

# 사람면역결핍바이러스감염 환자에서 2색 및 4색 유세포분석법을 이용한 T 림프구아형 분석

## Methods for Flow Cytometric Analysis of T Cell Subsets in HIV-infected Patients: 2-Color versus 4-Color

안선현 · 강선주 · 임영애 · 이위교 · 조성란

Sunhyun Ahn, M.D., Seon Joo Kang, M.D., Young Ae Lim, M.D., Wee Gyo Lee, M.D., Sung Ran Cho, M.D.

아주대학교 의과대학 진단검사의학교실

Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

**Background:** Blood CD4+ T lymphocyte (T4) count is a major clinical marker for the diagnosis and management of AIDS, and flow cytometry is considered the gold standard for T4 enumeration. Our aim was to compare the 2-color and 4-color flow cytometric methods for T-cell subset analysis in HIV-infected patients.

**Methods:** T-cell subsets such as T3, T4, T8, and CD3+CD4-CD8- double negative T cells (DN T) were analyzed from the whole blood of 40 HIV-infected patients by using both 2-color and 4-color methods on a Cytomics FC500 analyzer. Statistical analyses using simple linear regression, paired t-tests, and Bland-Altman plots were performed.

**Results:** The measured T3 (%), T4 (%), T4 ( $\mu\text{L}$ ), T8 (%), T8 ( $\mu\text{L}$ ), and DN T (%) differed significantly between the 2 methods ( $P < 0.05$ ), whereas the T4/T8 ratio did not. T3 (%), T4 (%), T4 ( $\mu\text{L}$ ), T8 (%), T8 ( $\mu\text{L}$ ), and T4/T8 measured by the 2 methods showed good correlation, with correlation coefficients above 0.96, whereas DN T (%) did not. The mean differences in T4 (%) and T8 (%) were 0.39% (limit of agreement (LoA), -1.64~2.43) and 1.26% (LoA, -3.37~5.89), respectively.

**Conclusions:** Although there were statistically significant differences in the T cell subsets measured between the 2 methods, the differences were minor, and the 2 methods showed good correlation. As confirmed in this study, DN T (%) estimated by the 2-color method is lower than the actual value. We suggest that although the 2 methods can be used interchangeably, the 4-color method is recommended for the analysis of some specific subpopulations such as DN T (%).

**Key Words:** Flow cytometry, T cell subset, HIV

## 서론

후천성면역결핍증후군(AIDS)은 사람면역결핍바이러스(HIV)에 의한 전염병으로 HIV는 CD4+ 조력림프구(helper lymphocyte)들

**Corresponding author:** Sung Ran Cho

Department of Laboratory Medicine, Ajou University School of Medicine,  
206 Worldcup-ro, Yeongtong-gu, Suwon 443-721, Korea  
Tel: +82-31-219-5780, Fax: +82-31-219-5778, E-mail: sungran@ajou.ac.kr

Received: December 4, 2012

Revision received: June 3, 2013

Accepted: June 14, 2013

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

© 2013, 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.

을 주요 감염 대상으로 한다. 항 HIV 치료는 조력림프구가 혈액 1  $\mu\text{L}$ 당 200개 이하가 되기 전에 시작하여야 하며 200/ $\mu\text{L}$  안팎의 조력림프구가 남아 있을 때 세포면역을 잃은 것으로 간주하게 된다 [1, 2]. 이처럼 혈액 내에 남아 있는 조력림프구의 수를 측정하여 AIDS의 진행 상황을 파악하고 항 HIV 치료 효과를 판정하므로 T 림프구아형검사를 통한 조력림프구 수의 측정은 HIV 감염 환자의 진단과 모니터링의 표준으로 되어 있다[3, 4].

유세포분석법은 우수한 정밀도와 재현성을 보여 T 림프구아형 측정에 있어 가장 보편화된 표준검사법이고[5, 6], 현재 대부분의 국내검사실에서는 2색 유세포분석법을 사용하여 T 림프구아형 분석을 시행하고 있다. 2색 분석법은 4개의 시험관을 준비해야 하므로 검사 시간이 오래 걸리고 HIV에 노출될 위험이 더 높은 단점이 있다. 따라서, 본 연구에서는 1개의 시험관으로 검사가 가능한 4색 분석법을 도입하기 위해 2색 분석법과 4색 분석법 간에 T 림프

구아형 분석 결과를 비교하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 대상

대상은 2012년 3월부터 4월까지 2개월 동안 아주대학교병원 진단검사의학과에 T 림프구아형 분석이 의뢰된 AIDS 환자 40명의 정맥혈 검체였다. 정맥혈 검체는 heparin 항응고제를 사용하여 채혈하였으며 채혈 후 72시간 이내에 검사를 모두 완료하였다. 본 연구는 아주대학교병원 기관연구윤리심의위원회(institutional review board, IRB)의 승인을 받은 후 수행하였다.

### 2. 방법

2색 분석법은 IgG<sub>1</sub>-fluorescein isothiocyanate (FITC) control/IgG<sub>1</sub>-phycoerythrin (PE) control, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD45-FITC/CD14-PE (DiNonA Inc., Seoul, Korea) 시약을 사용하였다. 염색 후 Cytomics FC500 (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) 분석기와 CXP (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

4색 분석법은 CYTO-STAT tetraCHROME CD45-FITC/CD4-Phycoerythrin (RD1)/CD8-Phycoerythrin-Texas Red-x (ECD)/CD3-Phycoerythrin-Cyanin 5 (PC5) (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) 시약을 사용하였고, Cytomics FC500 분석기와 tetraCXP (Beckman Coulter Inc., Fullerton) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 두 분석법 모두 적혈구용혈 및 고정을 위해 T-Q prep (Beckman Coulter Inc., Miami) 장비와 ImmunoPrep (Beckman Coulter Inc., Brea) 시약을 사용하였다.

동일한 검체에 대하여 2색 분석법과 4색 분석법으로 각각 T 림프구아형 검사를 시행하였고, 요약하면 다음과 같다. 2색 분석은 4개의 시험관에 각각 IgG<sub>1</sub>-FITC/IgG<sub>1</sub>-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD45-FITC/CD14-PE 시약 10 µL를 넣고 환자의 전혈 60 µL를 추가하여 혼합하였다. 15분 동안 실온 암소에 보관 후 T-Q prep을 이용하여 적혈구 용해 및 고정을 하고 유세포분석기로 분석하였다. 림프구 gating은 forward scatter와 side scatter를 사용하였다(Fig. 1A). 4색 분석은 1개의 시험관에 CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5 시약 5 µL와 전혈 50 µL를 혼합하였다. 15분 동안 실온 암소에 보관 후 T-Q prep을 이용하여 적혈구 용해 및 고정을 하고 유세포분석기로 분석하였다. 림프구 gating은 CD45와 side scatter를 사용하였다(Fig. 1B).

분석한 T 림프구아형 지표는 CD3+ T 림프구(T3) 백분율(%), CD3+CD4+ T 림프구(T4) 백분율(%), T4 수(/µL), CD3+CD8+ 림프구(T8) 백분율(%), T8 수(/µL), T4/T8 비와 CD3+CD4-CD8- 이중

음성 T 림프구(double negative T cell, DN T) 백분율(%)이었다. 2색 분석법에서 DN T (%)는 [T3 (%)·T4 (%)·T8 (%)] 공식을 이용하여 계산하였다.

### 3. 통계분석

두 검사법 간의 차이를 평가하기 위해 paired *t*-test를 사용하였고, *P* 값이 0.05 미만인 경우에 두 검사법 간 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 해석하였다. 또한, 단순선형회귀분석을 사용한 상관관계수(*r*)의 평가와 Bland 등[7]이 제안한 Bland-Altman plot을 사용하여 limit of agreement (LoA)를 계산하였다.

통계분석 프로그램은 SPSS (version 12.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)와 Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)를 사용하였다.

## 결 과

대상 환자 40명의 평균 연령은 41.6세(23-74)였고, 한 명의 여성 환자를 제외하고는 모두 남성이었다. 환자들의 평균백혈구수는 5,700/µL (2,700-16,900)였고, 평균림프구수는 2,100/µL (700-3,200)이었다.

세 가지 통계적 방법을 사용하여 2색과 4색 유세포분석법을 비교한 결과를 Table 1에 요약하였다. 첫 번째, T3 (%)는 4색 분석법으로 분석 시 2색 분석법보다 평균 1.78%, T4 (%)는 0.39%, T4 (/µL)는 7.17/µL, T8 (%)는 1.26%, T8 (/µL)는 21.75/µL, DN T (%)는 0.65% 높게 측정되었으며, 이는 모두 *P*<0.05로 두 방법 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다(Table 1, Fig. 2). 두 번째, T3 (%), T4 (%), T4 (/µL), T8 (%)와 T8 (/µL)와 T4/T8 비의 상관관계수는 모두 0.96 이상으로 두 검사법 사이에 높은 상관성을 보였으며 DN T (%)의 상관관계수는 0.81로 가장 낮았다. 세 번째, Bland-Altman plot에서 T4 (%)의 평균 차이와 LoA는 0.39%와 -1.64~2.43%였다. T4 (/µL)의 평균 차이와 LoA는 7.18/µL와 -32.55~46.91/µL였다.

## 고 찰

HIV 감염 환자를 감소시키기 위한 전 세계적인 노력에도 불구하고 HIV 감염 환자는 지속적으로 증가하고 있다. 하지만 효과적인 치료약제로 인해 사망자가 감소함에 따라 누적 생존자들은 더욱 증가하고 있다[8]. 이러한 증가 추세는 HIV 감염률이 높은 아프리카 국가들뿐만 아니라 우리나라에서도 관찰되고 있다. 따라서, 우리나라에서도 HIV 감염 환자의 모니터링을 위한 검사의 수요가 지속적으로 증가할 것으로 예상된다.

T4 림프구의 감소는 HIV 감염 환자에 있어 *Pneumocystis cari-*

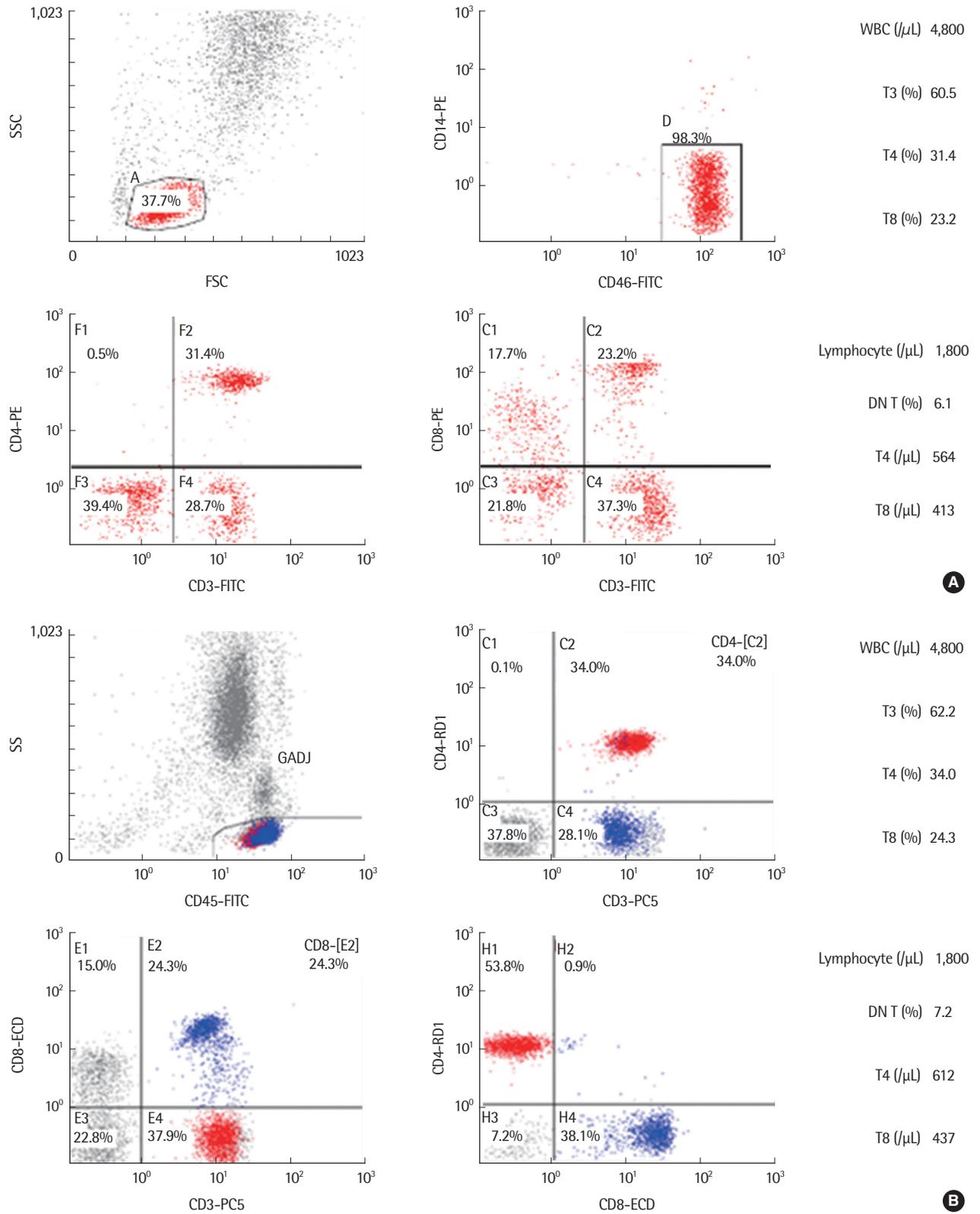


Fig. 1. T lymphocyte subset analyses of a representative patient sample analyzed by the 2-color (A) and 4-color (B) methods. (A) Gating was done with forward scatter and side scatter. CD45 and CD14 were used to measure purity. Absolute counts were calculated from data input from the CBC count and WBC differential count performed before analysis. (B) Gating was automatically set on CD45 and side scatter.

**Table 1.** Summary of statistical analyses comparing the 2-color and 4-color methods for the enumeration of T-lymphocyte subsets in the peripheral blood of HIV-infected patients

	2-color method (mean ± SD)	4-color method (mean ± SD)	P*	r <sup>†</sup>	Average difference <sup>‡</sup>	LoA <sup>§</sup>
T3 (%)	71.3 ± 10.9	73.1 ± 11.5	<0.001	0.964	1.8	-2.6, 6.1
T4 (%)	19.4 ± 7.7	19.8 ± 7.7	0.023	0.982	0.4	-1.6, 2.4
T4 (μL)	402.1 ± 198.9	409.3 ± 200.2	0.031	0.990	7.2	-32.6, 46.9
T8 (%)	48.5 ± 13.8	49.8 ± 14.4	0.002	0.974	1.3	-3.4, 5.9
T8 (μL)	1045.7 ± 507.4	1067.5 ± 508.9	0.001	0.995	21.8	-51.1, 94.6
T4/T8	0.48 ± 0.33	0.48 ± 0.32	0.664	0.996	0.00	-0.01, 0.01
DN T (%)	3.4 ± 2.1	5.5 ± 2.2	<0.001	0.814	0.7	-2.0, 3.3

\*P value by paired t-test; <sup>†</sup> correlation coefficient; <sup>‡</sup> calculated by (4 color method-2 color method); <sup>§</sup> calculated by (mean ± 1.96SD) of the differences. Abbreviations: LoA, limit of agreement; DN T, CD3+CD4-CD8- double negative T cell.

nii 감염과 같은 합병증의 발생 예측, 병기의 분류, 치료 시기 결정에 가장 유용한 지표이다[5, 6]. DN T는 면역조절세포의 기능과 조력림프구의 기능을 겸하고 있어 HIV 감염 시 최대 20%의 DN T에 바이러스가 감염된다고 알려져 있다. DN T 수치는 항바이러스 치료가 성공적일 때 감소하기 때문에 HIV 감염 환자의 모니터링에 사용이 증가되고 있다[10, 11]. 림프구아형 측정을 위해 과거에는 Ficoll-Hypaque 등의 비중액으로 림프구를 분리한 후에 간접면역형광법으로 염색하여 형광현미경으로 분석하였다[12]. 그러나, 1990년대 이후 전혈을 이용하여 2색 혹은 3색 직접면역형광법으로 염색한 후 유세포분석기로 분석하는 방법이 사용되고 있다[13, 14]. 유세포분석법은 정확성과 신속성을 갖춘 검사법으로서 국제보건기구(WHO)에 의해 림프구아형 측정의 표준검사법으로 지정되었다[4, 5].

본 연구에서는 현재 사용하고 있는 2색 분석법을 대체하여 4색 분석법을 도입하기 위하여 두 가지 검사법을 비교하였다. T4/T8 비를 제외한 모든 항목에서 두 검사법 사이에 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 나타났다( $P < 0.05$ ). 그러나 이러한 차이는 통계적으로는 유의하지만 그 결과치의 차이가 작은 것으로 판단되었다. 예를 들면 T4 (μL)의 경우 4색 분석법으로 검사 시 2색 분석법에 비해 평균적으로 7.2 높게 측정되는데 평균 400여 개의 T4 중에서 7-8개 정도의 차이는 임상적으로 작은 것으로 판단되었다. 이러한 방법간의 차이는 기존의 논문에서도 보고되고 있는데[14, 15], 그 원인으로는 분석방법에 따라 사용되는 시약의 항체 특이성이나 gating 방법을 포함한 분석 프로그램의 차이 등을 생각할 수 있다.

Kutok 등[15]의 4색과 2색 분석법 비교 연구에서 T4 (%)와 T8 (%)의 평균 차이가 각각 -0.2%와 0.8%이었고, LoA는 각각 -3.8~3.4%와 -5.6~7.2%이었다. Mbopi-Keou 등[16]의 장비 간 비교 연구에서는 T4 (%)와 T4 (μL)의 평균 차이가 각각 4.1%와 9.6/μL 이었고, LoA는 각각 -16.1~24.4%와 -251~270/μL이었다. 두 연구 모두에서 두 가지 검사법 간 또는 장비 간 결과가 유사하다고 결론 지었다. 이들 연구와 비교해 볼 때 본 연구에서 도출된 평균 차이는 더 작고 LoA는 보다 더 좁은 범위에 있으므로, 2색 분석법 및 4

색 분석법에 의한 결과가 상호 유사하다고 할 수 있다.

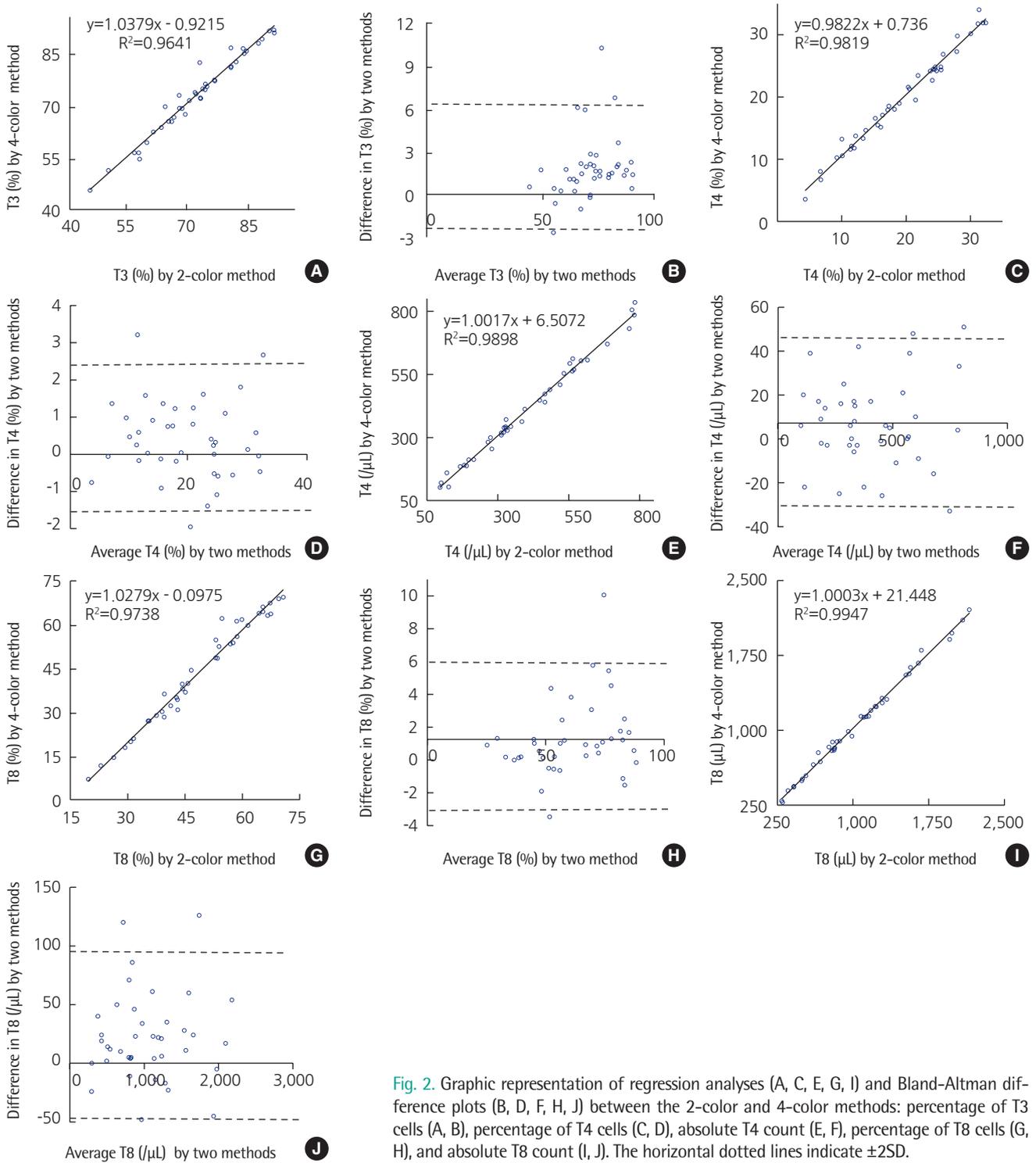
CD3, CD4와 CD8을 포함한 3색 이상을 동시에 분석하면 DN T를 구별할 수 있다[15]. 2색 분석법에서는 DN T를 직접 측정하는 것이 불가능하므로, T3에서 T4와 T8을 빼서 계산하였다. 이 경우 CD4+CD8+ 이중 양성 T 세포가 T4와 T8에 이중으로 포함되므로 부정확하다. 반면에 4색 분석법은 DN T를 직접 측정할 수 있기 때문에 두 방법 간에 차이가 있을 것으로 예상할 수 있다. 본 연구에서도 두 방법 간의 DN T 백분율 결과가 가장 낮은 상관성을 보였다. 따라서 2색 분석을 이용한 DN T 결과 해석은 지양해야 할 것으로 생각된다.

4색 분석법은 2색 분석법에 비해 isotype control이 불필요하고 취급해야 하는 시험관의 수가 적다. 따라서 감염원에 대한 노출을 줄일 수 있고 검사 시간과 비용을 절약할 수 있다. 다만 보정(compensation)이 2색 또는 3색 분석법에 비해 더 복잡하고, 분석에 대한 전문적 지식이 더 필요하다[17, 18]. 결론적으로, HIV 감염 환자의 모니터링을 위해 통상적인 T 림프구아형 검사를 시행할 때 2색이나 4색 분석법 모두 유사한 결과치를 제공한다. 어느 방법을 선택할 것인지는 검사실 사정에 따라 검사자 안전, 검사 시간, 비용, 가용 인적 및 물적 자원 등을 종합적으로 고려해야 한다. 그러나, DN T처럼 좀 더 세밀한 분석이 필요한 특정 아형에 대해서는 3색 이상의 분석법이 권장된다.

## 요 약

**배경:** CD4+ 조력림프구의 수치는 HIV 감염 환자의 진단과 치료에 따른 모니터링에 있어서 가장 중요한 지표 중 하나로 유세포분석법은 CD4+ 조력세포수를 측정하는 림프구아형검사의 표준법으로 인식되고 있다. 본 연구에서는 HIV 감염 환자의 T 림프구아형 분석을 위해 4색 분석법과 기존의 2색 분석법을 비교하고자 하였다.

**방법:** HIV 감염 환자 40명의 전혈을 대상으로 Cytomics FC500 장비로 2색 분석법과 4색 분석법을 각각 이용하여 T 림프구아형 분석을 동시에 실시하였다. 통계적 분석은 회귀분석, paired t-test와



**Fig. 2.** Graphic representation of regression analyses (A, C, E, G, I) and Bland-Altman difference plots (B, D, F, H, J) between the 2-color and 4-color methods: percentage of T3 cells (A, B), percentage of T4 cells (C, D), absolute T4 count (E, F), percentage of T8 cells (G, H), and absolute T8 count (I, J). The horizontal dotted lines indicate  $\pm 2SD$ .

Bland-Altman plot을 사용하였다.

**결과:** T3 (%), T4 (%), T4 (μL), T8 (%), T8 (μL)와 DN T (%)는 두 방법 간의 차이가 통계적으로 유의하였다. DN T (%)를 제외한 T3 (%), T4 (%), T4 (μL), T8 (%), T8 (μL), T4/T8 비의 상관계수는 0.96 이상으로 두 검사법 간에 밀접한 상관관계를 보였다. T4 (%)와 T8

(%)의 두 방법 간 평균 차이는 각각 0.39% (LoA, -1.64~2.43)와 1.26% (LoA, -3.37~5.89)이었다.

**결론:** AIDS 환자의 T 림프구아형 분석에 있어서 4색 분석법과 2색 분석법이 통계적으로 유의한 차이를 보였으나, 결과 값의 차이가 작고 두 방법 간 상관관계가 좋으므로 2색 분석 대신 4색 분석도

사용이 가능하겠다. 또한 DN T (%)의 경우 2색 분석법에서 실제보다 더 낮게 측정됨을 확인하였다. 각 검사실의 정책과 여건에 따라 4색 분석 혹은 2색 분석을 선택 가능하지만 DN T를 포함한 일부 특정 아형 분석을 위해서는 4색 분석법이 권장된다.

### 감사의 글

유세포검사를 수행해 주신 아주대학교병원 진단검사의학과 정혜진 선생님께 감사드립니다.

### REFERENCES

1. Fahey JL, Taylor JM, Detels R, Hofmann B, Melmed R, Nishanian P, et al. The prognostic value of cellular and serologic markers in infection with human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 1990;322:166-72.
2. Fauci AS, Macher AM, Longo DL, Lane HC, Rook AH, Masur H, et al. NIH conference. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic, and therapeutic consideration. *Ann Intern Med* 1984;100:92-106.
3. Hammer SM, Eron JJ Jr, Reiss P, Schooley RT, Thompson MA, Walmsley S, et al. Antiretroviral treatment of adult HIV infection: 2008 recommendations of the International AIDS society-USA panel. *JAMA* 2008;300:555-70.
4. O'Brien WA, Hartigan PM, Martin D, Esinhart J, Hill A, Benoit S, et al. Changes in plasma HIV-1 RNA and CD4+ lymphocyte counts and the risk of progression to AIDS. Veterans Affairs Cooperative Study Group on AIDS. *N Engl J Med* 1996;334:426-31.
5. World Health Organization. Laboratory guidelines for enumerating CD4 T lymphocytes in the context of HIV/AIDS. New Delhi WHO Regional Office for South-East Asia: WHO press, 2007:62-83.
6. Bergeron M, Nicholson JK, Phaneuf S, Ding T, Soucy N, Badley AD, et al. Selection of lymphocyte gating protocol has impact on the level of reliability of T-cell subsets in aging specimens. *Cytometry* 2002;50:53-61.
7. Bland JM and Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1:307-10.
8. UNAIDS and World Health Organization. Progress on global access to HIV antiretroviral therapy: a report on "3 by 5" and beyond. Geneva: WHO press, 2006:24-5.
9. Korea Centers for Disease Control and Prevention. Annual report on the notified HIV/AIDS in Korea. Chungwon: Korea Centers for Disease Control and Prevention, 2012:14.
10. D'Acquisto F and Crompton T. CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response? *Biochem Pharmacol* 2011;82:333-40.
11. Sundaravaradan V, Mir KD, Sodora DL. Double-negative T cells during HIV/SIV infections: potential pinch hitters in the T-cell lineup. *Curr Opin HIV AIDS* 2012;7:164-71.
12. Fletcher MA, Baron GC, Ashman MR, Fischl MA, Klimas NG. Use of whole blood methods in assessment of immune parameters in immunodeficiency states. *Diagn Clin Immunol* 1987;5:69-81.
13. Nicholson JK, Jones BM, Hubbard M. CD4 T-lymphocyte determinations on whole blood specimens using a single-tube three-color assay. *Cytometry* 1993;14:685-89.
14. Nicholson J, Kidd P, Mandy F, Livnat D, Kagan J. Three-color supplement to the NIAID DAIDS guideline for flow cytometric immunophenotyping. *Cytometry* 1996;26:227-30.
15. Kutok JL, Roma AO, Lemire SJ, Dorfman DM. Four-color flow cytometric immunophenotypic determination of peripheral blood CD4+ T lymphocyte counts: a comparison of validity and cost-effectiveness with a two-color method. *Am J Clin Pathol* 1998;110:465-70.
16. Mbopi-Kéou FX, Mion S, Sagnia B, Bélec L. Validation of a single-platform, volumetric, CD45-assisted PanLeucogating Auto40 flow cytometer to determine the absolute number and percentages of CD4 T cells in resource-constrained settings using Cameroonian patients' samples. *Clin Vaccine Immunol* 2012;19:609-15.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. Enumeration of immunologically defined cell populations by flow cytometry; approved guideline. 2nd ed. EP5-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.
18. Luijer J, Cyfra M, Johnson P, Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Lab Hematol* 2004;10:102-8.