



발작야간혈색소뇨증에서 GPI 결핍세포 검출을 위한 유세포검사법: 국내 실태조사 및 검사법 지침 제언

Detection of GPI-deficient Cells in Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Patients Using Flow Cytometry: Current Status in Korea and Proposal for Testing Guidelines

김현영¹ · 김민선² · 신새암³ · 안아리⁴ · 박찬정⁵ · 송재우³ · 조덕¹ · 황상미^{6,7} · 김미영⁸

Hyun-Young Kim, M.D.¹, Min-Sun Kim, M.D.², Saeam Shin, M.D.³, Ari Ahn, M.D.⁴, Chan-Jeong Park, M.D.⁵, Jaewoo Song, M.D.³, Duck Cho, M.D.¹, Sang Mee Hwang, M.D.^{6,7}, Miyoung Kim, M.D.⁸

삼성서울병원 진단검사의학과¹, 순천향대학교 의과대학 부속 천안병원 진단검사의학과², 연세대학교 세브란스병원 진단검사의학과³, 서울성모병원 진단검사의학과⁴, GC녹십자의료재단⁵, 서울대학교 의과대학 검사의학교실⁶, 분당서울대학교병원 진단검사의학과⁷, 서울아산병원 진단검사의학과⁸

Department of Laboratory Medicine and Genetics¹, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine², Soonchunhyang University College of Medicine Cheonan Hospital, Cheonan; Department of Laboratory Medicine³, Yonsei University College of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine⁴, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul; Department of Laboratory Medicine⁵, GC Labs, Yongin; Department of Laboratory Medicine⁶, Seoul National University College of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine⁷, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam; Department of Laboratory Medicine⁸, Asan Medical Center, Seoul, Korea

We performed an online survey to investigate the current status of detecting glycosylphosphatidylinositol (GPI)-deficient cells in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) using flow cytometry in Korea. Questionnaires were sent to 29 laboratories performing flow cytometric analyses. The questionnaire included testing procedures, data analysis, reporting, assay validation, and quality control. The results demonstrated these factors varied among laboratories in Korea; thus, we propose a protocol to improve the quality of flow cytometric PNH testing based on international guidelines.

Key Words: Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Flow cytometry, Practice guideline

서론

발작야간혈색소뇨증(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)은 용혈빈혈, 골수부전, 혈전증을 특징으로 하는 드문 후천

적 클론성 조혈모세포 질환이다. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) 부착 단백질인 CD55 (decay accelerating factor)와 CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis)의 부재로 인하여 조절되지 않는 보체계의 활성화가 야기되어 용혈 등의 증상이 나타나며[1], PNH 관련 용혈 예방을 위하여 최근에는 보체계 말단을 표적으로 하는 C5 억제제(예, 에쿨리주맙[eculizumab])가 치료제로 사용되고 있다[2, 3]. PNH의 진단은 GPI 부착 단백질의 결핍을 확인할 수 있는 유세포 검사를 통해 주로 시행되며, PNH 클론의 크기를 확인할 수 있기 때문에 질환의 중증도에 대한 정보도 제공해 준다[4]. 또한 낮은 정도의 PNH 클론은 재생불량빈혈과 골수형성이상증후군과 같은 일차성 골수부전증에서도 관찰되기 때문에 골수부전증의 감별진단에 도움을 주며 이들 질환에서 PNH 클론이 있는 경우 면역억제제에 대한 반응이 좋은 것으로 보고되고 있다[4, 5].

따라서 PNH 클론을 민감하게 확인할 수 있는 유세포검사는 질환의 진단과 치료방침 설정 및 추적관찰에 있어 필수적이며, 이에 대한 최신 지침으로는 2014년 Clinical Laboratory Standards Insti-

Corresponding author: Sang Mee Hwang, M.D., Ph.D.

<https://orcid.org/0000-0003-3390-1932>

Department of Laboratory Medicine, Seoul National University Bundang Hospital and Seoul National University College of Medicine, 82 Gumiro 173 beon-gil, Bundang-gu, Seongnam 13620, Korea
Tel: +82-31-787-7694, Fax: +82-31-787-4015, E-mail: smilemee@snuh.org

Received: July 28, 2023

Revision received: September 14, 2023

Accepted: September 26, 2023

This article is available from <https://www.labmedonline.org>

© 2024, Laboratory Medicine Online

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://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.

tute (CLSI) H52-A2 가이드라인[6] 및 2018년 International Clinical Cytometry Society/European Society for Clinical Cell Analysis (ICCS/ESCCA)에서 발표한 합의 지침이 있다[7]. 하지만 GPI 결핍세포 검출을 위한 유세포검사에 대한 국내 표준안이나 지침 제안은 없는 실정으로, 각 검사실에서 자체적으로 정립되어 있는 방법에 따라 검사가 시행되고 있다. 이에 국내 GPI 결핍세포 검출을 위한 유세포검사의 현황 파악을 위하여 설문조사를 진행하였으며 설문조사 결과를 공유하고 검사법, 성능평가, 결과 보고, 정도관리에 대한 지침을 제안하고자 한다.

재료 및 방법

연구대상자는 대한임상정도관리협회의 유세포 정도관리프로그램에 참여 중인 검사실의 담당전문의로 하였다. 2021년도 7월 30일부터 8월 15일까지 총 29기관의 전문의에게 이메일을 발송하여 온라인 설문조사를 실시하였다.

설문은 총 46문항으로 발작야간혈색소노증 유세포검사 방법, 적혈구 분석, 호중구 분석 문항, 단구 분석, 결과 보고, 정도관리, 검사 평가 관련, 이외 기타 문항으로 구성되었다. 국내 총 29기관 중 16기관에서 발작야간혈색소노증 유세포검사(PNH 검사)에 대한 회신을 주었다.

결 과

총 16 응답기관 중 8기관(50.0%)에서만 PNH 검사를 시행 중이라고 회신하였으며 6기관(37.5%)은 PNH 검사를 시행하지 않으며 시행 예정이 없다고 응답하였고 나머지 2기관(12.5%)에서는 PNH 검사를 현재 시행하지 않으나 시행 계획이 있다고 응답하였다. 시행 예정이 없다고 회신한 기관에서는 적합한 기기를 보유하고 있지 않거나 검사 건수가 미미하여 유지가 어렵다는 의견이 있었다.

PNH 검사를 위한 검체 보관 기간 및 온도, 검사 소요시간, 검사 건수, 사용 장비, 시약 및 기타 항목에 대한 응답 결과는 Supplementary Table 1에 제시하였다.

PNH 검사에서 분석하는 세포계열로 적혈구, 호중구, 단구를 모두 분석하는 기관은 3기관(37.5%)이었으며, 5기관(62.5%)에서는 적혈구, 호중구, 단구 중 일부만 시행하고 있었다.

적혈구 분석에서 분석하는 최소 세포수는 3기관(37.5%)에서는 50,000개, 2기관(25%)에서는 100,000개, 2기관(25%)에서는 500,000개, 1기관(12.5%)은 30,000개로 응답하였다. 적혈구 게이팅(gating)에 사용하는 항체의 경우, 5기관(62.5%)에서는 CD235a-fluorescein isothiocyanate (FITC)를 사용한다고 답하였고 3기관(37.5%)에서는 항체 사용을 하지 않는다고 하였다. 적혈구에서 GPI 연관 구조 검

출을 위해 5기관(62.5%)에서 CD59-phycoerythrin (PE)을 단독으로 사용하고 있었으며 3기관(37.5%)에서 CD55-PE, CD55-FITC, CD59-PE 중 2가지 이상을 사용한다고 답하였다. 적혈구 분석에서 검출한계(limit of detection, LOD) 및 최저정량한계(lower limit of quantitation, LLOQ)가 모두 설정되어 있는 기관은 4기관(50%)이었다. LLOQ의 경우 3기관(37.5%)에서 0.05%로 응답하였다. 적혈구 결과 보고와 관련하여 5기관(62.5%)에서는 type II, III PNH 클론을 포함하여 전체 PNH 클론을 보고한다고 하였고, 3기관(37.5%)에서는 type II 및 III PNH 크기를 각각 보고한다고 하였다.

호중구 분석에서 분석하는 최소 세포수의 경우 50,000개로 응답한 경우가 3기관(37.5%), 20,000개 2기관(25%), 10,000개 2기관(25%), 기타로 전체 백혈구 수를 500,000개 분석한다는 기관이 1기관(12.5%) 있었다. 호중구 분석 시 게이팅에 CD45, CD15를 모두 사용하는 경우가 6기관(75%) 있었고, 나머지에서는 둘 중 한가지만 사용하고 있었다. GPI 연관 구조 검출을 위해 8기관에서 모두 CD24 및 fluorescein-labeled proaerolysin (FLAER)를 사용하고 있었다. 호중구 분석에서 LOD 및 LLOQ의 경우 5기관(62.5%)에서 둘 다 설정하였다고 응답하였고, LLOQ만 설정된 경우도 2기관(25%) 있었다. 호중구 분석에서 LLOQ는 3기관(37.5%)은 0.01%, 2기관(25%)은 0.1%로 응답하였다. 호중구 분석 후 결과 보고는 6기관(75%)에서 전체 PNH 클론 크기를 보고한다고 하였고, 4기관(50%)에서 type II 및 III PNH 클론 크기를 각각 보고한다고 하였다.

단구분석을 하는 3기관 중 2기관(66.7%)에서는 10,000개의 세포수 분석을 하고 있다고 응답하였다. 단구 분석 시 게이팅에 사용되는 항체는 CD64, CD45 두 가지 모두 사용하는 기관은 3기관 중 2기관(67%)이었으며, 나머지 기관은 둘 중 한 가지만 사용한다고 답하였다. GPI 연관 구조 검출에 사용되는 항체는 CD14, FLAER로 3기관에서 모두 응답하였다. 단구 분석 시 LOD 및 LLOQ를 모두 설정한 기관은 2기관(66.7%)이었다. 단구 분석의 LOD의 경우 1기관에서만 0.5%라고 응답하였다. 단구 분석 결과 보고 시에 전체 PNH 클론 크기만 보고하는 기관이 2기관(67%), 나머지 1기관(33%)에서는 type II 및 III도 함께 보고한다고 응답하였다.

분석 시 사용하는 그래프의 종류는 8기관 모두 로그(log) forward scatter (FS)-side scatter (SS) 그래프를 사용한다고 응답하였으며 이 중 6기관에서 FL1/FL2-logFS를 같이 사용한다고 응답하였고 1기관에서 Time-logSS, log FS-SS, FL1/FL2 log FS를 모두 사용한다고 응답하였다. 결과지에는 검사결과 외에 LOD를 모든 기관에서 보고한다고 하였고, 검사법 및 사용항체, 임상적 해석은 6기관(75%)에서 보고한다고 하였다. LOD 미만인 경우, 6기관(75%)에서 이에 대한 내용을 기술한다고 응답하였다.

PNH 검사에 대한 성능평가를 시행하였다고 응답한 기관은 7기관(87.5%)이었다. LOD를 평가한 기관이 6기관으로 가장 많았고 그

다음으로 LLOQ를 평가한 기관이 4기관, 정확도를 평가한 기관이 3기관, 보고가능범위를 평가한 기관이 3기관 있었으며, 평가 방법 및 평가 검체는 기관별로 상이한 것으로 보였다.

내부정도관리는 8개의 모든 기관(100%)에서 시행한다고 응답하였고 정상 검체를 사용한다는 기관이 7기관(87.5%), 환자 검체를 사용하는 기관이 2기관(25%) 있었다. 내부정도관리는 매 환자 검사 시 시행이 3기관(37.5%), 6개월마다 시행한다고 응답한 기관이 3기관(37.5%), 매달 시행은 2기관(25%)이었다. PNH 검사에서 대조군을 사용한다고 응답한 기관 중 6기관(75%)에서 정상 검체를 사용한다고 응답하였으며 각각 2기관(25%)에서 내부대조(립프구)군 및 염색되지 않은 적혈구를 사용한다고 응답하였다. 대조군을 사용하지 않는 기관은 1기관(12.5%) 있었다. PNH 숙련도 검사로 외부정도관리 프로그램에 참가한다고 응답한 기관은 6기관(75%)이었으며 모두 미국 병리학회(College of American Pathologists, CAP) 정도관리 프로그램에 참여하고 있었다. 이외에 3기관에서 검사실 간 비교를 시행하고 있었다.

지침 제언

발작야간헐색소뇨증의 진단을 위해서는 GPI 결핍세포를 검출하는 유세포검사가 필수적이다. 저자들은 발작야간헐색소뇨증의 진단을 위한 유세포검사의 국내현황 조사를 통해 16기관의 회신을 받았고 실제 시행하는 8기관의 응답 결과를 통해 검사법, 성능평가, 정도관리 등이 다양하게 이뤄지고 있음을 확인하였다. 이에 저자들은 PNH 검사에 대한 국내지침을 제안하고자 한다. 발작야간헐색소뇨증 검사에서 권장되는 검체는 말초혈액이며[1, 2], 골수 흡인액의 경우, 미성숙 단핵 골수구계 세포가 CD14를 포함한 일부 GPI 부착 단백을 매우 소량 발현하는 등 세포 분화와 연관된 변화 때문에 해석이 어렵기 때문이다[8, 9].

1. 검사 및 분석 단계

검체 채취 시 가장 권장되는 항응고제는 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)이며, 헤파린과 acid-citrate dextrose (ACD)도

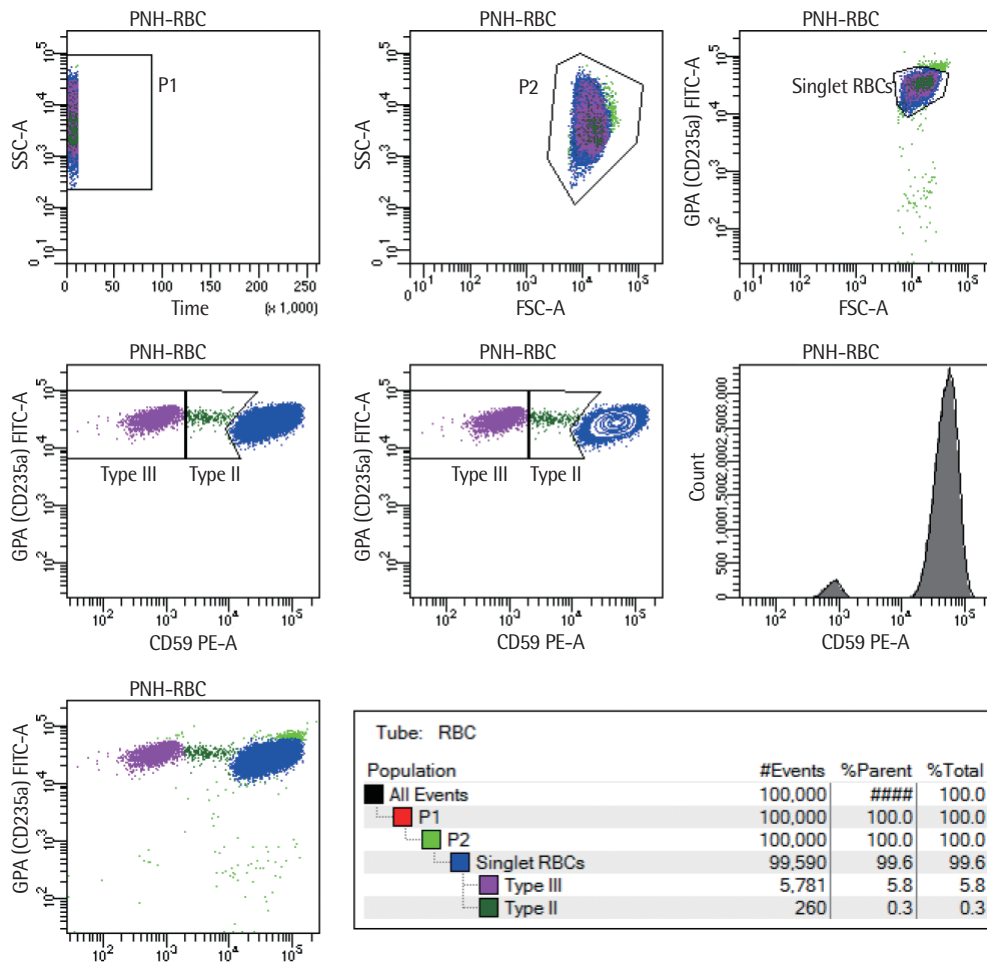


Fig. 1. Gating strategy for red blood cell analysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH).

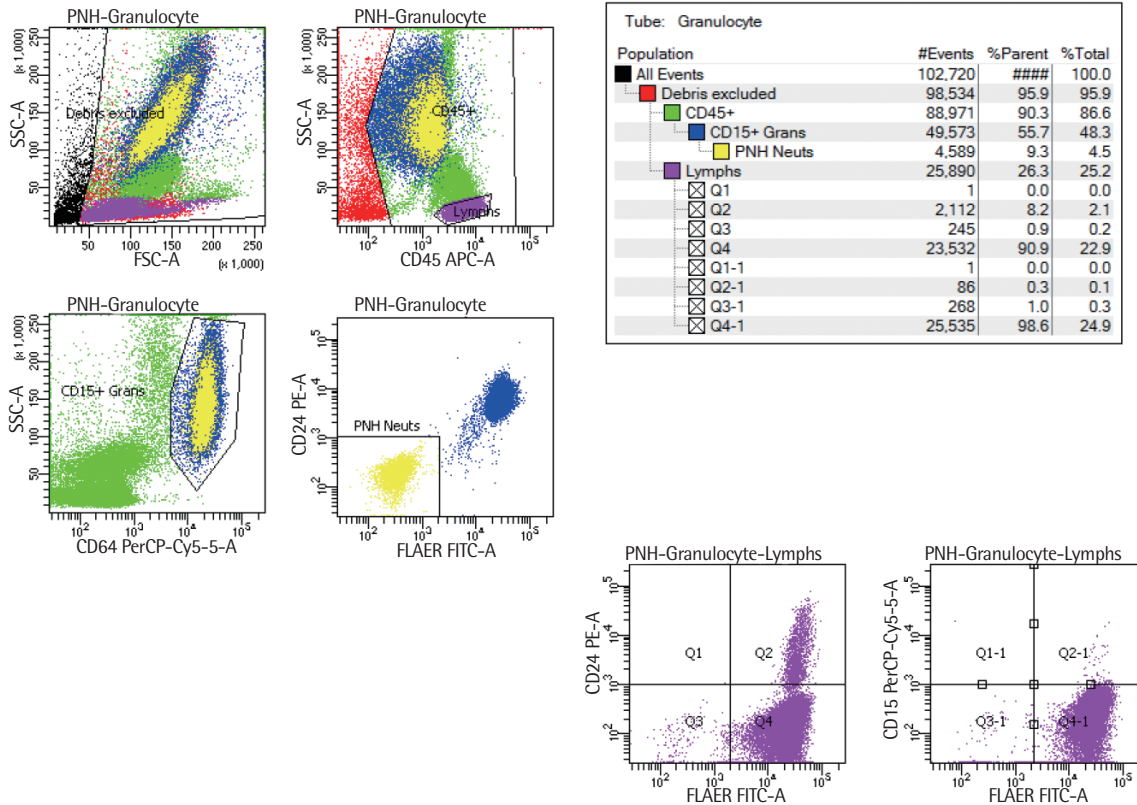


Fig. 2. Gating strategy for neutrophil analysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH).

사용 가능하다[6, 8, 9]. 검체 채취 후 6시간까지는 상온(18-22°C)에 보관할 수 있으나, 검사가 더 지연될 경우 냉장(2-6°C) 보관하는 것이 권장된다[6]. 적혈구의 경우 검체 채취 후 7일까지 분석을 수행할 수 있으나 가급적 48시간 이내에 분석이 권장되며, 백혈구의 경우 시간이 지남에 따라 산란도나 항원 발현의 변화에 의하여 결과 해석이 어렵기 때문에 24-48시간 이내에 분석하는 것이 권장된다[9].

또한 분석 세포로 적혈구를 이용하는 경우 수혈 혹은 용혈로 인하여 위음성 및 PNH 클론을 과소평가할 수 있기 때문에 적혈구, 호중구, 단구를 모두 분석하는 것이 권장되며, 각 세포 계열별 분석 지침은 다음과 같다.

적혈구의 경우, LLOQ 0.01%를 목표로 하여 PNH 적혈구를 검출 하려면 대부분 100,000개의 CD235a⁺ 적혈구를 분석하면 충분하다. 하지만 첫 100,000 event에서 1% 미만의 CD59-/CD235a⁺ 양성인 PNH 적혈구가 검출되면 검출 한계 기준에 따라 더 많은 적혈구를 측정해야 한다. CD235a-FITC로 적혈구를 게이팅하고, CD59-PE를 적혈구 분석에 사용한다. CD235a-PE의 경우, 적혈구 응집이 관찰되는 경우가 많아 FITC가 권장된다[8]. 적혈구의 경우 CD235a⁻ 적혈구는 없기에 항체양에 따라 형광강도, RBC 응집정도로 판정하여 적정(titration)한다. CD59의 경우, PNH type III 검체가 있다면 추가로 검증해 볼 수 있다. CD15, CD64, CD24, CD14, CD157의

경우, 림프구를 내부 음성대조물질로 사용할 수 있다. 역시 ICCS/ESCCA 2018년 가이드라인을 참고할 수 있으며[8], 본 지침에서는 Fig. 1-3에 포함되어 있다. 적혈구의 경우, 광산란(light scatter)은 logarithmic mode로 FS, SS를 모두 사용한다. CD235a-FITC vs. FS로 singlet RBC 게이팅하고 bivariate CD59 vs. CD235a 점도표(dot plot) 및 밀도표(density plot), CD59에 대한 단일 히스토그램이 권장된다. 호중구의 경우, LLOQ를 0.1% 이하로 하려면 50,000개 이상의 CD15⁺⁺ 호중구의 획득이 필요하며, LLOQ를 0.01%까지 하기 위해서는 500,000개 이상의 호중구를 획득해야 한다. 다만, 호중구 감소증으로 CD15⁺⁺ 호중구 수가 적게 측정되었다면 LLOQ, LOD가 변경되었으며 LOD 미만의 minor PNH 클론이 있을 수 있다고 기술해야 한다. 호중구의 경우 FLAER 및 CD24 또는 FLAER 및 CD157을 사용하고 단구의 경우 FLAER 및 CD14 또는 CD157을 권장한다. 검증된 항체를 사용하는 것이 중요하며 대개는 내부 대조군으로 림프구나 다른 종류의 세포와 구분이 1 log 이상 차이 나는 항체를 사용하는 것이 좋다. 적혈구, 호중구, 단구 모두 권장될 클론의 항체를 선정하여 적정 후 적정량을 사용하고 소량의 항체를 사용하기에 각테일로 사용할 것을 권장한다. 적절한 결과가 나온 항체의 클론 및 형광 조합에 대해서는 ICCS/ESCCA 2018년 가이드라인을 참고할 수 있다[8]. FLAER의 경우 국내에 아직 체외진단용으로

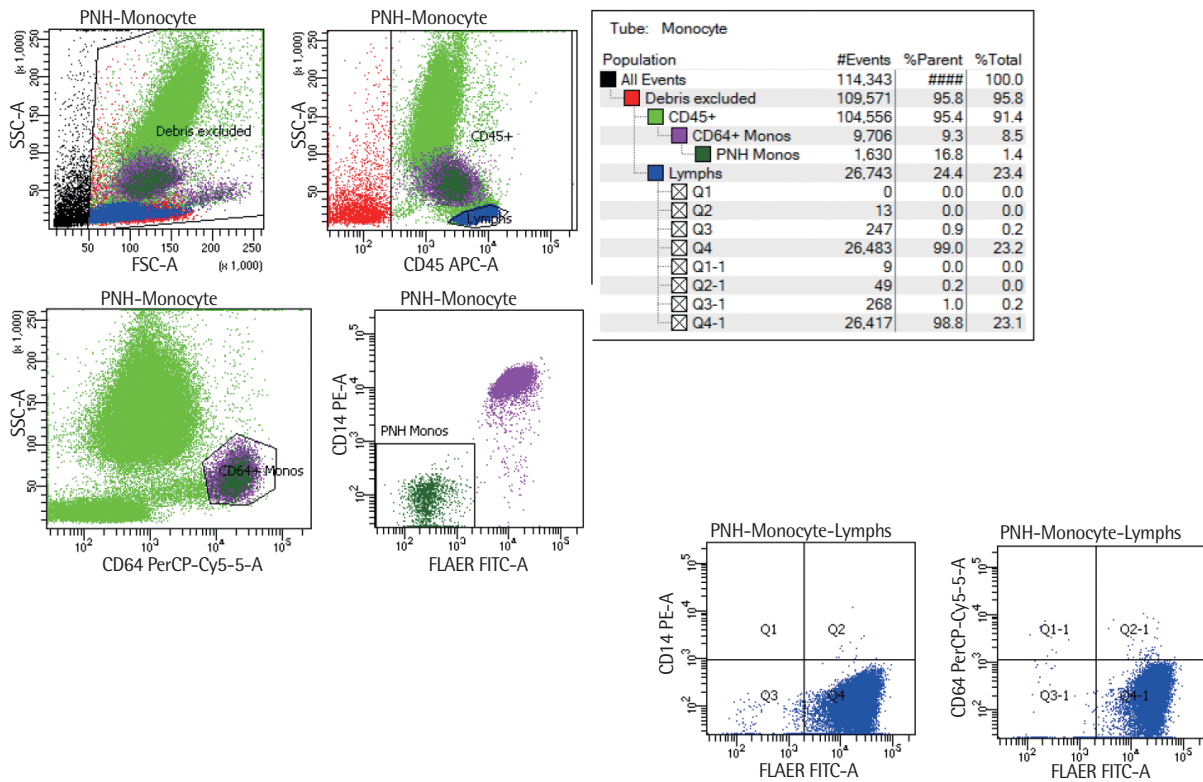


Fig. 3. Gating strategy for monocyte analysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH).

등록된 시약이 없어 신규 도입 시 고려가 필요하다. 분석 시에는 time parameter로 유체공학계(fluidics)를 모니터링하는 것이 권장된다. 백혈구의 경우, CD45 항체를 게이팅에 사용하고 2개의 GPI-linked 구조를 분석하는 항체를 포함해야 한다. CD45와 SS로 시작하여 Boolean 게이팅으로 시간과 “not debris”인 부분으로 CD45+ 세포를 게이팅한다. FLAER/CD24/CD14 단일 튜브를 사용하는 경우에는 CD45+인 세포에 대해 CD15 vs. SS로 CD15+인 호중구를 게이팅 한 후, FLAER/CD24 plot에서 FLAER/CD24-인 부분이 PNH 호중구이다. 단구의 경우, 10,000개의 단구를 측정하여 LLOQ 0.5%로 권장하고 있다. CD45+인 세포에 대해 CD64 vs. SS에서 CD64+인 단구를 게이팅 한 후, FLAER/CD14 plot에서 FLAER/CD14- 부분이 PNH 단구이다. 다만, 일부 골수형성이상증후군에서 활성화된 호중구가 CD64를 발현하는 경우가 있으므로 주의가 필요하다.

2. 성능평가

적혈구 및 백혈구에서 PNH 클론 유무 및 클론의 크기에 대한 정성 및 준정량 결과를 보고하며, 정확도, 분석특이도, 분석민감도, 정밀도, 직선성, 잔효(carryover), 측정/보고가능범위, 참고범위 항목에 대한 평가가 권고된다[10]. 검증은 PNH 양성 및 음성 검체를 이용하여 시행되며, PNH 질환의 희소성 및 검체의 제한된 안정

성으로 인해 PNH 양성과 음성 검체를 섞어 다양한 레벨의 PNH 평가 검체를 준비할 수도 있다.

- 1) 정확도: 표준물질이 없기 때문에 외부 정도관리물질을 이용하거나 검사실 간 비교평가를 통해 검증할 수 있다. 검사실 간 비교의 경우 20개의 검체를 측정해서 확인하거나 검체수가 적은 경우 3회 반복측정해서 확인할 수 있다. 또한 기존에 PNH로 진단된 환자의 검체를 이용하여 평가할 수도 있다.
- 2) 분석특이도: LOD와 LLOQ 근처의 PNH 양성, 음성 검체를 이용하며, 분석특이도에 대한 허용기준은 결과의 중요성을 고려하여 100%가 권장된다.
- 3) 분석민감도: 1% 미만의 빈도로 발생하는 rare event를 측정하는 PNH 검사에서는 LOB, LOD, LLOQ를 모두 평가할 것이 권고된다. 일반적으로 PNH 클론은 정상인에서는 음성이기 때문에, 정상인의 검체를 이용하여 LOB 및 LOD 평가를 시행할 수 있다. LOB 및 LOD는 다음의 공식으로 계산될 수 있으며, 이상적으로는 10개의 검체를 이용하는 것이 권장된다: LOB = mean of blank + 1.645 standard deviation (SD); LOD = mean of blank + 3 SD. LLOQ는 허용 가능한 정확도 및 정밀도를 만족하면서 측정할 수 있는 가장 낮은 값으로, LOB 및 LOD에 근접한 값을 갖는 검체를 분석함으로써 평가할 수 있다. 최소 5레벨의

검체를 3-5회 반복 측정하여 평가하며 일반적으로 20-35%의 변이계수(coefficient of variation, CV)가 허용된다.

- 4) 정밀도: 분석 내 정밀도는 다양한 레벨의 PNH 양성 검체와 적어도 1개의 PNH 음성 검체를 포함하여 3-5개의 검체를 이용하여 시행한다. 각 검체는 단일 분석적 실행(analytical run)에서 3회 반복 측정하며, 평균, 표준편차, 변이계수를 구하여 정밀도를 평가한다. 분석 간 정밀도는 검체의 안정성을 고려하여 외부 정도관리물질을 이용하여 시행할 수 있으며, 또는 같은 날 별도의 장비에서 분석하여 평가할 수도 있다. 2-3개의 검체를 최소 4번의 분석적 실행에서 3회 반복 측정하여 평가한다. PNH 검사의 분석 간 변이계수는 대부분 10% 미만이며 LLOQ 근처의 검체에 대해서는 높은 변이계수를 허용할 수 있다.
- 5) 직선성: 정확한 의미의 직선성 검증은 PNH 검사와 같은 준정량 검사에는 적용할 수 없다. 희석 검체를 직선성 평가에 사용할 수는 있으나 검체 희석 시의 피펫팅 에러 때문에 허용기준을 적용하기는 어렵다. 하지만 장비의 직선성은 검증되어야 한다.
- 6) 잔효: PNH 양성 검체 검사 후 버퍼 검체의 검사를 시행하여 잔효를 평가한다.
- 7) 참고범위: PNH 검사법 검증 시 사용된 PNH 음성 검체의 결과를 이용하여 참고범위를 설정할 수 있다. 일부 인증기관에서는 25개의 정상 검체를 매년 평가할 것을 권고하고 있으며, 이를 이용하여 LOB 및 LOD의 재평가도 할 수 있다.

3. 결과 보고

PNH 검사가 음성이나 양성이라고 보고하는 것은 해석의 혼란을 줄 수 있어 피해야 하고, PNH 클론이 있는지 없는지를 분명하게 명시하도록 한다[9, 11].

적혈구에 존재하는 PNH 클론의 크기는 전체 PNH 클론의 크기와 type II, type III PNH 군집의 백분율을 모두 보고한다[11]. Type I 적혈구는 CD59를 밝게 발현하고 약 120일의 수명을 가진 정상 적혈구이다. Type III PNH 적혈구는 CD59가 완전히 결핍되어 있으며, 이는 보체 매개 용해(complement mediated lysis)로부터 보호되지 않아 수명이 10-15일로 짧다. Type II PNH 적혈구는 CD59가 부분 결핍되어 보체 매개 용해로부터 부분적인 보호를 받는다. Type II PNH 적혈구와 type III PNH 적혈구의 임상적 중요성이 잘 확립되어 있으므로, 이들을 별도로 보고하고, 총 PNH 적혈구 클론으로도 보고하는 것이 권장된다.

단구의 PNH 클론은 호중구의 PNH 클론보다 크기가 큰 경우가 많아서, 호중구 PNH 클론만 보고하면 백혈구에서 PNH 클론의 크기를 과소평가할 수 있다[11]. 호중구와 단구도 type II 군집이 있을 수 있지만 이들의 임상적, 생물학적 중요성은 현재로서는 확립되지 않았다. 따라서 호중구와 단구에서는 총 PNH 클론 크기만 보

고하는 것이 권장된다[11].

PNH 클론 크기가 다양하기 때문에 다음과 같은 해석적 용어를 사용하는 것이 권장된다. 1%를 초과하는 PNH 군집의 경우, “PNH 클론”으로 명명하고 0.1-1% 사이의 PNH 군집은 “PNH 세포의 작은 군집(minor population)” 혹은 “작은(minor) PNH 클론”으로 지칭하며 0.1% 미만의 PNH 군집의 경우, “GPI 결핍이 있는 드문 세포들” 또는 “PNH 표현형을 보이는 드문 세포들”이라고 지칭하는 것이 좋다. 결과보고서에는 PNH 검사에 사용된 모든 GPI 결합 항체와 게이팅 항체를 기재한다[6, 11]. 적혈구와 호중구 검사의 LLOQ를 명시하고, 적혈구 검사에서 권장되는 LLOQ는 100,000개의 적혈구를 게이팅 하는 경우 0.05% 이상, 호중구 검사에서 권장되는 LLOQ는 50,000개의 호중구를 게이팅 하는 경우 0.1% 이상이라고 기재한다[11]. 결과와 함께 PNH 및 재생불량빈혈이나 골수형성이상증후군과 같은 관련 질병의 추적검사 빈도에 대한 권고사항을 포함할 수도 있다[11].

4. 정도관리

1) 내부정도관리

현재는 PNH검사 결과의 정확성을 확인하는데 사용할 수 있는 인정된 상업적 표준물질이 없기 때문에 장비의 성능 검정은 PNH 검사의 질보증에 필수적이다. 음성 대조군은 비특이적 시약 결합 및 세포의 자가 형광의 결과로 예상되는 배경 값으로, PNH 검사에 대한 음성 대조군은 검사에서 측정하고자 하는 표적이 결여된 세포 집단을 이용하는 것이다(예, 호중구에서 CD24의 측정을 위한 분석의 경우, 음성 대조군은 림프구). 반면, 양성 대조군은 시약의 성능, 준비 방법 및 염색 절차를 확인하고, 장비의 질관리를 수행하는데 이용되며 건강한 공여자의 혈액은 양성 시약 대조군 및 양성 과정 대조군이 될 수 있다.

2) 외부정도관리

영국 국립 외부정도관리 평가원(United Kingdom National External Quality Assessment Service, UK NEQAS), 미국 병리학회 및 왕립 호주 품질 보증 프로그램 협회(Royal College of Pathologists of Australasia Quality Assurance Programs, RCPA QAP)에서 숙련도 검사 및 외부 품질 관리 프로그램을 통해 안정화된 PNH 혈액을 제공한다. 또한 PNH 양성 환자의 검사실 간 비교(PNH 클론을 가지고 있는 것으로 확인된 검체를 공유할 수 있는 다른 검사실과 결과를 비교)를 통해 외부정도관리를 시행할 수 있다. 안정화된 전혈 대조군을 사용할 수 있을 때까지는, 검사실에서 양성 및 음성 검체를 정해진 간격으로 다른 검사실과 공유하는 것이 좋다. 또한 일정 간격 동안 양성 및 음성 표적 세포 집단이 발견되지 않으면, 정상 혈액 검체로 PNH 검사에 사용하는 항체/각테일의 반응성이

검사실에서 정한 참고 범위 내에 들어오는지 검증해야 한다.

결론

발작야간혈색소뇨증에서 GPI 결핍세포 검출을 위한 유세포검사의 국내 현황을 파악하기 위하여 설문조사를 실시하였고 검사 단계, 결과 보고, 정도관리, 분석능 평가 등 검사실마다 차이가 있음을 확인하였다. PNH 검사의 국제 가이드라인도 있으나 국내 현실을 반영하여 국내의 유세포분석 전문가들이 PNH 검사의 질을 높이기 위해 임상검사실에서 필수로 숙지할 내용을 추려 검사 단계, 결과 분석, 결과 보고, 정도관리 및 분석능 평가에 대한 지침을 제안하였으며 검사를 시행하고 있거나 앞으로 개설할 검사실 업무에 도움이 되길 바란다.

요약

발작야간혈색소뇨증의 진단을 위한 glycosyl phosphatidylinositol (GPI) 결핍세포 검출을 위한 유세포검사의 국내 현황 파악을 위해 온라인 설문조사가 진행되었다. 설문조사는 유세포분석을 시행하는 29개의 검사실로 보내졌다. 설문은 각 검사실에서의 PNH 검사 방법, 결과 분석, 결과 보고, 검사 평가 및 정도관리에 관한 문항으로 이루어졌다. GPI 결핍세포를 검출하는 PNH 검사는 국내 검사실에서 다양하게 이뤄지고 있어 국내 유세포전문가들이 지침을 제안하였다. 이 지침을 통해 한국에서의 PNH 검사의 질을 향상시킬 수 있길 기대한다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

감사의 글

대한진단검사의학회의 연구비(정도관리위원회 진단혈액 학술연구과제) 지원에 감사드립니다. 또한 설문에 참여해 주신 16기관의 선생님들께 감사드립니다.

REFERENCES

1. Brodsky RA. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2014;124:2804-11.
2. Choi CW, Jang JH, Kim JS, Jo DY, Lee JH, Kim SH, et al. Efficacy of eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients with or without aplastic anemia: prospective study of a Korean PNH cohort. *Blood Res* 2017;52:207-11.
3. Brodsky RA. How I treat paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2021;137:1304-9.
4. DeZern AE and Borowitz MJ. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 1 - clinical utility. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94:16-22.
5. Fattizzo B, Ireland R, Dunlop A, Yallop D, Kassam S, Large J, et al. Clinical and prognostic significance of small paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia. *Leukemia* 2021;35:3223-31.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Red Blood Cell Diagnostic Testing Using Flow Cytometry; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document H52-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014.
7. Richards SJ. Introduction to ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94:12-3.
8. Sutherland DR, Illingworth A, Marinov I, Ortiz F, Andreassen 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.
9. Borowitz MJ, Craig FE, Digiosepe 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.
10. Oldaker T, Whitby L, Saber M, Holden J, Wallace PK, Litwin V. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 4 - assay validation and quality assurance. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94:67-81.
11. Illingworth A, Marinov I, Sutherland DR, Wagner-Ballon O, DelVecchio L. ICCS/ESCCA consensus guidelines to detect GPI-deficient cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) and related disorders part 3 - data analysis, reporting and case studies. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94:49-66.