



유세포분석에서 발작야간혈색소뇨증 세포의 시간과 온도에 따른 안정성 평가

Evaluation of Time and Temperature Stability of Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Cells by Flow Cytometry

이소희 · 방해인 · 신유정 · 신우용 · 김지은 · 박노진 · 신정원 · 최태윤

So Hee Lee, M.T., Hae In Bang, M.D., Yu Jeong Shin, M.T., Woo Yong Shin, M.D., Jieun Kim, M.D., Rojin Park, M.D., Jeong Won Shin, M.D., Tae Youn Choi, M.D.

순천향대학교 부속 서울병원 진단검사의학과

Department of Laboratory Medicine, Soonchunhyang University Seoul Hospital, Seoul, Korea

Background: Flow cytometry analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) is significantly affected by the methodology used. The lack of data on the effect of age and refrigeration on PNH clone stability motivated us to study these aspects using flow cytometry.

Methods: Peripheral blood was collected from six patients, of which two presented with PNH. All samples were tested immediately and stored at room temperature (RT, 20–25°C) and at 4°C for re-analysis at 24, 48, 72 hr and 7 days. Anti-CD59-fluorescein isothiocyanate (Beckman Coulter, USA) and anti-CD235a-phycoerythrin (PE; Beckman Coulter) were used to stain red blood cells (RBCs). Fluorescein-labeled proaerolysin (Cedarlane, Canada), anti-CD15-PE (Beckman Coulter), anti-CD24-PE-cyanin 5 (Beckman Coulter), and anti-CD45-PE-cyanin 7 (Beckman Coulter) were used to stain granulocytes. Flow cytometry was performed using a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter). The effects of time and temperature were analyzed using generalized estimating equations.

Results: No significant differences in the gated percentage of RBCs and PNH clone size of RBCs were observed between the RT and 4°C groups up to 7 days of testing. The percentage of gated neutrophils decreased with specimen age ($P < 0.001$) and a better correlation with baseline was obtained at 4°C than at RT ($P = 0.014$). Neutrophil PNH clones were stable until 48 hr and 72 hr at RT and 4°C, respectively, and could not be analyzed at 7 days.

Conclusions: RBC analysis was successfully performed up to 7 days. For neutrophils, testing within 48 hr is recommended, because the number of gated cells decreases significantly with age.

Key Words: Flow cytometry, Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, Stability

서 론

발작야간혈색소뇨증(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)은 용혈빈혈, 정맥혈전, 조혈 결핍, 혈구 감소증을 일으키는

후천성 조혈모세포 질환이다. 조혈모세포에서의 *phosphatidylinositol-glycan complementation class A (PIGA)* 유전자의 변이로 세포막 부착물인 glycosylphosphatidylinositol-anchor (GPI-anchor) 단백질의 결핍이 생기고 보체활성 억제 단백질 CD55와 CD59의 결여를 초래한다. 이러한 기전으로 보체 매개 용혈에 노출됨으로써 이 질환의 전형적인 증상인 혈관내 용혈 증상을 나타내게 된다[1]. PNH를 진단하기 위한 유세포 검사에서 용혈성 빈혈이라는 임상 증상 때문에 적혈구를 분석하는 것이 기본이었으나 수혈과 PNH 클론의 용혈 때문에 정확히 클론의 양을 판단하는 데에는 한계가 있다. 따라서 백혈구 분석이 PNH 클론의 양을 더 정확히 반영하며 적혈구와 백혈구 클론의 상대적인 양을 비교함으로써 유용한 임상 정보를 제공받을 수도 있다[2].

치료제로는 보체 C5에 대한 중화항체인 eculizumab (Soliris, Alexion Pharmaceuticals, Boston, MA, USA)이 있으며 용혈, 혈전, 수혈에 대한 필요성을 감소시켜 PNH 환자의 삶의 질을 향상시킨

Corresponding author: Hae In Bang, M.D.

<https://orcid.org/0000-0001-7854-3011>

Department of Laboratory Medicine, Soonchunhyang University Seoul Hospital, 59 Daesakwan-ro, Yongsan-gu, Seoul 04401, Korea
Tel: +82-2-709-9386, Fax: +82-2-710-3088, E-mail: genuine43@schmc.ac.kr

Received: March 26, 2018

Revision received: July 26, 2018

Accepted: July 31, 2018

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

© 2019, 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/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

다는 보고가 있어 왔다[3-5].

치료제가 개발되고 사용됨에 따라 많은 임상 검사실에서 PNH의 선별과 정확한 진단의 중요성이 대두되게 되었다. PNH를 진단하는데 유세포 분석법이 표준 방법이며 2010년도에 처음으로 International Clinical Cytometry Society (ICCS)에서 PNH 유세포 분석법에 대하여 검체 준비부터 분석에 이르는 전반적인 방법을 제시한 PNH 진단 가이드라인을 발표하였다[2]. ICCS에서 제안한 시약을 사용하여 PNH 클론을 더 민감하게 검출했다는 연구들도 많다[6-8]. 이 진단 가이드라인에 의하면, PNH를 진단함에 있어 우선적으로 검체의 질을 잘 관리하여야 한다. 보통은 말초혈액을 사용하고 EDTA가 항응고제로 가장 많이 사용되고 있다. 그러나 검체 수송과 검체 보관기간에 대한 연구는 부족한 실정이다[2]. 이에 대한 연구가 있어야 실제 임상 검사실에서는 검사 마감 시간을 결정하고 검체 수송 시간이 더 소요되는 수탁검사 가능 여부를 판단할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 적혈구와 백혈구, 백혈구 중에서는 호중구를 대상으로 검체의 보관온도와 보관기간에 따라 어떠한 영향을 받는지 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 대상 및 검사장비

2명의 PNH 환자와 4명의 건강 검진자의 EDTA 말초혈액 검체를 사용하였다. 당일 채혈한 검체만 사용하였으며 각 검체별로 9개의 자검체를 만들어 1개는 즉시 PNH 검사를 시행하고 4개의 자검체는 실온(20-25°C)보관, 나머지 4개의 자검체는 4°C에 보관하였다. 실온 상태의 검체로 검사를 즉시 시행한 후, 실온과 4°C에 보관한 검체로 24시간 후, 48시간 후, 72시간 후, 7일 후에 동일한 방법으로 검사를 수행하였다. 검사장비는 FC500 유세포 분석기(Beckman Coulter, Miami, FL, USA)를 사용하였고 분석 소프트웨어는 Kaluza analysis 1.3 (Beckman Coulter)을 사용하였다.

2. PNH 유세포 분석 검사

1) 적혈구 분석

CD235a-phycoerythrin (PE) 항체(Beckman Coulter)와 CD59-fluorescein isothiocyanate (FITC) 항체(Beckman Coulter)를 각각 10 µL씩 검체 1 µL에 혼합하여 15분간 실온, 암소에서 반응시켰다. 인산염완충식염수(phosphate-buffered saline, PBS) 3 mL를 넣어 2,000 rpm, 3분 조건으로 세척을 2회 시행한 후 침사를 PBS 700 µL에 부유시켜 분석하였다. Trigger parameter의 detection threshold는 전방산란(forward scatter characteristics, FSC) 1로 설정하였다. 총 600초간 세포의 신호를 획득하여 전체 평균 약 35만 개의 세포

를 분석하였고 응집과 깨진 적혈구를 제외하여 평균 7만 개의 적혈구를 분석하였다. 적혈구 분석은 FSC와 측방산란(side scatter characteristics, SSC) 산점도(dot plot)를 이용하여 응집된 적혈구나 깨진 적혈구를 제거하고 SSC와 CD235a를 이용하여 CD235a 양성 적혈구만을 선택하여 전체 획득한 세포 중 적혈구의 분율을 구하고 CD59를 이용하여 PNH 클론의 백분율을 측정하였다. 분석한 적혈구의 수가 검사마다 차이가 있었기 때문에 type II 또는 type III PNH 적혈구가 40개 이상 군집을 이루고 있을 때 PNH 양성으로 판단하였고 평균 0.05%의 분석 민감도를 보여주었다.

2) 백혈구(호중구) 분석

Fluorescein-labeled proaerolysin (FLAER) (Cedarlane, Burlington, ON, Canada), CD15-PE 항체(Beckman Coulter), CD24-PE-Cyanine 5 (PC5) 항체(Beckman Coulter), CD45-PE-Cyanine 7 (PC7) 항체(Beckman Coulter)를 10 µL씩 넣은 후 검체를 100 µL씩 넣어 15분간 실온, 암소에서 반응시켰다. PBS로 세척하고 Versalyse (Beckman Coulter) 1 mL를 넣어 10분간 암소에서 적혈구를 용해시켰다. 2,000 rpm, 3분 원심분리하여 상층액을 제거하고 PBS를 3 mL 넣어 2,000 rpm, 3분 조건으로 세척하고 가라앉은 침사를 PBS 700 µL로 부유하여 검사하였다. Trigger parameter의 detection threshold는 FSC 120으로 설정하였다. 총 600초간 세포를 획득하였고 전체 평균 약 30만 개의 세포를 분석하였다. 호중구는 대상에 따라 3만 개에서 13만 개까지 다양하게 분석되었다. FSC와 SSC 산점도를 이용하여 적혈구나 깨진 백혈구를 제거하고 CD45와 SSC 산점도로 한 번 더 깨진 백혈구를 제거하여 주었다. CD15와 SSC를 이용하여 호중구만 선택하여 전체 획득한 세포 중 호중구의 분율을 구하고 FLAER와 CD24를 이용하여 PNH 클론의 백분율을 측정하였다. 분석한 호중구의 수가 검체의 보관온도 및 보관기간에 따른 검사 조건마다 차이가 있었기 때문에 type II 또는 type III PNH 호중구가 40개 이상 군집을 이루고 있을 때 PNH 양성으로 판단하였고 0.03-0.13%의 분석 민감도를 보여주었다.

3. 통계

온도와 시간에 따른 적혈구와 호중구의 비율 변화 및 PNH 클론 변화는 SPSS 18.0을 이용하여 일반화추정방정식(generalized estimating equations, GEE)을 시행하였다. 상관행렬작업은 AR(1) 모형으로 설정하였다. 시간변수의 단위는 일(day)이며 0, 1, 2, 3, 7로 코딩하여 분석에 사용하였다. 모든 통계량의 유의수준은 0.05로 하였다.

결 과

전체 획득된 세포 중 분석한 적혈구의 비율은 실온과 냉장보관

그룹을 비교하였을 때는 차이가 없었다($P=0.838$). 시간이 갈수록 분석 가능한 적혈구의 비율은 증가하였으며($P<0.001$) 하루가 지날 때마다 실온보관 그룹은 3.917%씩 증가하였고 냉장보관 그룹은 2.305%씩 증가하였다. 두 군 간에 시간에 따른 변화는 차이가 없었다($P=0.229$) (Fig. 1). PNH 환자 두 명을 대상으로 한 적혈구 PNH 클론의 비율은 실온에서 보관한 그룹과 냉장에서 보관한 그룹 사이에 차이를 보이지 않았으며($P=0.919$) 7일까지 분석해 보았을 때 시간에 따른 영향을 받지 않았다($P=0.934$). 또한, 두 그룹간에 시간에 따른 변화에도 차이가 없었다($P=0.445$) (Figs. 1, 2) (Table 1).

전체 세포 중 분석한 호중구의 비율은 냉장보관하였을 때가 실온보관하였을 때보다 더 많았다($P=0.014$). 시간이 갈수록 그 비

율은 감소하였으며($P<0.001$) 하루가 지날 때마다 실온보관 그룹은 4.316%씩 감소하였고 냉장보관 그룹은 4.768%씩 감소하였고 두 그룹 간에 시간에 따른 변화에는 차이가 없었다($P=0.347$) (Fig. 1). 특히 48시간 검사에서부터 4°C 냉장보관했던 그룹이 실온보관 그룹보다 더 호중구가 잘 보존되는 양상을 보였다. 통계적으로 PNH 환자를 대상으로 한 호중구의 PNH 클론의 크기는 두 그룹 간에 차이가 있었다($P<0.001$). 시간에 따른 변화도 있었으며($P=0.034$) 실온보관 그룹은 평균 8.843%씩 감소하였고 냉장보관 그룹은 평균 0.079%씩 증가하여 두 군 간에 시간에 따른 변화는 차이가 있었다($P=0.031$) (Fig. 1). 육안 분석에서 호중구의 PNH 클론의 비율은 실온보관 시 48시간까지 안정했고 72시간 때에는 다소 감소하였으며 냉장보관 시 72시간까지 안정했고 실온, 냉장 둘 다 7일째 검사

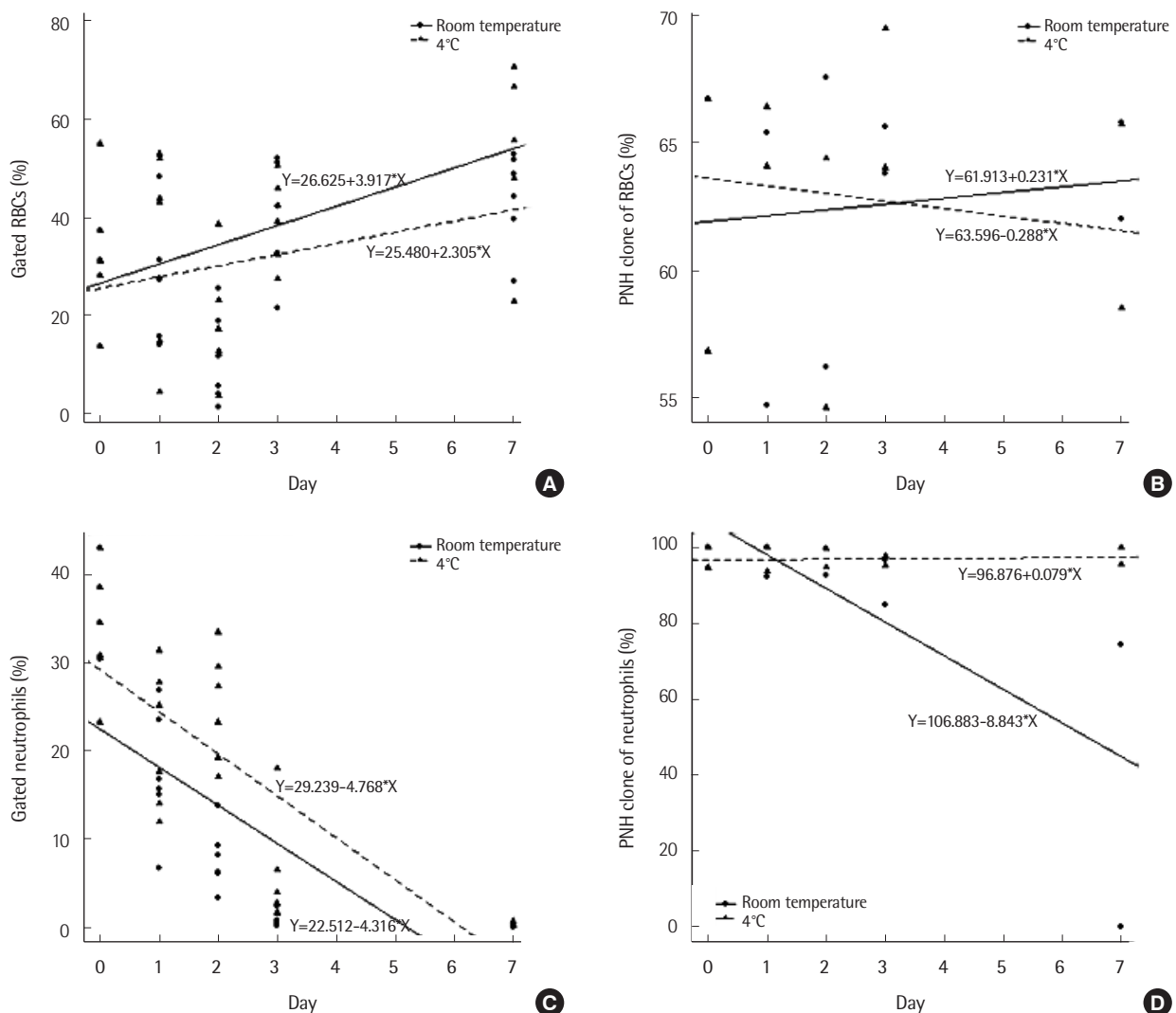


Fig. 1. Comparison of (A) gated RBCs (%), (B) paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) clones of RBCs (%), (C) gated neutrophils (%), and (D) PNH clones of neutrophils (%) between the room temperature group and the 4°C group according to time in flow cytometry analysis. Generalized estimating equation tests were used.

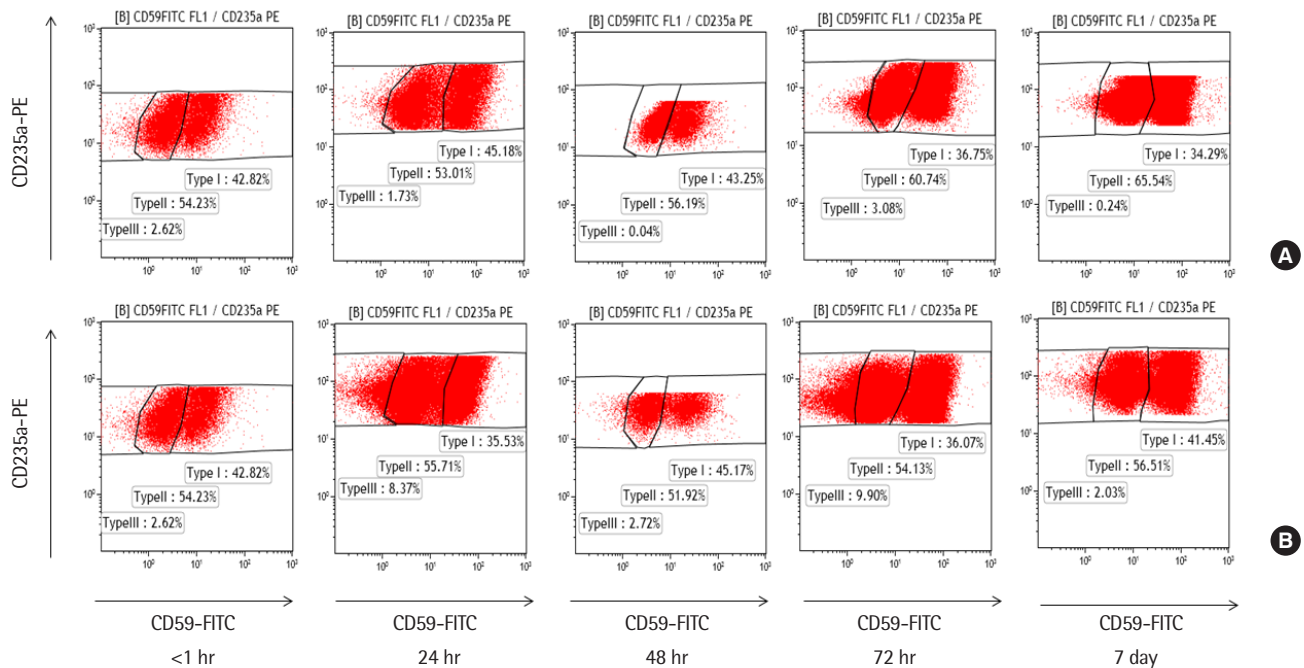


Fig. 2. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cell analysis according to testing time in a PNH patient (Case 2 in Table 1). A blood sample was tested within 1 hr of collection and stored at room temperature (A) and at 4°C (B). Reanalysis was performed at 24 hr, 48 hr, 72 hr, and 7 days. The size of PNH clone (II+III) of RBCs was 56.85% and showed no effect due to time or temperature. At 7 days, the PNH clone was 65.78% (room temperature) and 58.54% (4°C).

Table 1. Comparison of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) cells of two PNH patients according to time and temperature of specimen storage in flow cytometric analyses

		Case 1		Case 2	
		Room temperature*	4°C*	Room temperature*	4°C*
Red blood cells	0 hr	49,914 (66.71)		11,129 (56.85)	
	24 hr	52,777 (65.41)	13,646 (66.40)	18,252 (54.74)	51,736 (64.08)
	48 hr	5,380 (67.54)	4,283 (64.39)	10,061 (56.23)	9,923 (54.64)
	72 hr	119,438 (65.60)	92,789 (69.48)	80,937 (63.82)	120,066 (64.03)
	7 day	28,437 (62.03)	46,662 (65.71)	122,532 (65.78)	41,762 (58.54)
Neutrophils	0 hr	33,196 (99.93)		51,554 (94.59)	
	24 hr	25,027 (99.92)	33,196 (99.93)	10,142 (92.21)	18,184 (93.71)
	48 hr	15,055 (99.80)	25,430 (99.84)	3,454 (92.70)	35,769 (94.81)
	72 hr	1,804 (96.68)	19,898 (99.71)	719 (84.99)	15,026 (95.16)
	7 day	0 (0)	2,601 (97.71)	44 (74.58)	319 (95.51)

*Values are presented as N (%). N is the PNH cell number and % is the proportion of PNH cells to the number of total gated cells (RBCs or neutrophils) analyzed for each test.

에서는 분석할 수 있는 호중구의 수가 너무 적었다(Fig. 3) (Table 1).

고찰

2010년도 ICCS에서 PNH 검사에 대한 가이드라인을 발표한 바가 있으며 적혈구 분석은 검체를 냉장보관한 경우 7일까지 안정하지만 즉시 검사하는 것과 늦어도 검체 채취 후 48시간 이내 검사하는 것을 추천한다. 백혈구 분석은 시간이 지나면 세포의 scatter

와 항원 표현이 변화하기 때문에 결과 해석이 어려워지며 24-48시간 이내에 검사를 해야 만족할만한 결과를 얻을 수 있다고 한다. 이 가이드라인에서는 검체의 안정성에 대하여 위와 같이 짧게 언급하고 있으며 이에 대한 참고문헌 및 데이터는 부족하지만 저자들의 경험을 바탕으로 보고한다고 명시하였다[2]. 따라서 본 연구는 객관적인 데이터를 제시한 최초의 연구로 생각되며 연구 결과, PNH 검사에서 검체의 안정성은 적혈구의 경우 냉장 또는 실온보관에 상관없이 분석한 7일까지 안정하였다. 7일을 초과하여 보관

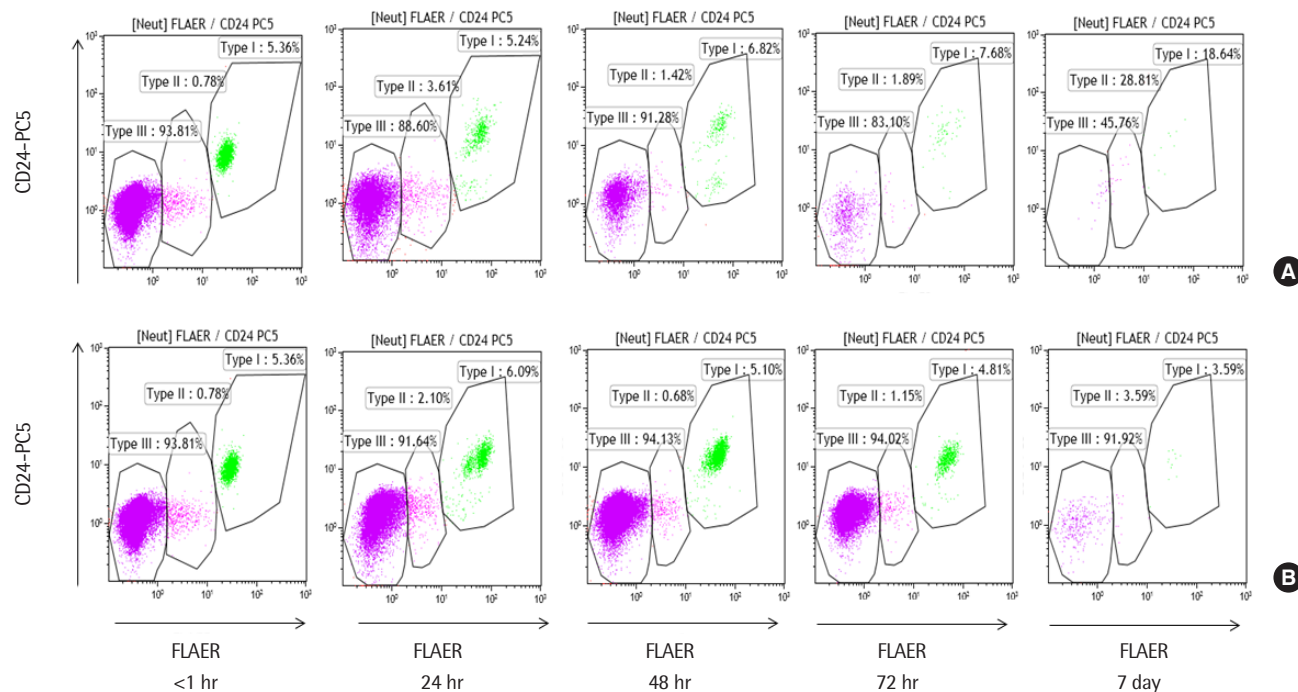


Fig. 3. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) neutrophil analysis according to testing time in a PNH patient (Case 2 in Table 1). A blood sample was tested within 1 hr of collection and stored at room temperature (A) and at 4°C (B). Reanalysis was performed at 24 hr, 48 hr, 72 hr, and 7 days. The size of the PNH clone (II+III) of neutrophils was 94.59%. The clone was stable until 48 hr at room temperature and until 72 hr at 4°C.

한 후에는 검사를 진행하지 않아 최장 기간은 확인할 수 없었지만 임상에서 검체 채취 후 7일을 넘긴 후 검사를 시행할 일은 거의 없을 것으로 생각된다. 호중구의 경우는 실온 48시간, 냉장 72시간까지 안정하였으며 냉장보관한 경우가 실온보관한 경우에 비해 분석 가능한 호중구의 비율이 더 높았다. 특히 두 번째 PNH 환자의 경우 즉시 검사한 경우 분석한 호중구 PNH 세포의 수가 51,554개였는데 실온보관 48시간 이후 시행한 검사에서는 3,454개로 1/10 이상 감소하였기 때문에(Table 1), PNH 클론의 수가 원래 적은 환자의 경우는 위음성이 있을 수도 있겠다. 따라서 검체를 냉장 보관하는 것이 분석민감도를 더 높일 수 있으리라 생각한다.

본 연구에서 아쉬운 점은 분석한 검체의 수가 적었고 적혈구를 분석할 때 PE 부착 CD235a 항체와 FITC 부착 CD59 항체를 사용하였다는 점이다. 항CD235a-FITC 대신 항CD235a-PE를 사용하면 검사 과정에서 적혈구 응집이 더 잘 일어나고 PNH 클론의 종류를 구분하기 어렵다[2] (Fig. 2). 따라서 분석할 때 type II와 type III를 구분하지 않고 전체 PNH 클론으로 분석하였다. 48시간에 시행한 적혈구 분석에서 획득한 전체 적혈구 수가 매우 적었고 72시간에 시행한 적혈구 수는 많았는데, 그 이유를 1) 검사 과정에서 적혈구 응집에 따른 세포 소실의 정도에 따른 변이, 혹은 2) 죽은 세포의 파편에 의한 잡음(noise) 신호의 증가 때문으로 추측하였으나, 현재 그 정확한 이유는 알 수 없다. 세척이나 vortex를 잘 해주면 완

화가 된다고 하나 CD235a 항체에 PE가 아닌 FITC가 부착된 시약을 사용하여 주변 적혈구 응집을 확실하게 줄일 수 있다[2]. 호중구의 경우는 type II와 III를 구분할 수 있었으나 적혈구와 마찬가지로 Type II와 III를 합친 전체 PNH 클론으로 분석하였다.

최근에는 FLAER를 사용하는 표준화된 방법에 0.01%를 결정치로 설정하라고 추천되고 있다[2, 9, 10]. 이렇게 적은 양의 PNH 클론을 검출하기 위하여 시약 및 검사법의 발전도 중요하겠지만 검사 전 검체의 질을 잘 관리하는 것도 중요할 것이다. 본 연구가 실제 유세포 검사실에서 PNH 검사를 시행하는 데 검체의 질 관리에 도움이 될 것으로 생각한다.

요 약

배경: 발작야간혈색소뇨증(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)의 유세포분석은 검체의 질에서부터 검사법에 이르기까지 많은 영향을 받지만 PNH 클론의 안정성에 대한 연구는 부족한 실정이다. 그래서 보관시간과 보관온도에 따라 검체의 질이 어떻게 달라지는지 분석하고자 연구를 시행하였다.

방법: 6명의 환자의 말초혈액으로 검사를 시행하였다. 그중 2명은 PNH 환자였다. 모든 검체는 검사실 도착 즉시 검사를 시행하였고 검체를 나누어 하나는 실온(20–25°C)에 보관, 하나는 냉장(4°C)보

관을 하고 24, 48, 72시간과 7일 뒤 검사를 시행하였다. 적혈구 분석을 위해 항CD59-FITC (Beckman Coulter, USA), 항CD235a-PE (Beckman Coulter)를 사용하고 호중구를 분석하기 위해 fluorescein-labeled proaerolysin (Cedarlane, Canada)과 항CD15-PE (Beckman Coulter), 항CD24-PC5 (Beckman Coulter), 항CD45-PC7 (Beckman Coulter)을 사용하였다. FC500 유세포 분석기(Beckman Coulter)를 사용하였고 통계학적으로 시간과 온도에 따른 변화를 보기 위하여 일반화추정방정식을 사용하였다.

결과: 분석가능한 적혈구의 비율과 PNH 클론의 크기에 대하여 실온보관군과 냉장보관군을 비교하였을 때 통계적으로 유의한 차이가 없었고, 두 군에서 모두 검체 보관 기간 7일까지도 유의한 차이가 없었다. 분석한 호중구의 비율은 시간이 지남에 따라 감소하였고($P<0.001$) 냉장보관한 경우가 처음 검사 시와 더 유사한 값을 보였다($P=0.014$). 호중구의 PNH 클론의 크기는 실온 48시간, 냉장 72시간까지 안정하였고 7일째는 분석이 불가능하였다.

결론: 적혈구 분석은 7일까지 검사 가능하였고, 호중구는 시간이 지나면서 분석 가능한 세포의 수가 줄어들기 때문에 48시간 이내에 검사를 시행하는 것을 추천한다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

REFERENCES

1. Nakakuma H. Mechanism of intravascular hemolysis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Am J Hematol* 1996;53:22-9.
2. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe 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. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, et al. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 2004;350:552-9.
4. Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, et al. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2007;110:4123-8.
5. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, et al. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 2008;111:1840-7.
6. Sreedharanunni S, Sachdeva MU, Bose P, Varma N, Bansal D, Trehan A. Frequency of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by multiparametric flow cytometry in pediatric aplastic anemia patients of Indian ethnic origin. *Pediatr Blood Cancer* 2016;63:93-7.
7. Sipol AA, Babenko EV, Borisov VI, Naumova EV, Boyakova EV, Yakunin DI, et al. An inter-laboratory comparison of PNH clone detection by high-sensitivity flow cytometry in a Russian cohort. *Hematology* 2015; 20:31-8.
8. Sachdeva MU, Varma N, Chandra D, Bose P, Malhotra P, Varma S. Multiparameter FLAER-based flow cytometry for screening of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria enhances detection rates in patients with aplastic anemia. *Ann Hematol* 2015;94:721-8.
9. Sutherland DR, Keeney M, Illingworth A. Practical guidelines for the high-sensitivity detection and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 2012; 82:195-208.
10. Donohue RE, Marcogliese AN, Sasa GS, Elghetany MT, Redkar AA, Bertuch AA, et al. Standardized high-sensitivity flow cytometry testing for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in children with acquired bone marrow failure disorders: A single center US study. *Cytometry B Clin Cytom* 2018;94:699-704.