

# 검사가 지연된 검체에서 보체 C3, C4 값의 변화

## Alterations of Complement C3 and C4 Levels in Delayed Testing

이지영 · 전래희 · 박일규 · 김신규

Z-Young Lee, M.D., La-He Jearn, M.D., Il-Kyu Park, M.D., Think-You Kim, M.D.

한양대학교의료원 진단검사의학과

Department of Laboratory Medicine, Hanyang University Medical Center, Seoul, Korea

**Background:** *In vitro* levels of complement C3 and C4 proteins are sensitive to storage conditions. To avoid *in vitro* complement activation when testing is delayed, serum should be frozen at -20 °C within 2 hr of venipuncture. However, this is impractical in routine laboratory work. Therefore, we investigated alterations in C3 and C4 levels in refrigerated specimens over time and derived formulae to estimate initial levels of complement concentrations in delayed testing.

**Methods:** Ten fresh specimens were measured for C3 and C4 concentrations and were refrigerated at 4 °C. We measured C3 and C4 levels in refrigerated samples daily for 4 days using an automated nephelometer (Beckman Coulter Inc., USA).

**Results:** C3 and C4 levels were significantly increased over time in refrigerated specimens ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.001$ , respectively). The increments in C3 and C4 levels were described by the equations: C3 (mg/dL) =  $3.55x + 87.18$  ( $r = 0.9909$ ), and C4 (mg/dL) =  $0.72x + 22.3$  ( $r = 0.9395$ ), where  $x$  = the number of days samples were refrigerated before testing. Increases in C3 and C4 concentrations were described on a percentage basis by the equations:  $\Delta C3$  (%) =  $4.14x + 1.07$  ( $r = 0.9903$ ), and  $\Delta C4$  (%) =  $3.57x + 2.48$  ( $r = 0.9405$ ).

**Conclusions:** As the measured C3 and C4 concentrations increased by 3.55 mg/dL (4.1%) and 0.72 mg/dL (3.6%) per day in refrigerated specimens, the levels of C3 and C4 should be adjusted in delayed testing. We proposed that the formulae presented be used to back-calculate initial levels of C3 and C4 concentrations.

**Key Words:** Complement C3, Complement C4, Delayed testing

## 서론

보체는 혈중 및 세포벽에 존재하는 30개 이상의 당단백으로 생체방어와 면역반응의 조절에 관여하므로 그 농도의 증가나 감소를 측정하여 여러 질환의 감별진단과 추적검사에 이용한다[1]. 그 중에서 주로 검사하는 C3, C4 농도는 C4 농도가 감소하는 유전성 혈관부종[2]이나 C3 농도가 매우 낮게 보고되는 제2형 막증식사구

체신염(membranoproliferative glomerulonephritis) [1] 등을 감별 진단하는 데 도움이 되며, 전신홍반루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE) 환자에서는 질병의 활성기 때 C3, C4 농도의 감소가 흔하고[1], 신장침범이나 혈액학적 이상의 활성(flare)과 관련이 있어[3, 4] 질병의 경과를 관찰하는 항목 중 하나로 이용되고 있다. 이처럼 C3, C4 검사는 참고치보다 낮은 농도가 예상될 때 이를 확인하기 위해 주로 시행되고 있다. 저자들은 이미 측정한 C3, C4 농도를 재확인하고자 하는 요청이 있어 정규검사 후 냉장보관한 혈청으로 검사를 다시 시행하였을 때 C3, C4 검사 모두에서 농도가 낮은 값에서 참고범위 내로 증가함을 우연히 관찰하였다. 이에 따라 업무 종료 후 채혈하였거나 공휴일로 인하여 부득이하게 검사가 지연되어 냉장보관한 검체에서 C3, C4 검사를 시행하였을 때 농도의 증가가 예상되므로 보체 농도의 변화 정도를 알아보고, C3, C4 농도의 가성증가는 환자에 대한 치료결정에 영향을 줄 수 있으므로 냉장보관된 검체로 측정된 값으로 보관 전의 값을 추정하고자 연구를 시행하였다.

**Corresponding author:** Think-You Kim

Department of Laboratory Medicine, Hanyang University Medical Center, 222-1 Wangsimri-ro, Seongdong-gu, Seoul 133-792, Korea  
Tel: +82-2-2290-8975, Fax: +82-2-2298-1735, E-mail: tykim@hanyang.ac.kr

Received: June 26, 2013

Revision received: July 26, 2013

Accepted: July 31, 2013

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

© 2014, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 대상 및 방법

### 1. 검체

본원 진단검사의학과로 같은 날에 C3, C4 검사가 의뢰된 검체에 서 10개를 무작위 추출하였다. 검체는 혈청용 시험관(BD Vacutainer SST II Advance Plus Blood Collection Tubes, Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)에 채혈하였고 검사 실 도착 후 30분 이내에 원심분리하였다.

### 2. 검사방법

C3, C4 농도는 비율비탁법(rate nephelometry)의 원리를 이용한 자동분석기(IMMAGE 800 Immunochemistry system, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA)로 제조회사의 지침에 따라 검사하였고, 의뢰 당일에 검사한 후 잔여 검체를 냉장(4°C) 보관하여 4일 후 까지 매일 검사하였다. 참고범위는 C3는 79-152 mg/dL, C4는 16-38 mg/dL이었다.

### 3. 통계

의뢰 당일에 검사한 후 냉장보관 중에 일어난 C3, C4 농도의 변화가 통계학적으로 유의성을 가지는지 판단하고 의뢰 당일 검사한 결과(초기값)와 냉장보관 1일 후, 2일 후, 3일 후, 4일 후 실시한 결과가 차이가 있는지 확인하기 위해 repeated measures ANOVA (RM-ANOVA)와 Bonferroni 보정을 시행하였고, 1일 후와 2일 후, 2일 후와 3일 후, 3일 후와 4일 후 실시한 검사결과에 차이가 있는지 확인하기 위해 같은 방법으로 통계분석을 시행하였다. C3, C4 농도가 변화하는 정도는 날짜별로 시행한 검사결과와 초기값의 차

이를 초기값으로 나눈 백분율(%)로 알아보았다. 통계처리는 SPSS 18.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하였고,  $P<0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

의뢰 당일 측정된 10건의 검사에서 C3 검사결과는 74-111 mg/dL로 농도가 참고범위보다 낮은 경우가 4건, 참고범위 내에 포함되는 경우가 6건이었고, 평균 농도 및 표준편차는  $86.3 \pm 11.8$  mg/dL이었다(Tables 1, 3). C4 검사결과는 17-32 mg/dL로 모두 참고범위 내에 포함되었고, 평균 농도 및 표준편차는  $21.8 \pm 4.6$  mg/dL이었다(Tables 2, 3).

냉장보관된 검체를 1일 후, 2일 후, 3일 후, 4일 후에 측정된 C3 농도의 평균값 및 표준편차는  $91.4 \pm 12.0$  mg/dL,  $95.2 \pm 13.6$  mg/dL,  $97.5 \pm 13.9$  mg/dL,  $101.0 \pm 14.0$  mg/dL로 통계적으로 유의한 변화(RM-ANOVA,  $P<0.001$ )를 보였고, 각 결과값과 초기값은 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 같은 방법으로 측정된 C4의 평균농도와 표준편차는  $23.6 \pm 4.2$  mg/dL,  $23.8 \pm 4.2$  mg/dL,  $24.6 \pm 4.4$  mg/dL,  $24.9 \pm 3.9$  mg/dL로 통계적으로 유의한 변화(RM-ANOVA,  $P<0.001$ )를 보였다. 냉장 보관 기간에 따라 C3 농도는  $C3 \text{ (mg/dL)} = 3.55x + 87.18$  ( $x$ =냉장 보관한 기간(일),  $r=0.9909$ ), C4 농도는  $C4 \text{ (mg/dL)} = 0.72x + 22.3$  ( $r=0.9395$ )였다(Fig. 1). C3 농도의 증가율은  $\Delta C3 \text{ (\%)} = 4.14x + 1.07$  ( $r=0.9903$ ), C4 농도의 증가율은  $\Delta C4 \text{ (\%)} = 3.57x + 2.48$  ( $r=0.9405$ )로 나타낼 수 있고, 초기값과 매일 측정된 값을 각각 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이가 있었다(Table 3, Fig. 2).

Table 1. Alterations of complement C3 levels in refrigerated specimens over time

Specimen	C3 concentrations (mg/dL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fresh	78*	74*	74*	88	78*	88	98	111	82	92
Day 1	85	86	80	90	81	90	100	121	86	95
Day 2	85	91	84	95	83	94	103	129	89	99
Day 3	88	94	85	98	84	94	107	131	91	103
Day 4	95	96	89	100	88	96	107	136	94	109

\*Measured C3 levels that were lower than the reference range.

Table 2. Alterations of complement C4 levels in refrigerated specimens over time

Specimen	C4 concentrations (mg/dL)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Fresh	18	24	25	20	20	32	17	22	23	17
Day 1	21	25	26	21	21	33	21	25	25	18
Day 2	20	25	27	22	22	33	22	23	26	18
Day 3	21	26	27	22	23	34	23	25	27	18
Day 4	22	26	27	23	24	34	24	24	26	19

Table 3. Comparisons of C3 and C4 concentrations in fresh and refrigerated specimens

	C3 (N = 10)			C4 (N = 10)		
	Mean (mg/dL) (%)	P*	P†	Mean (mg/dL) (%)	P*	P†
Fresh	86.3 (100.0)			21.8 (100.0)		
Day 1	91.4 (105.9)	0.015		23.6 (108.3)	0.001	
Day 2	95.2 (110.3)	0.002	0.003	23.8 (109.2)	0.001	0.555
Day 3	97.5 (113.0)	0.001	0.004	24.6 (112.8)	<0.001	0.003
Day 4	101.0 (117.0)	<0.001	0.006	24.9 (114.2)	<0.001	0.279

\*Statistical analyses were performed using ANOVA and Bonferroni corrections to compare C3 or C4 concentrations in the fresh specimen group and the groups of samples refrigerated for the indicated days; †ANOVA and Bonferroni correction analyses were performed to compare C3 and C4 levels between groups at each indicated day and the preceding day.

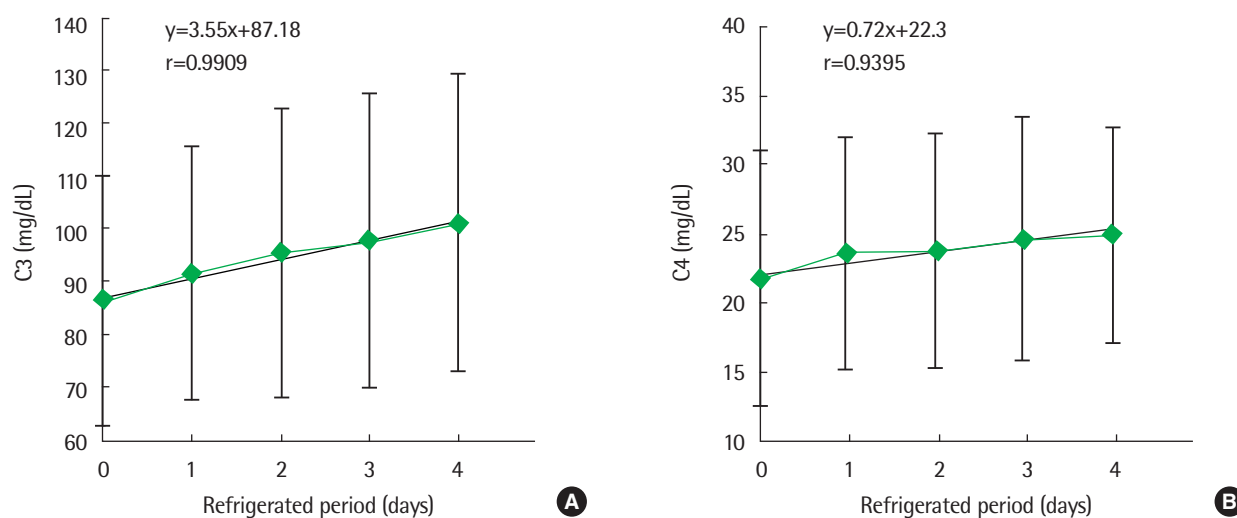


Fig. 1. Alterations of complement C3 (A) and complement C4 (B) levels in refrigerated specimens over time, expressed as mg/dL.

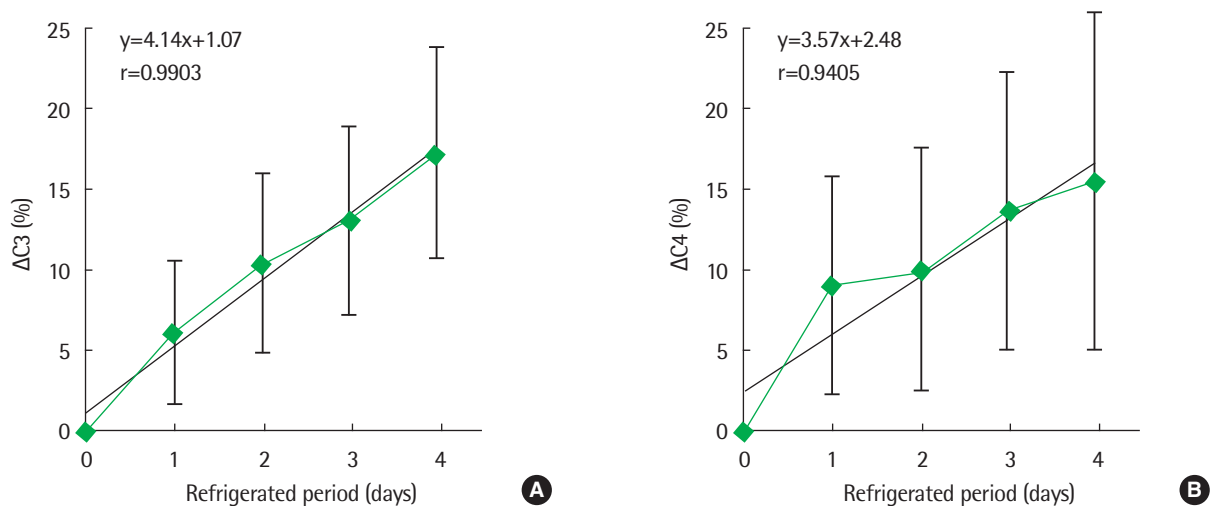


Fig. 2. Alterations of complement C3 (A) and complement C4 (B) levels in refrigerated specimens over time, expressed as % changes.

## 고찰

보체 C3, C4의 측정에 사용되고 있는 비탁법과 혼탁측정법은 보체와 그에 대한 항체가 이루는 항원-항체 복합체를 측정하는 것

이 기본원리로 보체에 대한 항체의 특이도는 검사의 정확도에 큰 영향을 주는 요인 중 하나이다. 본 연구에서 사용한 기기에서는 C3 검사의 항혈청이 C3 단백질뿐만 아니라 분해산물인 C3c와 C3d와 반응하며, C4 측정에 사용하는 항혈청이 C4, C4a, C4b의 공통

으로 존재하는 항원부위와 반응한다. C3c를 검사하기 위해 사용하는 다클론성 C3c 항체는 C3c 이외에 C3 단백질과 C3b와 반응하기도 한다[5].

시험관 내 보체의 활성화는 온도의 영향을 받는다. 검체를 냉장보관할 때는 보체계의 활성이 지연되지만[5] 지속적으로 활성이 이루어지면서 C3, C4 단백질은 분해되어 감소하고 분해 산물의 농도는 증가한다[5-7]. C3 단백질은 보체계의 활성화 과정에서 C3a와 C3b로 나누어진 후, C3b는 다시 C3c, C3d, C3g 등으로 분해되어 불활성화되며[8], C4 단백질은 C4a와 C4b로 나누어진 다음, C4b가 C4c와 C4d로 분해된다[9].

따라서 검사가 지연되면 보체의 측정값은 변화하게 된다. 본 연구에서 냉장보관한 검체의 C3, C4의 농도는 매일 증가하는 양상을 보였다. Maguire 등[7]의 연구결과에서 비탁법을 이용한 자동화기기(Array, Beckman Coulter Inc., Fullerton CA, USA)로 하룻밤 동안 4°C에 보관한 검체에서 측정된 C3, C4 농도는 각각 7%, 25% 증가하였고, C3c에 대한 항혈청을 사용하는 기기(BNA, Hoechst-behring, Marburg, Germany)를 이용한 Okumura 등[5]의 연구에서 4°C에서 7일간 보관한 검체의 C3 농도는 초기 농도보다 35%까지 상승하였고, -20°C에서 보관한 검체에서도 C3 농도가 지속적으로 상승하여 보관 7일째에 16%, 14일째에 37%의 증가를 보였다. 이러한 결과는 보체와 분해산물의 농도 변화와 이에 대한 항혈청의 특이도나 항체결합력(avidity)에 차이가 있어 발생하는 것으로 추정하고 있다[5, 7].

냉장 1일 후 측정된 C3 농도는 초기값보다 5.9% 증가하였으며( $P=0.015$ ), C4 농도는 8.3% 증가하였다( $P=0.001$ ). C3 농도가 참고치보다 낮은 4건은 1일 후의 농도가 모두 참고치 범위 안에 포함되어 임상적 해석에 영향을 주었다. 따라서 냉장보관된 검체로 검사를 시행할 때에는 보체 활성을 막을 수 있는 추가적인 처리를 하거나 초기값을 추정할 방법을 마련하여야 한다. C3, C4 검사가 채혈 후 2시간 이내에 시행되지 못할 때에는 검체를 -20°C로 냉동하여 보관하는 것이 권장된다[10]. 일부 연구에서는 보체의 활성을 완전히 막기 위해 검체를 -80°C에 보관해야 한다고 하며[5], 검체에 EDTA를 첨가하거나 추가로 nafamostat mesilate (Futhan, FUT-175)를 처리하는 것을 권장하기도 한다[6, 11]. 그러나 검사실에서는 한 검체로 여러 검사를 시행하게 되어 모든 검사의 보관기준을 만족시키기 어렵고, 검체를 추가로 처리하거나 냉동보관하게 되면 업무량이 증가하고 보관 공간이 부족하여서 냉장보관하는 것이 일반적이다. EDTA를 처리한 혈장에서는 C3의 농도가 혈청에서 검사한 결과보다 7-12% 낮아지기 때문에[7, 12] C3, C4 두 검사를 모두 시행할 때는 EDTA 처리를 할 수 없으며 같은 검체로 시행하는 다른 검사에도 영향을 줄 수 있다.

검체를 냉장보관한 5일 동안 C3, C4 농도는 하루마다 평균 3.55

mg/dL (4.1%), 0.72 mg/dL (3.6%) 증가하며 이를 바탕으로 검체를 냉장상태에 보관한 기간에 따라 증가량 및 증가율을 추정하고 냉장보관 후 측정된 값에서 역산하여 초기값을 추정해 볼 수 있다. 만약 추정된 초기값이 참고범위를 벗어난다면 이를 주치의에게 알리고, 필요하다면 환자로부터 다시 채혈한 후 C3, C4 검사를 시행하여 농도를 확인하여야 할 것이다.

본 연구는 무작위로 추출한 검체를 대상으로 진행하였기 때문에 보체의 농도별로 골고루 포함되지 못한 한계점이 있다. 그러나 C3, C4 검사를 하는 경우는 유전성 결핍이나 소모량의 증가로 인한 농도의 감소를 확인하는 경우가 많으므로 참고범위보다 낮거나 참고범위 내에서도 낮은 농도를 보이는 대상을 다수 포함한 대상군이 적절할 것이다.

## 결론

냉장보관한 검체에서 측정된 C3, C4 농도는 초기값보다 통계적으로 유의하게 증가하므로 검사가 지연된 검체의 검사값은 추가적인 보정이 필요하다. 본 연구에서 제시한 방법과 같이 보체 농도의 증가량이나 증가율을 구하여 초기값을 추정한다면 임상적인 해석에서 농도의 가성증가로 야기되는 혼란을 줄일 수 있을 것이다.

## 요약

**배경:** 채혈 후 C3, C4 농도는 보관조건에 따라 변화한다. 검사가 2시간 이상 지연될 때 검체를 냉동 보관하는 것을 권장하고 있지만, 검사실의 여건상 그대로 시행하기 어렵기 때문에, 저자들은 냉장보관한 검체에서 C3, C4 농도의 변화를 알아보고 초기값을 추정해보고자 하였다.

**방법:** C3, C4 검사를 10개의 검체에서 시행한 후 검체를 냉장보관하면서 4일간 매일 실시하였다. C3, C4 검사는 비탁법을 원리로 한 자동화기기(Beckman Coulter Inc., USA)를 이용하였다.

**결과:** 의뢰 당일에 검사한 C3, C4 농도는  $86.3 \pm 11.8$  mg/dL,  $21.8 \pm 4.6$  mg/dL이고, 냉장 보관 후 측정된 농도는 통계적으로 유의한 증가를 보였다( $P<0.001$ ,  $P<0.001$ ). C3 농도는  $C3 \text{ (mg/dL)} = 3.55x + 87.18$  ( $x$ =냉장보관한 기간(일),  $r=0.9909$ ), C4 농도는  $C4 \text{ (mg/dL)} = 0.72x + 22.3$  ( $r=0.9395$ )였고, C3 농도의 증가율은  $\Delta C3 \text{ (\%)} = 4.14x + 1.07$  ( $r=0.9903$ ), C4 농도의 증가율은  $\Delta C4 \text{ (\%)} = 3.57x + 2.48$  ( $r=0.9405$ )로 나타낼 수 있었다.

**결론:** 냉장보관한 검체에서 하루마다 C3 농도는 평균 3.55 mg/dL (4.1%), C4 농도는 평균 0.72 mg/dL (3.6%)의 통계적으로 유의한 증가를 보이므로 검사가 지연된 검체에서 측정된 C3, C4 농도는 보정되어야 하며, 본 연구에서 제시한 방법으로 구한 증가량이나 증가

율로 역산하여 초기값을 추정할 수 있을 것이다.

## REFERENCES

1. Massey HD, Richard AM. Mediators of inflammation: complement, cytokines, and adhesion molecules. In: Richard AM, Matthew RP, eds. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2011:914-32.
2. Mollnes TE, Jokiranta TS, Truedsson L, Nilsson B, Rodriguez de Cordoba S, et al. Complement analysis in the 21st century. Mol Immunol 2007;44:3838-49.
3. Ho A, Barr SG, Magder LS, Petri M. A decrease in complement is associated with increased renal and hematologic activity in patients with systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum 2001;44:2350-7.
4. Illei GG, Takada K, Parkin D, Austin HA, Crane M, Yarboro CH, et al. Renal flares are common in patients with severe proliferative lupus nephritis treated with pulse immunosuppressive therapy: long-term follow up of a cohort of 145 patients participating in randomized controlled studies. Arthritis Rheum 2002;46:995-1002.
5. Okumura N, Nomura M, Tada T, Mitsuaki K, Takeshi M, Tsutomu K, et al. Effects of sample storage on serum C3 assay by immunonephelometry. Clin Lab Sci 1990;3:54-7.
6. Mollnes TE, Garred P, Bergseth G. Effect of time, temperature and anticoagulants on *in vitro* complement activation: consequences for collection and preservation of samples to be examined for complement activation. Clin Exp Immunol 1988;73:484-8.
7. Maguire OC, Curry MP, O'Gorman P, Parfrey N, Hegarty J, Cunningham SK. *In vitro* cold activation of complement shown by an overestimation of total complement 4: a study in patients with hepatitis C virus infection. Ann Clin Biochem 2001;38:687-93.
8. Thurman JM, Kulik L, Orth H, Wong M, Renner B, Sargsyan SA, et al. Detection of complement activation using monoclonal antibodies against C3d. J Clin Invest 2013;123:2218-30.
9. Davies ET, Nasaruddin BA, Alhaq A, Senaldi G, Vergani D. Clinical application of new technique that measures C4d for assessment of activation of classical complement pathway. J Clin Pathol 1988;41:143-7.
10. David EN. Specimen collection and handling. In: Noel RR, Robert GH, et al. eds. Manual of molecular and clinical laboratory immunology. 6th ed. Washington, DC: ASM Press, 2002:49-50.
11. Pfeifer PH, Kawahara MS, Hugli TE. Possible mechanism for *in vitro* complement activation in blood and plasma samples: futhan/EDTA controls *in vitro* complement activation. Clin Chem 1999;45:1190-9.
12. Newell S, Gorman JC, Bell E, Atkinson JP. Hemolytic and antigenic measurements of complement. A comparison of serum and plasma samples in normal individuals and patients. J Lab Clin Med 1982; 100:437-44.