

Flow-Assisted Differential Diagnosis of Hemolytic Anemia with Spherocytosis: A Case Report

Dong Il Won, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Kyungpook National University Hospital, Daegu, Korea

In patients with hemolytic anemia associated with spherocytosis, differential diagnosis has to be made whether the hemolysis is immune-mediated or of non-immune origin. We report a case of hereditary spherocytosis in a 12-yr-old male child, in whom flow-assisted diagnosis was made. In this case, diagnosis was not determined because routine laboratory workups for hereditary spherocytosis yielded discrepant results: positive osmotic fragility test, positive direct antiglobulin test, and normal result in the red cell membrane protein sodium dodecyl succinimide polyacrylamide gel electrophoresis. However, all flow cytometry-based tests, such as osmotic fragility, direct antiglobulin, and eosin 5-maleimide binding test, yielded results compatible with hereditary spherocytosis. Additionally, in family study, the results of eosin 5-maleimide binding test suggested his disease being hereditary. In cases with diagnostic difficulties, flow cytometry may be used as an alternative tool, which can provide additional information in the differential diagnosis of hemolytic anemia with spherocytosis. (*Korean J Lab Med* 2010;30:339-44)

Key Words : Hemolytic anemia, Hereditary spherocytosis, Flow cytometry

서 론

빈혈 환자에서 용혈 소견이 있고 말초혈액도말에서 구형적혈구가 보이면 우선 유전구형적혈구증(hereditary spherocytosis, HS)을 진단으로 고려하게 된다. HS 적혈구는 적혈구막의 골격이 취약해서 비장관(splenic cord)을 통과할 때마다 지질이 유실되고 표면/용적 비가 감소하여 결국 구형으로 변형된다. 그러나, 다른 기전으로 적혈구막 유실이 일어나는 질환들 즉, 면역매개용혈(immune-mediated hemolysis, 주로 비장의 그물 내피계통이 항체가 부착된 적혈구막을 포식)이나 glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) 결핍, 불안정 혈색소(적혈구내 혈색소가 변성, 침전되어 비장에서 적혈구막과 함께 제거) 등에서도 구형적혈구가 증가하므로 HS와 감별진단이 필요

하다[1].

구형적혈구가 보이는 용혈빈혈의 감별진단을 위한 검사에는 삼투압취약성(osmotic fragility, OF)검사(OF test), 적혈구에 부착된 항체를 검출하는 항글로불린검사와 sodium dodecyl succinimide polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 이용한 적혈구막 단백질 분석 등이 있다. 그러나 이들은 위음성이나 위양성이 비교적 흔하다. 즉, OF test는 HS 환자의 10-20%에서 위음성을[2], 면역매개용혈에서 위양성을 보일 수 있다. 직접항글로불린검사(direct antiglobulin test, DAT)는 일반적으로 입원환자의 DAT 양성 판정예의 1-15%에서 면역매개용혈의 증거를 찾을 수 없으므로 위양성인 것으로 알려져 있다[3]. SDS-PAGE도 매우 경한 HS나 무증상 보인자에서 민감도가 낮아서, HS의 약 20-30%에서 정상 소견을 보이는 경우가 있다[4].

본 증례는 말초혈액도말에서 구형적혈구가 매우 증가하여 우선 HS가 의심되었으나, 면역매개용혈과의 감별이 요구되었던 경우이다. 용혈빈혈의 원인을 감별하기 위하여, 유세포분석법(flow cytometry, FC)을 이용한 eosin 5-maleimide (EMA) binding test [5-8] 등의 추가 검사가 도움이 되었으므로 이를 보고하고자 한다.

Received : March 12, 2010

Manuscript No : KJLM10-045

Revision received : June 4, 2010

Accepted : July 22, 2010

Corresponding author : Dong Il Won, M.D.

Department of Laboratory Medicine, Kyungpook National University Hospital, 50 Samduk-dong 2-ga, Jung-gu, Daegu 700-721, Korea
Tel : +82-53-420-5291, Fax : +82-53-426-3367
E-mail : wondi@knu.ac.kr

ISSN 1598-6535 © The Korean Society for Laboratory Medicine

증 례

현재 12세 남자 환아로, 5세 때 수두를 앓은 이후 4개월간 창백함과 황달성 공막이 지속되어 개인의를 방문 후 검사상 빈혈이 심하여 본원으로 전원되었다. 환자의 부모나 형은 건강상 특별한 사항은 없었다.

신체검사상 빈혈성 결막과 황달성 공막이 있었고, 간종대나 비종대는 없었다.

당시 시행한 검사실 소견으로, 일반혈액검사에서(참고범위), 백혈구 수 $8,320/\mu\text{L}$, 혈색소 6.9 g/dL , 적혈구용적률 19.6% , MCV 96.7 fL , MCHC 35.5% ($32.0\text{--}36.0$), RDW 19.7% ($11.5\text{--}14.5$), 혈소판 수 $360,000/\mu\text{L}$, 망상적혈구 수 32.1% 이었다. 생화학검사에서, AST 45 IU/L , ALT 11 IU/L , 젖산 탈수소효소 $1,350\text{ IU/L}$ ($240\text{--}480$), 총 빌리루빈 3.4 mg/dL , 직접 빌리루빈 1.0 mg/dL , haptoglobin $<13\text{ mg/dL}$ ($30\text{--}200$), hemopexin 6 mg/dL ($50\text{--}110$)이었다.

이 검사 결과들에 기초하여 HS 증증도를 분류하면, 환자는 중증(혈색소 $<8.0\text{ mg/dL}$, 망상적혈구 수 $>10\%$, 빌리루빈 $>3.0\text{ mg/dL}$)에 속하였다.

최근의 말초혈액도말 소견은 Fig. 1과 같다.

항글로불린검사는 DiaMed-ID® (DiaMed, Murten, Switzerland)를 사용한 원주응집법으로 시행하였는데, 7년간 추적한 결과를 Table 1에 다른 검사와 함께 요약하였다. 초기 일시적으로 DAT 양성이었다가 이후 계속 음성이었다. 첫 입원 시(5세)

항핵항체와 한랭응집소 검사는 음성이었다. 혈청 보체가(CH50) 39.7 U/mL ($23\text{--}46$), 보체3(C3) 71.6 mg/dL ($90\text{--}180$), 보체4(C4) 20.1 mg/dL ($10\text{--}40$)이었다.

OF test는 Fig. 2와 같이 채혈 즉시와 24시간 배양 후 혈액 모두 건강인 대조보다 증가된 OF를 보였다.

적혈구막 단백질 SDS-PAGE에서 정상 패턴을 보였고, 적혈구 효소검사(G6PD, pyruvate kinase 포함 20종, 분광광도계법)에서 효소 결핍의 증거는 없었다.

첫 입원시 용혈빈혈의 원인이 면역매개성임을 시사하는 일부 소견이 있으므로, 환아에게 스테로이드 요법(prednisolone 2

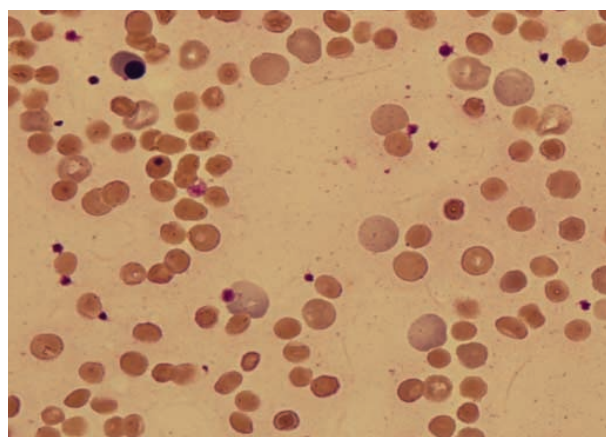


Fig. 1. Peripheral blood smear at 12 yr of age. Microspherocytes accounts for ~50% of red cells. A few nucleated red cells and many polychromatic macrocytes are seen (Wright-Giemsa stain, $\times 200$).

Table 1. Consecutive results of antiglobulin tests and other associated tests in this case

Age (yr)	Antiglobulin test					Indirect	Hemoglobin (g/dL)	Reticulo- cytes (%)	Spherocytes in PB smear	Bilirubin (mg/dL)
	Direct									
	Polyspecific	IgG	IgM	IgA	C3d					
5 293/365	-	-	-	-	-	-	6.9	32.1	++	3.4
5 301/365	-					-	10.1	7.1	+	0.9
6 31/365	+	+	-	+	-	-	6.0	57.4	+++	3.8
6 42/365	-	-	-	+	-	-	10.9	16.0	++	2.5
6 44/365	-					-	7.8	44.5		1.7
6 126/365	-					-	8.2	25.3		4.1
6 214/365	-					-	5.3	42.8	+++	2.5
10 44/365	-					-	10.4	16.2		2.5
10 50/365	-					-	8.9	31.0	+++	4.9
10 191/365	-					-	9.7	22.5	+++	3.9
10 295/365	-					-	12.7	13.7	+++	2.5
10 347/365	-					-	8.6	29.9	+++	2.5
11 261/365	-					-	9.2	13.0	+++	2.5
12 47/365	-					-	9.2	22.3	+++	2.5
12 48/365	-					-	9.4	24.8	+++	4.1

Abbreviations: PB smear, peripheral blood smear; +, slight; ++, moderate; +++, severe.

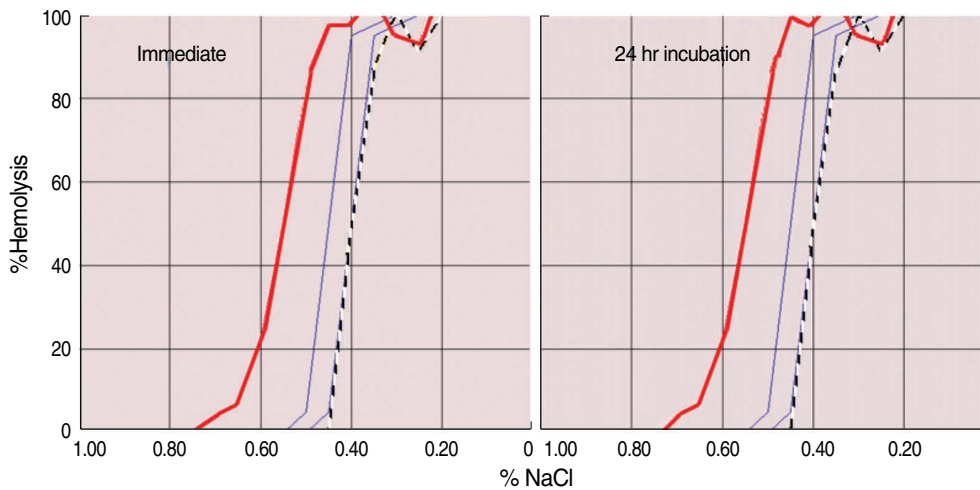


Fig. 2. Osmotic fragility test at 10 yr of age. The patient (thick lines) showed increased osmotic fragility as compared with a healthy control (dashed lines) in both immediate and 24 hr-incubated samples. Reference ranges are indicated in thin lines. The initial osmotic fragility test performed at 6 yr of age had also showed same patterns.

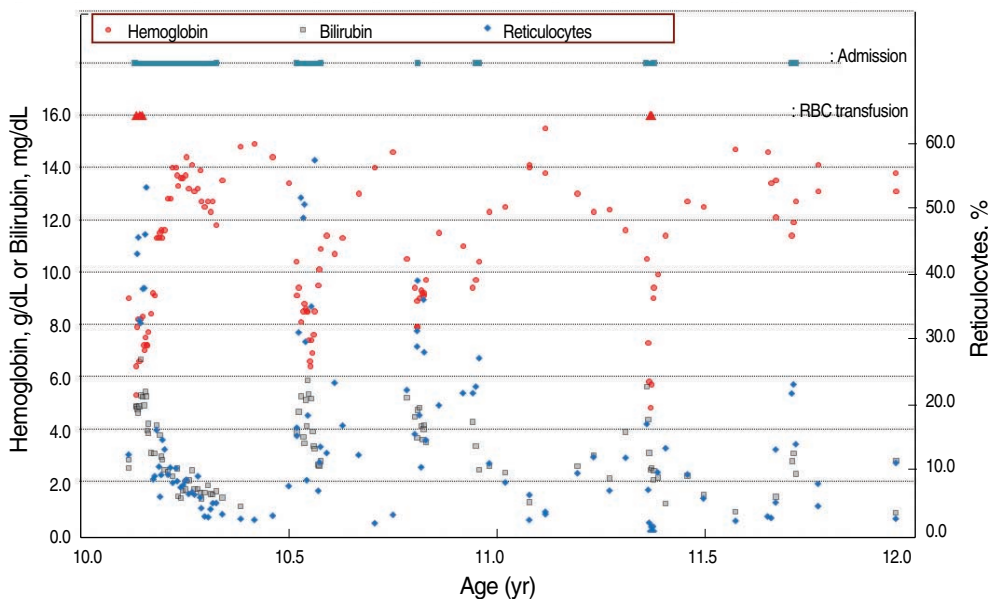


Fig. 3. Laboratory findings associated with hemolytic anemia during last 2 yr. Steroid therapy was tried in every admission.

mg/kg/day)이 시도되었다. 스테로이드 요법 전과 16일 후를 비교하면(전→후), 혈색소(5.8→9.6 g/dL), 빌리루빈(3.8→0.9 mg/dL), 망상적혈구 수(53.5→6.8%) 등 임상 양상이 호전되었다. 환아는 이후 발열, 황달, 심한 무력증 등 용혈빈혈이 심해질 때마다 수차례 입원하여 수혈 요법이나 스테로이드 요법을 받았다. 최근 2년간의 용혈빈혈 관련 검사 결과는 Fig. 3과 같다.

최근 HS 진단을 위하여 FC를 이용한 EMA binding test가 도입되었으므로, 환자가 12세인 현재, 용혈의 원인이 면역매개성인지 비면역성인지, 혹은 스테로이드 요법후 임상 양상 호전이 면역억제 때문인지 질환의 자연 경과인지 감별하기 위하여 FC를 이용한 세 가지 추가 검사들을 시행하였다.

FC OF test는 Won과 Suh [9]의 방법으로 시행하였다. 이 방법은, 적혈구를 생리식염수에 부유시키고 유세포분석기로 수집(acquisition)하면서 중간에 증류수(deionized water, DW)를

튜브에 첨가하면 적혈구가 용혈되기 시작하는데 이때 실시간으로 수집된 적혈구 수에 대하여 DW 첨가 전후를 비교하는 원리이다. 전통적인 OF test와 마찬가지로 이 방법도 건강인에 비하여 유의하게 증가한 OF를 보였다(Fig. 4).

FC direct antiglobulin test (FC DAT)는 Won 등[10]의 방법으로 시행하였다(Fig. 5). 적혈구의 anti-IgG와 anti-IgM 히스토그램에서 mean fluorescence intensity (MFI)를 구하였고, 환자와 함께 시행한 건강인 6명의 MFI의 평균+3×표준편차(SD)를 경계치(cutoff)로 정하였다. 환자의 MFI는 이 경계치보다 작으므로, IgG와 IgM 둘다 음성으로 판정하였다.

EMA binding test는 King 등[8]의 방법으로 시행하였다(Fig. 6). 이 검사는 녹색 형광을 내는 EMA가 적혈구막의 band 3나 Rh-연관 단백질에 결합하는 성질을 이용하는데[5], 적혈구를 EMA 염색 후 그 형광을 유세포분석기 FL1 지표

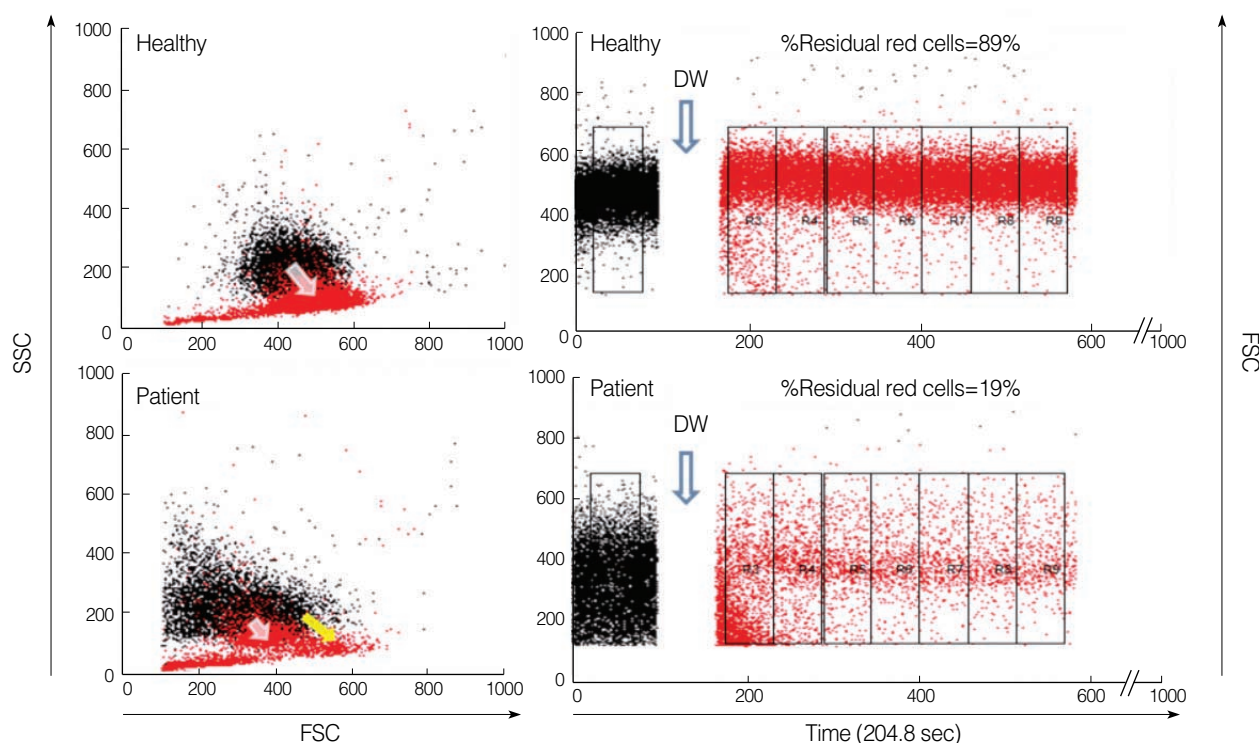


Fig. 4. Flow cytometric osmotic fragility test at 12 yr of age. The events after DW spiking are indicated in red. Post DW spiking, a main subset of the patient showed both a less increased FSC and a less decreased SSC than that of a healthy control (white arrows). On the patient's FSC/SSC plot, a subsidiary subset showing largely increased FSC appears to be reticulocytes (yellow arrow on the right). The control/patient ratio of residual red cells was 4.68 (89%/19%), which was determined as increased osmotic fragility (cutoff 3.0). Abbreviations: FSC, forward scatter; SSC, side scatter; DW, deionized water.

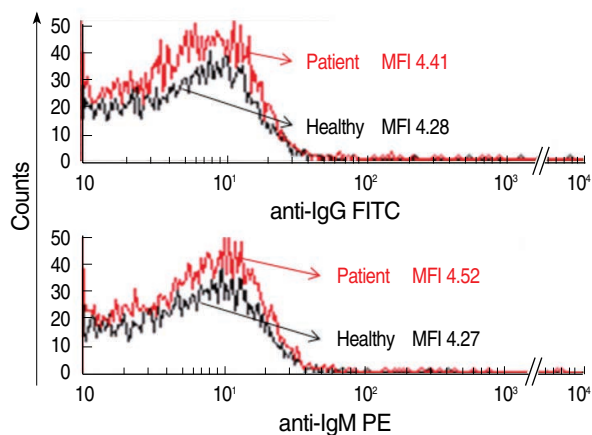


Fig. 5. Direct antiglobulin test by flow cytometry at 12 yr of age. Patient's MFIs were below the cutoff MFIs on both the anti-IgG and anti-IgM histogram of red cells (4.97 and 4.99, respectively), and these values are within normal limits. Abbreviation: MFI, mean fluorescence intensity.

(parameter)로 측정하여[5-8], 적혈구의 FL1 히스토그램에서 MFI를 구한다. 환자 검체는 세 번 반복 측정하여 평균치를 구하였고, 함께 시행한 건강인 6명의 MFI의 평균 $-3 \times SD$ 를 경계

치로 정하였다. 그 결과, 환자 적혈구에 EMA binding이 건강인보다 유의하게 감소한 것이 증명되었다.

가족조사에서 환자의 부, 모, 형 모두 전혈구계산과 말초혈액 도말은 정상이었으나, EMA binding이 정상 대조보다 적었고 특히 형은 경계치 미만의 유의한 감소를 보였다. 이들은 용혈빈혈이 발현된 적이 없으므로, 상염색체 열성 유전인 경우 모두 HS 보인자로 생각되었다(Fig. 7).

이상, HS 감별진단을 위한 통상 검사와 FC를 이용한 세 가지 추가 검사를 종합하면, 용혈빈혈의 원인으로서는 면역매개성보다 비면역성 용혈, 즉 HS의 가능성이 더 높은 것으로 생각되었다.

고 찰

본 증례는 구형적혈구가 증가된 용혈빈혈 환자의 HS 감별진단을 위한 통상 검사에서 OF test '양성', DAT '양성' (일시적), 적혈구막 단백질 SDS-PAGE '정상'으로 일관된 소견을 보이지 않았으나, FC를 이용한 추가 검사에서 FC OF test '양성', FC DAT '음성', EMA binding test '양성'으로 HS에 합당한 결과를 얻은 예이다.

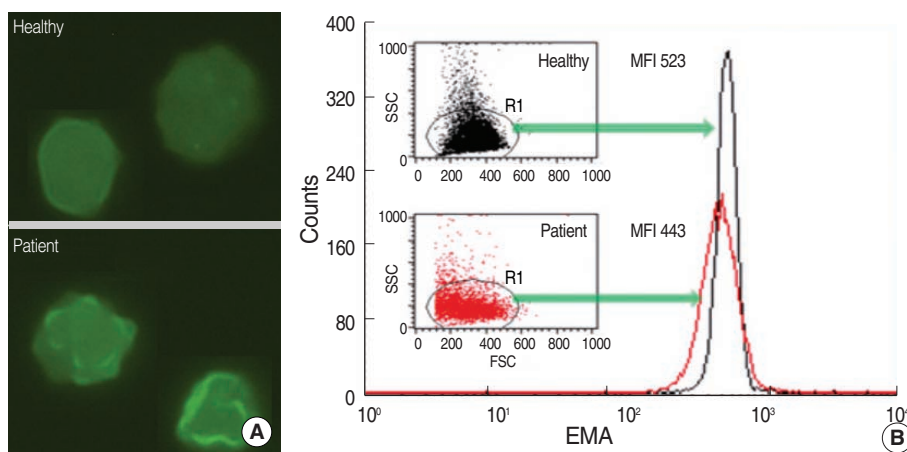


Fig. 6. Eosin 5-maleimide (EMA) binding test at 12 yr of age. (A) Fluorescence microscopy. EMA-bound red cells show green fluorescence. (B) Flow cytometry. Patient's MFI (443) was below the cutoff ($523 - 3 \times 21 = 460$). Abbreviations: FSC, forward scatter; SSC, side scatter; MFI, mean fluorescence intensity, EMA, eosin 5-maleimide.

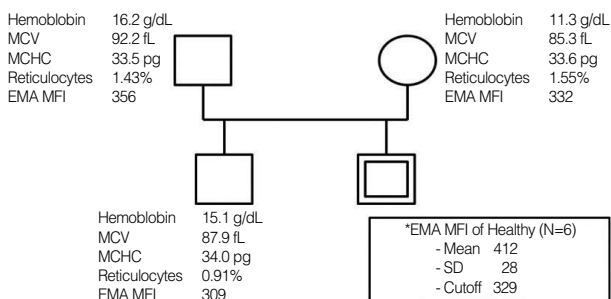


Fig. 7. Genogram of the patient's family. The results of hematologic and EMA binding test are provided. His elder brother also showed significantly decreased MFI value compared to the cut-off value in this batch of test. As EMA binding test for the patient's family was performed in a different batch from the patient, direct comparison of MFI values between the patient's in Fig. 6 and his family's in this figure is not possible. Abbreviations: EMA, eosin 5-maleimide; MFI, mean fluorescence intensity.

DAT 음성 면역매개용혈은 온난형의 약 6%를 차지한다고 하고, 통상적인 DAT가 검출할 수 있는 한계량 이하로 IgG가 적혈구에 부착되면 DAT가 음성을 보일 수 있다. 이 경우 IgG를 검출하는데 FC가 사용될 수 있다고 하고[11], 본 증례에서 시도한 FC를 이용한 DAT는 음성이었다.

본 환자는 비중대가 없었으나, HS에서 환자의 20% 미만에서 비중대가 없기도 하고[12], 면역매개용혈에서도 비중대가 흔하므로, 본 증례에서 비중대 유무는 감별진단에 도움이 되지 못하였다. 보체 C3 저하와 일시적이지만 DAT 양성으로 면역매개성을 시사하는 소견이나, 본 증례와 같이 감소된 C3, 정상 C4는 그람음성패혈증, 바이러스혈증 등에 의한 보체계 교대경로 활성화와 관계가 있다[13].

DAT 위양성의 원인으로서 우선 검사실 측면에서, 검체 중 강한 응집소가 위양성을 유발하고, fibrin이나 침전물, 오염물에

의한 적혈구 응괴(clump)를 응집 반응으로 오인할 수 있고, 적절한 항응고제(EDTA)를 사용하지 않은 경우 보체가 적혈구에 부착되어 응집이 일어날 수 있다[14]. 임상적으로 고감마글로불린혈증, γ -globulin 정주나 특정 약제를 투여한 경우, 세균 감염 등에서 양성 반응을 볼 수 있다[15].

골수에서 새로 나온 HS 적혈구는 덜 구형이고 삼투압에 덜 취약하다. 또한 철이나, 엽산, 비타민 B12 결핍이 동반된 경우도 HS 적혈구의 특징이 감춰질 수 있다[1]. 본 증례에서 스테로이드 요법후 말초혈액도말상 구형적혈구 비율이 감소하는 경우도 있었는데(Table 1), 용혈위기 혹은 골수무형성위기 후 회복기에 망상적혈구가 증가되었기 때문에 구형적혈구가 적게 관찰된 것으로 보인다.

Bolton-Maggs 등[2]이 제시한 HS의 진단 알고리즘에 대하여 살펴보면 다음과 같다: 1) HS가 의심되는 환자가 가족력이 있고, 비중대 등의 임상 양상과 구형적혈구, MCHC 증가, 망상적혈구수 증가 등의 전형적인 검사소견을 보인다면, 확인을 위한 추가 검사는 필요하지 않다. 2) 말초혈액도말에서 구형적혈구가 약간 보이나, 다른 검사실적, 임상적, 가족력적인 증거가 없는 경우, HS에 대하여 높은 예측도를 가지는 선별검사가 필요한데, cryohemolysis 검사와 EMA binding test가 권장된다. 전통적인 OF test 결과는 검사의 제한점을 잘 알고 적용되어야 한다. 3) 이들 선별검사의 결과 판정이 애매하다면, 적혈구막 단백질에 대한 SDS-PAGE가 도움이 될 수 있다. 4) 유전자 검사를 추가하는 것은 필요하지 않다. 대부분 HS 환자의 유전자 변이는 세계적으로 소수의 가계에 국한에서 국지성으로 발생하기 때문이다.

FC에 의한 OF test [9]는 전통적 방법보다 신속하고 정량적인 측정치로 판정할 수 있는 장점이 있으나, 전통적 방법과 마찬가지로 증가된 구형적혈구의 원인, 즉 HS와 면역매개성간 감

별은 불가능할 것으로 생각된다.

근래 도입된 EMA binding test는 HS를 위한 선별검사로 권장되고 있으나, 유세포분석기가 있어야 되고 EMA stock solution 제조 후 유효 기간이 -80°C에서 4개월 정도로 짧은 것이 단점이다[7]. 본 증례에서 환자와 환자의 형 둘 다 EMA binding이 유의하게 감소하였는데, 형은 임상증상이 없으므로 HS 보인자로 생각되었고, 이는 환자의 용혈빈혈이 후천적인 면역매개성이 아닌 선천적인 유전성 질환임을 시사한다[16].

본 증례는, 구형적혈구가 보이는 용혈빈혈 환자에서 감별진단을 위한 통상 검사들에서 일관된 소견을 보이지 않는 경우, FC를 이용한 추가 검사들이 도움이 될 수 있음을 보여주었다.

요 약

구형적혈구가 보이는 용혈빈혈 환자에서 용혈이 면역매개성인지 비면역성인지 감별해야 한다. 유세포분석법으로 유전구형적혈구증으로 진단이 가능하였던 12세 남자 환자의 증례를 보고한다. 이 증례에서, 유전구형적혈구증 감별진단을 위한 통상 검사들은 삼투압취약성검사 양성, 직접항글로불린검사 양성, 적혈구막 단백질 SDS-PAGE 정상으로 판정이 일치하지 않아서 진단이 어려웠다. 그러나, 유세포분석법을 이용한 삼투압취약성 검사, 직접항글로불린 검사, eosin 5-maleimide binding test 모두 유전구형적혈구증에 합당한 결과를 보였다. 또한, 가족조사에서 eosin 5-maleimide binding test 결과는 이 질환이 유전성임을 시사하였다. 이와 같이, 구형적혈구가 보이는 용혈빈혈에서 감별진단이 어려운 경우 유세포분석법은 추가 정보를 제공하는 또 다른 기법으로 유용할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Gallagher PG, Forget BG, Lux SE. Disorders of the erythrocyte membrane. In: Nathan DG and Orkin SH, eds. Nathan and Oski's hematology of infancy and childhood. 5th ed. Philadelphia: WB Saunders, 1998:544-664.
- Bolton-Maggs PH, Stevens RF, Dodd NJ, Lamont G, Tittensor P, King MJ; General Haematology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology. Guidelines for the diagnosis and management of hereditary spherocytosis. Br J Haematol 2004;126:455-74.
- Garratty G. The significance of IgG on the red cell surface. Transfus Med Rev 1987;1:47-57.
- Lee YK, Cho HI, Park SS, Ra E, Chang YH, Hur M, et al. SDS-PAGE analysis of red cell membrane proteins in hereditary hemolytic anemia. Korean J Hematol 1999;34:559-67. (이영경, 조한익, 박성섭, 나은경, 장윤희, 허미나 등. 유전성용혈성빈혈에서 SDS-PAGE를 이용한 적혈구막 단백질 성분분석. 대한혈액학회지 1999;34:559-67.)
- King MJ, Telfer P, MacKinnon H, Langabeer L, McMahon C, Darbyshire P, et al. Using the eosin-5-maleimide binding test in the differential diagnosis of hereditary spherocytosis and hereditary pyropoikilocytosis. Cytometry B Clin Cytom 2008;74:244-50.
- King MJ, Smythe JS, Mushens R. Eosin-5-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis. Br J Haematol 2004;124:106-13.
- Kedar PS, Colah RB, Kulkarni S, Ghosh K, Mohanty D. Experience with eosin-5'-maleimide as a diagnostic tool for red cell membrane cytoskeleton disorders. Clin Lab Haematol 2003;25:373-6.
- King MJ, Behrens J, Rogers C, Flynn C, Greenwood D, Chambers K. Rapid flow cytometric test for the diagnosis of membrane cytoskeleton-associated haemolytic anaemia. Br J Haematol 2000;111:924-33.
- Won DI and Suh JS. Flow cytometric detection of erythrocyte osmotic fragility. Cytometry B Clin Cytom 2009;76:135-41.
- Won DI, Jung OJ, Lee YS, Kim SG, Suh JS. Flow cytometry antibody screening using pooled red cells. Cytometry B Clin Cytom 2010;78:96-104.
- Kerr R, Rawlinson PS, Cachia PG. Direct antiglobulin test negative, non spherocytic autoimmune haemolytic anaemia. Clin Lab Haematol 2000;22:365-7.
- Boyd AS. Hereditary spherocytosis. Am Fam Physician 1989;39:167-72.
- Ruddy S. Complement. In: Rose NR, de Macario EC, et al. eds. Manual of clinical laboratory immunology. 4th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1992:114-23.
- Downes KA and Shulman IA. Pretransfusion testing. In: Roback JD, Combs MR, et al. eds. Technical manual. 16th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2008:437-63.
- Leger RM. The positive direct antiglobulin test and immune-mediated hemolysis. In: Roback JD, Combs MR, et al. eds. Technical manual. 16th ed. Bethesda: American Association of Blood Banks, 2008:499-521.
- Mentzer WC and Lubin BH. Red cell membrane abnormalities. In: Lilleyman JS, Hann IM, et al. eds. Pediatric hematology. 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 1999:257-83.