suspect flags의 분석

1) Flags의 빈도

입원환자 및 외래환자 1,144명의 검체에서 백혈구의 suspect flags가 하나라도 보인 경우는 177예(15.5%)이었다. 각각의 suspect flags 빈도는 미성숙과립구/좌방이동 (IMM NE 1, 2)이 가장 많은 63.5%였고, 유핵 적혈구 14.6%, 혈소판 응집 13.1%, 비정형 림프구 4.4%, 골수아구 4.4% 순이었다.

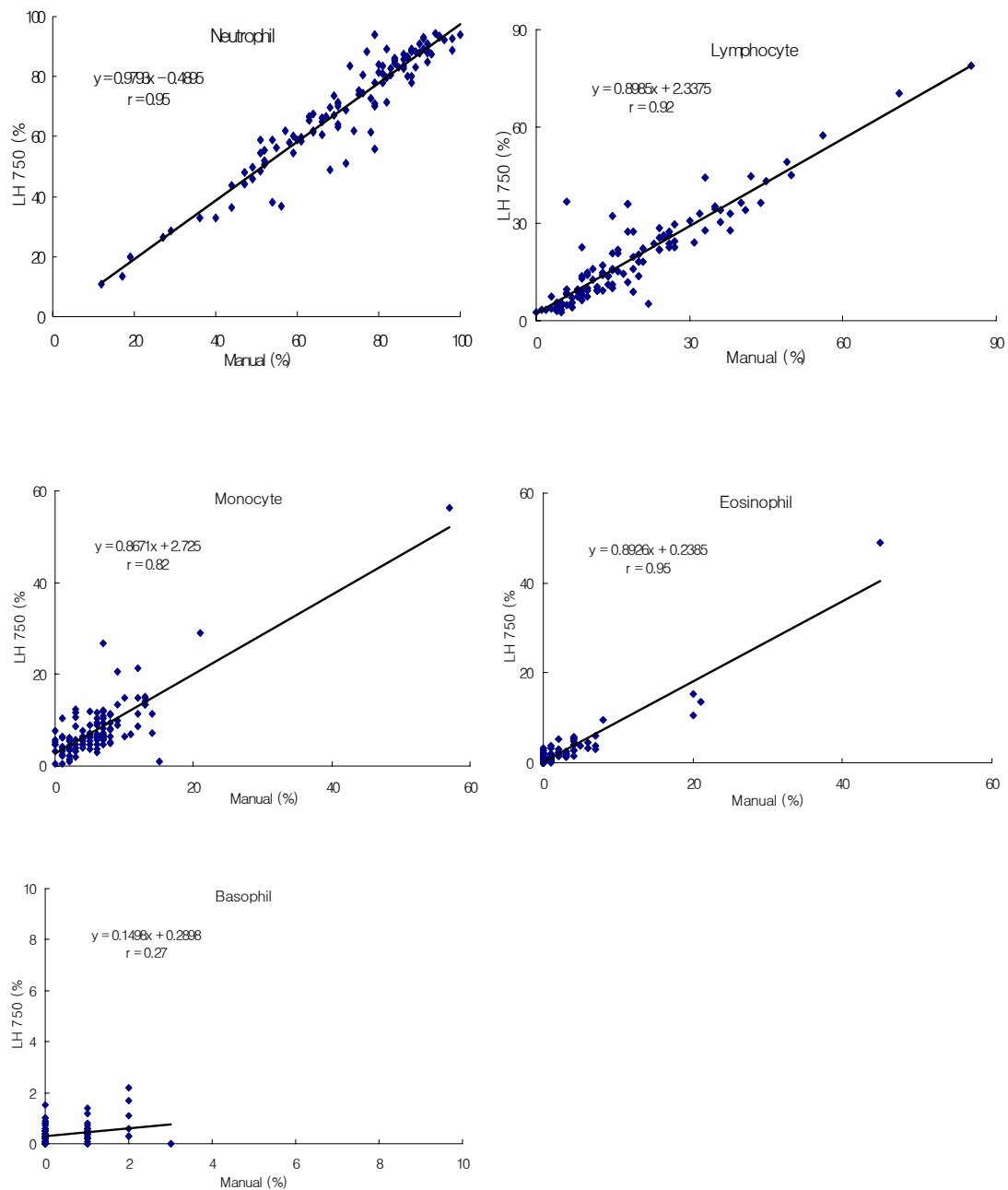


Fig. 1. Comparison study LH 750 with manual method on leukocyte differential counts.

Table 3. Analysis of suspect flags presented by LH 750 automatic hematology analyzer (n=137)

Analysis	IMM NE 1 or NE 2*	NRBC	PLT clump	Variant Lymphocyte	Blast
True positive	56	6	11	3	1
True negative	17	94	97	110	111
False positive	35	16	5	3	5
False negative	9	1	4	1	0
PPV	61.5%	27.3%	68.8%	50.0%	16.7%
NPV	65.3%	98.9%	96.0%	99.0%	100%
Sensitivity	86.2%	85.7%	73.3%	75.0%	100%
Specificity	32.7%	85.5%	95.1%	97.3%	95.7%
Efficiency	62.4%	85.5%	92.3%	96.6%	95.7%

* Immature granulocyte or shift to the left.

Abbreviations: NRBC, nucleated red blood cells; PLT, platelet; PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value.

2) Flags의 효율성

기기에 표시된 flags 141건을 대상으로 말초혈액도말 표본과 비교하여 양성예측도, 음성예측도 및 민감도 특이도 효율성 등을 구하였는데, 141개의 flags에 대해 수기법의 감별계산 결과와 비교한 결과 77개(54.6%)의 flags는 이에 해당되는 세포가 실제로 기준치(Table 1) 이상으로 관찰된 진 양성 이었는데 항목별로는 미성숙 과립구/좌방이동 91개중 56예(61.5%), 유핵 적혈구 22개중 6예(27.2%), 혈소판 응집 16개중 11예(68.7%), 비정형 림프구 6개중 3예(50%), 골수아구 6예 중 1예(16.6%)가 속하였다. 나머지 flags 64에는 현미경 감별계산 결과 각 flag에 해당하는 세포비율이 기준치 이하였거나 발견되지 않은 위양성이었는데, 이중 미성숙 과립구/좌방이동 35예(38.5%), 유핵 적혈구 16예(72.8%), 혈소판 응집 5예(31.3%), 골수아구 5예(83.4%), 비정형 림프구 3예(50%)이었다. 반면에 현미경 감별계산 결과 비정상 백혈구의 비율이 기준치 이상으로 증가되었으나 이에 해당하는 flags가 표시되지 않은 위음성의 경우는 15예이었다(Table 3). 141 flags를 대상으로 구한 양성 예측도를 보면 미성숙 과립구/좌방이동 61.5%, 유핵 적혈구 27.3%, 혈소판 응집 68.8%, 비정형 림프구 50% 그리고 골수아구 16.7% 이었다. 그 외 각 항목별 민감도, 특이도 및 음성예측도는 Table 3과 같다.

IV. 고 찰

본 연구의 목적은 본원에서 사용하고 있는 자동혈구분석기 LH 750의 백혈구 감별 능을 수기법과 비교하여 평가하고 이 기기에 나타나는 flags의 유용성을 평가하여 검사에 인력적, 시간적으로 많은 부분을 차지하는 백혈구 감별계산의 수기법을 효율적으로 운영하는 지침을 마련하고자 하는 것이었다.

LH 750 자동혈구분석기는 백혈구 감별계수를 위해 백혈구를 체내 원상태(near-native state)와 가깝게 유지하여 각각의 용적(volume), 전도도(conductivity), 광산란(light scatter)을 측정하는 VCS 기술을 기본으로 도입된 'Intellikinetics Technology'와 직선 gating 방식이 아닌 3-dimensional gating system, 곡선 분획 gating 방식인 'AccuGate Technology'를 이용하여 서로 겹쳐진 세포군집, 비정상 세포에 대해서도 정확한 분리계수가 가능하도록 하였다. 특히 'AccuFlex'기술은 각 검사실의 특성에 맞게 예민도를 기기에 설정할 수 있는 프로그램으로 재검율을 최대한 줄일 수 있도록 하였다. 또한 측정모드 변화나 추가시약 없이도 유핵 적혈구의 계산이 일반혈액검사(complete blood cell count, CBC)와 백혈구 감별 검사와 동시에 가능하고 이에 따른 백혈구 수의 보정도 자동으로 이루어져 검사실에서 별도로 백혈구 수를 교정해야하는 수작업을 경감시켜 업무의 효율성을 증가시킬 수 있다.

본원 검사실에 2005년 3월부터 6월까지 의뢰된 일반혈액검사 및 백혈구 감별검사 1,144 검체를 LH 750으로 검사하여 그중, suspect flags를 1에 이상 보인 117건을 대상으로 수기법에 의한 백혈구 감별계산을 실시하여 LH 750의 결과와 비교한 결과 호중구, 림프구 및 호산구의 상관계수(r)는 0.918 이상으로 양호하였으나 단구는 0.821로 낮은 편 이었고 호염기구 경우는 0.265로 매우 낮았다. 이는 다른 기종의 평가에 대한 문헌 보고의 결과와 유사하였다(정 등, 1995; 박 등, 1998; 채 등, 2000; 이 등, 2004). 본 연구에서 단구는 LH 750에서 측정할 때 보다 수기법에서 통계적으로 낮은 결과를 보였는데, 이는 단구의 경우 도말할 때 단구가 가장자리에 위치하는 경향이 있기 때문에 이상 구역(ideal zone)을 관찰하는 수기법에서는 약간 낮은 결과를 보인 것으로 생각된다. 실제로 단세포항체를 붙여 유세포 분석을 하면 자동분석기의 결과가 더 정확한 값을 보인다고 알려져 있다(채 등, 2000). 호염기구는 말초혈액 내 낮은 빈도로 존재하기 때문에 다른 보고자들과 마찬가지로 낮은 상관관계를 보였다(정 등, 1995; 박 등, 1998; 채 등, 2000; 이 등, 2004). 이는 수기법의 경우 200개의 백혈구를 세는 동안 호염기구가 관찰되지 않으면 0%로 계수하기 때문에 0.1% 까지 계산하는 자동분석기에 의한 결과와 차이가 보였다고 생각된다.

Suspect flags 중 가장 많은 빈도를 보인 것은 미성숙 과립구 및 좌방이동 flag로 전체 flags 중 63.5%를 차지하였다. 따라서 미성숙 과립구 및 좌방이동에 대한 flag의 정확성이 검사실 결과의 성적 및 업무의 양을 결정하는데 매우 큰 영향을 미칠 것으로 생각된다. 본 연구에서 이 flag의 양성 예측도는 61.5%로 기존에 보고(송 등, 2002)된 GEN-S(38%), NE-8000(54%) 및 SE-9000(25.4%)보다 높아 선별검사의 검토항목으로 고려해도 좋을 것으로 보인다. 두번째로 빈도가 많은 flag는 유핵 적혈구(14.6%)이었는데, 유핵 적혈구 수를 계수 하는 것은 정확한 백혈구 수를 계산하는 것 뿐만 아니라 혈액질환의 원인을 밝히는 데 매우 중요하다(Chin-Yee 등, 2002). 대부분의 자동화 기기에서 유핵 적혈구의 검출은 저항법(impedance blood cell counter)을 이용하였는데 이는 작은 유핵 적혈구를 측정하지 못하는 단점이 있다(Chin-Yee 등, 2002). 최근에 몇몇 기기들은 핵을 염색하여 유핵 적혈구를 측정하는 원리를 이용하기도 한다. 그러나 이들 기기도 백혈구가 깨지기 쉬운 상태(오래된 검체나 만성 림프구성 백혈병)에서는 백혈구를 유핵 적혈구로 과도하게 측정하는 단점이 있다고 알려져 있다(Chin-Yee 등,

2002). LH 750은 전기저항 뿐만 아니라 용적의 차이, 전도성 그리고 광산란(light-scatter) 정보를 종합하여 "signature position"으로 명명된 컴퓨터 알고리즘에 의해 유핵 적혈구를 검출함으로써 더 정확한 결과를 보인다고 한다. 또한 유핵 적혈구를 검출하는 것에 그치지 않고 백혈구 수에서 측정된 유핵 적혈구의 수를 뺀 값을 제시함으로써 검사실에서 수기로 백혈구를 교정하는 일을 줄일 수 있게 되었다(Chin-Yee 등, 2002). 실제로 Chin-Yee 등(2002)은 LH 750과 유세포 분석기를 이용한 유핵 적혈구의 비교에서 LH 750에서 위양성률과 위음성률이 3.0%와 6.0%라 보고하였다. 그러나 본 연구에서는 위양성률이 14.5%, 위음성률이 14.3%로 Chin-Yee 등(2002)의 연구결과와 차이를 보였는데, 이는 검사 대상군의 차이도 있겠으나 수기법에 의한 검사의 경우 유세포 분석기에 비하여 측정 세포수가 적어(현미경으로 관찰하는 영역이 제한되어 있음으로써) 기기의 결과가 위 양성으로 계산되었기 때문으로 생각 된다. 유핵 적혈구의 flag를 수기법과 비교한 기존의 보고(송 등, 2002)에 의하면 GEN-S의 경우 양성 예측도가 6%이었고, NE-8000의 경우 22%, SE-9000의 경우 58.6%으로 다양하게 보고되었는데, 이는 유핵 적혈구의 flag를 수기법으로 확인할 경우 슬라이드의 좀 더 많은 부분에 대한 관찰이 필요한 것으로 보여진다.

세번째로 많은 빈도를 보인 것은 혈소판 응집으로 13.1%였다. 혈소판 응집에 의한 위혈소판감소증(pseudo-thrombocytopenia)의 감별은 혈액학 검사실에서 매우 중요한 부분을 차지한다. 그 이유는 잘못 보고된 혈소판 감소로 인해 수술이나 여러 가지 임상술기가 지연 될 수 있으며 불필요하게 혈소판 제제가 환자에게 수혈될 수도 있기 때문이다(Keeney 등, 2001). 본 연구에서는 혈소판 응집의 flag에 대한 양성 예측도가 68.8%로 본 연구 항목 중 가장 우수한 성적을 보였다. 전 등(1998)은 GEN-S에서 혈소판 응집에 대한 양성 예측도가 80%로 각 suspect flags 중 가장 우수한 성적을 보였다고 하였다. LH 750은 GEN-S보다 한 단계 업그레이드 된 장비로 양성 예측도가 약간 낮은 것은 각 검사실 별로 수기법의 경우 혈소판 응집을 판단하는 기준에 차이가 있을 수 있기 때문으로 생각된다. 비정형 림프구 및 골수아구에 대한 flag는 각각 4.4%로 가장 빈도가 적었는데, 이들의 양성 예측도는 각각 50%와 16.7%로 낮았다. 그러나 이들 flag의 경우 양성 검체수가 너무 적어 정확한 결과를 반영할 수 없을 것으로 생각된다. 실제로 송 등(2002)의 경우 비정형 림프구에 대한 GEN-S와 NE-8000의 양성 예측도가 각각 100%

와 0% 이었는데 이는 진양성(true positive) 검체가 1개와 0개로 양성 검체수가 적어서 정확한 결과를 반영하지 못함을 보고하였다. 그러나 비정형 림프구 및 골수아구에 대한 flag의 경우 전체 빈도가 작고 위 양성율이 각각 2.25%와 3.67%로 낮아 검사실에서 수기법으로 재검하여야 하는 대상에 포함시키는 것이 바람직할 것이다.

결론적으로 LH 750은 수기법과 비교한 백혈구 감별계산에서 우수한 상관성을 보였으며, 제시된 suspect flags도 기존의 GEN-S보다 개선된 결과를 보였다. 따라서 백혈구 감별계산과 이들 suspect flags를 검사실 전산화와 연결하여 재검토의 기준으로 이용한다면 인력과 시간을 절감할 수 있으며 검사결과의 신뢰성을 높일 수 있을 것이라 생각된다.

V. 결 론

Coulter® LH 750™을 이용한 백혈구 감별계산은 수기법과 비교시 우수한 상관성을 보여 신뢰할만 하였다. Suspect flags 중 혈소판 응집의 신뢰성이 가장 높았으며 미성숙과립구 및 좌방이동에 대한 flag도 신뢰할만한 수준이었다. 유핵 적혈구, 비정형 림프구 및 골수아구에 대한 flag의 양성 예측도는 위의 두 항목보다 낮았으나 GEN-S에서의 결과보다 개선되었다. 그리고 비정형 림프구와 골수아구의 경우 양성 검체수가 적어 정확한 결과를 보이지 못한 것으로 사료되어 향후, 좀 더 많은 검체를 대상으로 재평가해야 할 것으로 생각된다. 이러한 결과를 참고한다면 LH 750에서 suspect flags가 표시되었을 때 말초혈액도말에 의한 수기법으로 재검하는 것을 선별하여 시행하므로써 인력과 시간을 절감할 수 있을 뿐만 아니라 검사결과의 신뢰성을 증진할 수 있을 것으로 사료한다.

참 고 문 헌

1. Buttarello M, Bulian P, Temporin V, Rizzotti P. Sysmex SE-9000 hematology analyzer: performance evaluation on leukocyte differential counts using an NCCLS H20-A protocol. *Am J Clin Pathol* 108 674-686, 1997.

2. Chin-Yee I, Brown W, Johnson K, Keeney M, Steele B, Wolfe N, Kaplan S. Identification and enumeration of nucleated red blood cells on the Coulter LH 750. *Lab Hematol* 8:210-217, 2002.
3. Hyun BH, Gulati G, Ashton JK. Differential leukocyte count: manual or automated, what should it be? *Yonsei Med J* 32:283-291, 1991.
4. Keeney M, Brown W, Yee IC. Platelet counts and flagging rates from the LH 750 hematology analyzer compared with the ICSH/ISLH platelet reference method and the GEN-S Hematology analyzer. *Lab Hematol* 7:204-210, 2001.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference leukocyte differential count (proportional) and evaluation of instrumental method. Approved standard. Wayne: National Committee for Clinical Laboratory Standards. H20-A 1992.
6. Reardon DM, Hutchinson D, Bradey L, Trowbridge EA. Automated haematology: a comparative study of cell counting and sizing using aperture impedance and flow cytometric systems. *Med Lab Sci* 44:320-5, 1987
7. 박지영, 이광희, 이영경, 조현찬. Coulter GEN-S System을 이용한 백혈구 감별계산의 평가. *임상병리와 정도관리* 20:401-405, 1998.
8. 송선미, 이성규, 박규은, 김선희, 오원일. 자동혈구분석기 Beckman Coulter GEN-S의 평가. *대한임상병리학회지* 22:67-74, 2002.
9. 이범희, 변남섭, 지명석, 송순영, 유선우, 박효순. 자동혈구분석기 XE-2100, ADVIA-120와 manual differential count의 상관성 및 morphology flag의 평가. *대한임상검사학회지* 36:144-152, 2004.
10. 전현배, 박지영, 조현찬. Coulter® GEN-S™의 suspect flag의 평가. *대한임상병리학회지* 18(supplement 2):s442, 1998.
11. 정지영, 박찬정, 김백수, 노재면, 고근아, 조현찬. 자동혈구측정기 Technicon H-2에 의한 백혈구 감별계산 및 백혈구 “Morphology flag” 평가. *대한임상병리학회지* 15:537-45, 1995.
12. 채석래, 박장순, 김대철, 김성원, 차영주. Sysmex SE-9000의 morphologic flag 분석 및 재검토조건 설정. *대한임상병리학회지* 20:449-54, 2000.