



**차세대염기서열분석(Next Generation Sequencing)
임상검사실 인증
검사분야별 가이드라인 - 체세포(Somatic)
[민원인 안내서]**

2018. 2.



식품의약품안전처



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭

**차세대염기서열분석(NGS) 임상검사실 인증
검사분야별 가이드라인 - 체세포(Somatic)(민원인 안내서)**

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	<input type="checkbox"/> 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 : _____)	
	<input type="checkbox"/> 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 '예'에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	<input type="checkbox"/> 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	<input type="checkbox"/> 예(☞지침서) <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	<input type="checkbox"/> 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	<input checked="" type="checkbox"/> 예(☞안내서) <input type="checkbox"/> 아니오
기타 확인 사항	<input type="checkbox"/> 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	<input type="checkbox"/> 예 <input checked="" type="checkbox"/> 아니오
	☞ 상기 질문에 '예'라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	

상기 사항에 대하여 확인하였음.

2018 년 2 월 7 일

담당자
확 인(부서장)

손 미 정
신 준 수

이 안내서는 차세대염기서열분석(Next generation Sequencing, '이하 NGS') 임상검사실 인증 시 검사분야별 고려해야 할 사항 등을 구체적이고 알기 쉽게 설명하거나 식품의약품안전처의 입장을 기술한 것입니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식 ('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다.

또한, 본 안내서는 2018년 2월 현재의 경험과 과학적·기술적 사실을 근거로 작성된 바, 새로운 과학적 사실이 밝혀지거나 관련 규정이 개정 될 경우 추후 변경되거나 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서 등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우, 식품의약품안전처 의료기기정책과에 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-3753 ~ 3779

팩스번호: 043-719-3750



목 차



I. 개요

- 1. 배경 6
- 2. 목적 8
- 3. 적용범위 8

II. 용어의 정의 9

III. 세부 평가 분야 및 기준

- 1. 품질관리체계 11
- 2. 숙련도 17
- 3. 검사성능 17

IV. 신청 및 평가 28

V. NGS 검사분야별 제출사항 체크리스트 29

VI. 참고문헌 30

1. 배경

막대한 양의 염기서열을 저비용으로 정확하게 분석할 수 있는 차세대 염기서열분석 (Next Generation Sequencing, 이하 NGS)기술이 발달하면서 환자에게 제공하는 임상 검사에도 빠르게 도입되기 시작하였다. 대표적인 것이 NGS 기법을 이용한 종양 패널 (Cancer panel)이다. 그러나 검사의 시행 및 분석 과정이 복잡하고 분석 후 나오게 되는 데이터의 양 및 복잡성 때문에 환자를 대상으로 하는 검사에서 정확도 및 신뢰성을 담보할 수 있는 방안이 필요하게 되었다. 이에 미국 병리학회(the College of American Pathologists, CAP)나 미국 의학 유전학회(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG), 미국 FDA 등 외국의 전문가 그룹에서는 NGS 검사의 품질관리, 결과 보고, 패널의 성능 검증 등 각 과정에 대해 가이드라인을 발표한 바 있다. 우리나라에서도 대한병리학회 분자병리연구회를 중심으로 종양 패널 검사에 대한 가이드라인 (Good Laboratory Standards)을 발표하였다.

미국의 경우 NGS 기법을 이용한 임상 검사는 CLIA(Clinical Laboratory Improvement Amendments) 제도를 기반으로 인증받은 검사실별로 허용되고 품질관리가 되고 있다. 우리나라에도 NGS 기술을 활용하여 한꺼번에 많은 유전자를 대상으로 하는 유전자 패널 검사가 필요해지면서 기존의 제도로는 한계를 맞이하게 되어 NGS 임상검사실 인증 제도가 도입되었다. 또한, NGS 검사가 환자에게 안전하고 정확하게 전달 될 수 있도록 이들 검사의 정확성과 임상적 유효성, 그리고 품질유지를 담보하기 위한 검사분야별 특징을 고려하여 각 단계마다 적용할 수 있는 표준 검사기법의 필요성이 커졌다.

종양 패널을 구성할 때는 의학적 효용성, 비용 효용성, 개인정보보호 등을 위하여 과학적 근거가 확보된 유전자로 구성되어야 하며, 이를 위하여 종양 패널에 포함된 유전자의 검사 목적(진단, 치료, 예후 예측 등), 과학적 근거자료, 근거수준(level of evidence)이 기술되어야 한다. 종양 패널의 표적영역은 발견하고자 하는 변이의 종류 (점돌연변이, 유전자 삽입 및 결손, 복제수 변이, 유전자 융합 등)에 따라 변이 호발부위 (hotspot), 엑손, 프로모터, 인트론 등으로 구성할 수 있으며, 각 유전자에서 발견하고자 하는 변이의 종류와 표적영역이 포함하는 염기서열 부위를 기술해야 한다. 또한, 종양

패널은 검사의 정확도를 높이기 위하여 유전체 내의 일부 영역을 농축하여 검사하므로 해당 종양 패널이 어떤 표적농축 방법을 사용하는지 기술해야 한다(예: hybrid capture, amplicon sequencing).

NGS 검사는 핵산 시료의 양과 질, 시약 및 장비의 조건 등이 검사 결과에 미치는 영향이 크므로 패널 구성자는 패널의 최적화 과정을 통하여 품질관리 기준을 정하고 이에 따른 표준수행지침서를 작성해야 한다.

종양 패널은 신선조직, 파라핀조직, 세포병리조직, 순환종양DNA(circulating tumor DNA), 혈액 및 골수 등에 적용될 수 있으며 해당 패널에서 검사 가능한 검체의 종류가 기술되어야 한다. 조직 검체의 경우는 핵산 추출 전 단계에서 현미경 검경을 통하여 검사가 가능한 최소한의 조직의 크기, 세포 수, 종양의 분율 등에 대한 기준이 마련되어야 한다. 정확한 NGS 검사 결과를 얻기 위해서는 종양으로부터 양질의 핵산이 추출되어야 하며 이를 위하여 핵산 추출 방법 및 시약을 최적화해야 하며, 핵산의 양, 길이, 균질도 (integrity) 등에 대한 품질관리 기준을 확립하여야 한다.

정확한 NGS 검사 결과를 얻기 위해서는 표적농축과 라이브러리 제작이 효율적으로 진행되어야 한다. 따라서 표적농축 및 라이브러리 제작 방법 및 시약을 최적화해야 하며, 라이브러리 혹은 핵산증폭의 적절성을 평가하는 품질관리 기준을 확립하여야 한다. NGS 검사는 한 번의 검사에 여러 개의 검체를 검사하므로 각 검체를 구별할 수 있는 표지자를 부착하여야 한다. 또한 이 과정에서 교차오염 방지를 위한 대책을 마련해야 한다.

위에서 사용되는 품질관리 기준은 패널의 실험 조건의 최적화 및 검사성능평가 단계를 거치면서 확립되어야 한다. 성능평가는 변이정보가 잘 알려진 표준물질(정상세포주, 종양 세포주)과 실제 검사에 이용되는 신선조직, 파라핀조직, 세포검체, 순환종양DNA 등을 사용하여 평가되어야 하며, 민감도 및 특이도, 최소검출한계, 정확도, 반복성 및 재현성, 보고가능범위 등의 항목에 대한 종합적 평가 결과를 갖추어야 한다.

2. 목적

본 가이드라인은 「의료기기 허가·신고·심사 등에 관한 규정」 제20조의2 및 「차세대염기서열 분석(NGS) 임상검사실 인증 가이드라인」에 따라 차세대 염기서열분석(Next Generation Sequencing, 이하 NGS) 임상검사실 인증 시, 체세포 변이(Somatic Variants) 중 특히 종양패널 검사를 실시하는 임상검사실이 품질관리체계, 숙련도, 검사성능을 평가하고 유지할 수 있도록 고려해야 할 사항 또는 권고사항을 제시하고 업무 관련자의 이해를 돕고자 하는데 그 목적이 있다.

3. 적용범위

본 가이드라인은 체세포 변이의 탐색, 특히 종양(고형성 암 또는 혈액암)을 대상으로 검사를 시행하는 유전자검사기관으로 신고된 NGS 임상검사실에 적용될 수 있다.

시퀀스 변이 (Sequence Variant) 혹은 유전변이 (Genetic Variant)

대다수 DNA 뉴클레오타이드 시퀀스와 다르게 서열 변경이 일어난 변이. '변이 (variant)'라는 용어는 양성(benign) 혹은 병원성(pathogenic) 혹은 중요도가 알려지지 않은(unknown significance) 경우 등 다양한 경우들에 모두 사용될 수 있음. 최근 돌연 변이(mutation) 이라는 용어보다 더 많이 사용되는 추세임.

생식세포 변이 (Germline variant)

생식세포(germline), 즉, 난소와 정자에서 발생한 유전 변이. 이 변이들은 자손에게 전달 될 수 있음. 종양 조직을 시퀀싱하는 경우에는, 종양세포 특유의 변이가 아닌 환자가 가진 원래의 변이를 의미하는 용어로 사용됨.

체세포 변이 (Somatic variant)

생식세포가 아닌 다른 세포에서 발생한 변이. 자손에게 전달 될 수 없음. 종양 조직을 시퀀싱 하였을 때, 환자의 생식세포 변이와 다른 변이가 발견될 경우 종양 조직 특유의 체세포 변이가 발견된 것으로 추론할 수 있음.

기능 획득 변이 (gain-of-function mutation)

단백질의 기능을 강화하거나 새로운 기능을 획득하게 하는 돌연변이

기능 상실 변이 (loss-of-function mutation)

단백질의 기능을 억제하거나 완전히 없애는 돌연변이

무의미돌연변이 (nonsense mutation)

무의미돌연변이는 DNA 시퀀스에 발생한 변이가 합성하는 단백질의 길이를 짧게 하거나 합성 자체를 불완전하게 하는 경우를 말함. 하나의 아미노산을 합성할 수 있는 3개의 DNA 시퀀스 서열 중 넌센스, 즉 단백질 합성 중단을 의미하는 특정 서열이 단백질 합성을 위한 염기서열 중간에 끼어들어 단백질 합성을 중단시킬 때 발생함. 대부분의 무의미돌연변이는 비기능성 단백질을 만들어내게 됨.

스플라이스 사이트 변이 (splice-site mutation/variant)

엑손과 인트론경계에서 발생하는 염기 서열 변이. 이 변이가 발생하면 RNA 스플라이싱을 방해하여 단백질 합성 시 엑손을 누락시키거나 인트론을 삽입시켜 결과적으로 단백질 코딩 시퀀스를 변화시킴.

틀이동 삽입/결손 변이 (frameshift insertion/deletion mutations)

아미노산을 합성하는 3개의 염기서열 변이가 이어지는 DNA 시퀀스 중 3배수가 아닌 수로 뉴클레오타이드가 끼어들거나 삭제되어 코돈의 정상 서열을 파괴하는 변이. 아미노산 합성 서열을 파괴하여 부정확한 단백질이 길거나 짧은 길이로 합성 될 수 있음.

종양-억제 유전자 (Tumor-suppressor gene)

세포 성장을 조절하는 종양 억제 단백질을 만들어내는 유전자. 종양 억제 유전자에 변이가 생기면 종양이 발생할 수 있음.

과오돌연변이 (Missense mutation)

하나의 염기서열 변이가 최종 단백질에서 하나의 아미노산을 변화시키는 것. 이 아미노산은 최종 단백질에 기능이상을 일으킬 수도 있고 그렇지 않을 수도 있음.

변이 선별 (Variant prioritization)

암의 원인이나 치료에 관여하는 것으로 알려지거나 단백질 기능에 손상을 주는 것으로 예측되어 이후 변이 및 유전자에 대한 상세 리뷰에 해당 변이를 포함시키는 것

인실리코 (In-silico)

가상 환경에서의 실험. 유전체 분석에서는 변이의 기능 이상을 예측하는 다양한 알고리즘의 계산 방식을 의미하는 경우가 많음.

유전체 좌표 (genomic coordinates)

변이의 염색체 번호와 해당 염색체 상의 위치

대립유전자 빈도 (Variant allele frequency, VAF)

특정 유전자 위치 (locus)에 대립 유전자가 나타나는 빈도. 인구 집단에서의 빈도를 나타낼 수도 있고 한사람의 조직에서의 빈도를 나타낼 수도 있음.

NGS 임상검사실의 일반적인 품질관리체계, 숙련도, 검사성능을 평가하기 위한 분야 및 기준은 「차세대염기서열분석(NGS) 임상검사실 인증 가이드라인」 및 「차세대염기서열분석(NGS) 체외진단용 의료기기의 성능평가 가이드라인」에 따르며, 체세포 변이(Somatic Variants) 중 종양 패널 검사 특성에 맞는 세부 평가 분야 및 기준 등에 대한 권고사항은 다음과 같다.

1. 품질관리체계

1-5 NGS 검사 및 검사결과 관련 요구사항

가. 검체 채취 및 취급, 검사의뢰 및 검체 접수 등을 포함한 검사 전 절차

- 검사결과의 타당성을 보장하기 위하여, 다음 사항을 포함하는 검사 전 업무 관련 절차를 문서화하고, 이를 준수하여야 한다.

- 1) 검사 가능한 검체의 종류(예: 신선동결조직, 파라핀조직, 세포(cytology), 체액(body fluid), 유리종양유전자(circulating tumor DNA) 등) 및 각각에 대한 최소 필요 검체량에 대한 기준
- 2) 검사 수행이 불가능한 부적합 검체에 대한 기준 및 처리 방법
- 3) 검사 의뢰, 검체 수집 및 운송 절차
- 4) 검사 동의서에는 다음의 사항을 포함할 것을 권장함
 - 가) 질환에 대한 서술
 - 나) 검사에 대한 서술
 - 다) 검사의 원리
 - 라) 검사에서 얻은 결과의 의미
 - 마) 검사의 한계점 설명

바) 검사결과 수령인과 정보보호

사) 동의서 작성 전과 작성 후에 실시하는 유전상담, 추가검사 및 이에 따른 추가 상담의 가능성

아) 검사대상물의 보관기관

※ 일정 기간 이후 폐기가 원칙이나, 추가 보관을 원하는 경우에는 별도로 요청사항을 명시해야 함. 이는 검사 시행에 대한 동의와는 별개사항임.

자) 서명

5) 잔여 검체의 보관 방법, 보관 기간, 폐기 절차

나. 검사절차의 선택과 검증 및 유효화, 검사지침서, 검사의 수행 등을 포함한 검사 절차

- 검사결과의 타당성을 보장하기 위하여, 다음 사항을 포함하는 검사 업무 관련 절차를 문서화하고, 이를 준수하여야 한다.

1) 핵산 추출, 라이브러리 제작 등 검사 과정에 대한 절차서

2) 라이브러리의 적절성 등 단계별 품질관리(질관리, quality control) 지표 및 관리 방법

3) 검사의 품질관리(질관리, quality control) 지표를 벗어난 검체에 대한 처리지침

4) 검사 과정 중 잠재적 생물학적 위해(biohazard) 등 문제가 발생할 경우 대응 방법

5) 결과 분석 및 해석 절차

가) 생물정보학분석 파이프라인의 검증, 구성체계 및 버전 정보 등

※ 인실리코 예측 도구들은 중등도의 특이도(약 60% ~ 80%)와 손상 효과의 과예측성(over-predicting)을 나타냄. 따라서 변이 분류나 임상 결정에 있어 인실리코 알고리즘 결과만을 이용하는 것은 절대 권장되지 않음.

※ 발견된 변이에 대해 read coverage, variant allele frequency(VAF) 등에 대한 정보는 결과보고서에 포함시키는 것이 권장됨.

나) 변이 분석 및 해석에 이용되는 유전체 데이터베이스(Genome Database)의 종류와 특성, 구성체계 등

※ 종류 및 버전, 데이터베이스에서 사용한 인간 유전체 어셈블리의 버전 확인

다) 종양 변이 분류

- 변이의 임상적 영향에 대한 근거 세기: 2016년 American Society of Clinical Oncology 와 College of American Pathologists 에서는 임상적/실험적 근거들을 강도에 따라 level A,B,C,D로 나누고 있음. 아래 표는 변이 판정에 이용되는 근거의 세기(임상적 중요도)에 따른 분류를 보여줌.

< 변이 판정 시, 임상적/실험적 근거 분류 기준 >

분류	치료적	진단적	예후적
Level A	1)특정 유형의 종양에 대해 FDA 승인된 약물의 반응이나 저항성을 예측할 수 있는 바이오마커 2)특정 유형의 종양에 대해 치료 반응이나 저항성을 예측할 수 있다고 전문가 가이드라인에 포함된 바이오마커	1)특정 유형의 종양에 대해 진단으로서 전문가 가이드라인에 포함된 바이오마커	1)특정 유형의 종양에 대해 예후인자로서 전문가 가이드라인에 포함된 바이오마커
Level B	1)특정 유형의 종양에 대해 치료 반응이나 저항성을 예측할 수 있는 것으로 잘 설계된 연구를 통해 뒷받침되고 그 분야 전문가들의 의견이 모아진 바이오마커	1)특정 유형의 종양에 대해 진단으로 이용할 수 있다고 잘 설계된 연구를 통해 뒷받침되고 그 분야 전문가들의 의견이 모아진 바이오마커	1)특정 유형의 종양에 대해 예후인자로 이용할 수 있다고 잘 설계된 연구를 통해 뒷받침되고 그 분야 전문가들의 의견이 모아진 바이오마커
Level C	1)서로 다른 유형의 종양에서 FDA 승인된 약물의 반응이나 저항성을 예측할 수 있는 바이오마커 2)임상시험의 포함조건을 만족하는 바이오마커	1)여러 개의 작은 연구들에서 진단적 중요성을 나타낸 바이오마커	1)여러개의 작은 연구들에서 예후적 중요성을 나타낸 바이오마커
Level D	1)전임상 연구에서 타당한 치료적 중요성을 보여준 바이오마커	1)그 자체로 혹은 다른 바이오마커와 함께 질환 진단에 도움을 줄 수 있는 것으로 소규모 연구 혹은 증례보고 등에서 알려진 바이오마커	1)그 자체로 혹은 다른 바이오마커와 함께 질환 예후에 도움을 줄 수 있는 것으로 소규모 연구 혹은 증례보고 등에서 알려진 바이오마커

- 유전자 변이의 tier 분류: 위의 근거를 기반으로 유전변이가 종양 상태에 어떤 영향을 주는지에 대한 분류를 4개 계층(tier)으로 분류할 수 있음. 미국 Association for Molecular Pathology (AMP) 와 American Society of Clinical Oncology (ASCO), College of American Pathologist (CAP)에서는 암 조직에서 발견된 변이의 임상적 영향 정도에 따라 변이를 4개의 카테고리 나눌도록 권고하고 있음

< 근거기반 변이 분류 >

- 변이의 임상적 중요성이 매우 클 때 (근거 Level A와 B): tier I
- 변이가 잠재적인 임상적 중요성이 있을 때 (근거 level C와 D): tier II
- 변이의 임상적 중요성이 알려지지 않았을 때: tier III
- 변이가 양성(benign)이거나 양성일 가능성이 클 때: tier IV

<Tier I> 강한 임상적 중요성을 가진 변이	<Tier II> 잠재적인 임상적 중요성을 가진 변이	<Tier III> 미확정된 임상적 중요성을 가진 변이	<Tier IV> 양성(benign)이거나 양성일 가능성이 높은 변이
치료적, 예후적, 진단적	치료적, 예후적, 진단적		
<Level A 근거> FDA 승인 약물이 전문가 가이드라인에 포함	<Level C 근거> 다른 종양에서 FDA 승인 받은 약물 혹은 임상시험 중인 약물 또는, 어느 정도 합의가 된 여러 개의 작은 연구결과들	일반 혹은 특정 인구집단 데이터베이스 혹은 전암 /종양 특이 변이 데이터 베이스에서 상당한 변이 빈도가 보고되지 않음	일반 혹은 특정 인구집단 데이터베이스에서 상당한 변이 빈도가 보고되지 않음
<Level B 근거> 잘 설계된 연구와 해당 분야 전문가들의 합의	<Level D 근거> 전 임상시험 또는 합의 없는 몇 개의 증례보고	종양과 관련되었다는 확실한 문헌 근거가 없음	종양과 관련되었다는 문헌 근거가 없음

라) 생식세포 변이(germline variant)

- 기존에 알려진 임상적 중요성을 가진 생식세포 변이는 보고하도록 권고함 (BRCA 1/2 유전자의 병원성 변이, 가족성 암종 혹은 종양 호발 증후군 발생 관련 유전자).
- 종양조직 단독 검사에서 질환 연관 생식세포 변이가 발견된 것으로 의심 되는 경우 정상 조직 검사를 통해 그 변이를 확인하는 것을 권고함.
- 검사실은 생식세포 변이의 발견과 공개/비공개, 해석과 보고 원칙을 명확히 해야함. 정상조직 DNA 없이 분석을 진행하는 경우, 특정 변이가 체세포 변이 인지 생식세포 변이인지에 대한 추론을 위해 분명한 기준을 밝혀야 함.
- 검사실은 종양 조직에서 발견된 변이의 기원을 확인하기 위해 환자 동의를 거치거나 주치의의 처방을 받아 정상 조직에서의 생식세포 변이 검사를 하는 방침을 수립해야 함.

다. 검사결과에의 검토, 검체의 보관·보유 및 절차 등을 포함한 검사 후 절차

- 검사결과에의 타당성을 보장하기 위하여, 다음 사항을 포함하는 검사 후 업무 관련 절차를 문서화하고, 이를 준수하여야 한다.

- 1) 필요시 양성, 음성, 민감도 대조 물질을 사용하고, 결과를 확인하여 분석의 품질관리를 시행함. 기준 및 빈도 등 절차 문서화
 - ※ 양성/음성 대조물질 또는 표준물질 정보 포함
 - ※ 대조물질의 사용법과 여러 대조물질을 순환식으로 사용하는 경우 알고리즘을 포함
- 2) 검사결과에의 판정 기준, 검사실패의 기준을 포함한 검토 절차
- 3) 검사결과에의 통계(각 암 종별 중요 변이의 비율, 품질관리 지표 향상 등)에 대한 검토 절차. 검사실 책임자는 이를 정기적으로 검토하도록 함
- 4) 잔여 검체의 보관 방법, 보관 기간, 폐기 절차

라. 검사결과에의 보고 절차

- 검사결과에의 보고 관련 절차를 문서화하고, 이를 준수하여야 한다.

- 1) 체세포변이 임상검사 보고서에 포함되는 항목의 예시는 다음 등이 있다.
 - 가) 다음 예시 표의 내용들을 포함하도록 권장함

< 예시 : 종양 패널 보고서 >

항목	내용
환자 식별 ID	병록번호, 나이, 성별, 처방의사
표본 종류	FFPE, fresh frozen, ctDNA, cytology
병리진단	Lung adenocarcinoma, colorectal cancer
조직 샘플 식별 ID	병리 번호, 블록 번호
중요 일자	채취 일자, 보고 일자
샘플에서의 종양핵 (tumor nuclei) 비율	30%
발견된 변이	HGVS 변이 명명법에 따른 변이의 상세내용
사용된 참조염기서열 버전	Hg19 build 36
NGS 방법	Amplicon-based 또는 hybridization capture-based
핵심 질관리 매트릭스	Mean target coverage, percentage of selected bases (VAF), cutoff, duplication rate
패널에 포함된 유전자/ 유전체 영역	Exonic regions of gene A,B,C, etc.
해석과 요약	EGFR tyrosine kinase inhibitors (Erlotinib or Gefitinib) 반응성에 예측인자인 EGFR L858R 변이

나) 모든 변이에 대해 Tier를 기반으로 보고함

※ Tier I에서 III는 임상적 중요성이 높은 순으로 보고

※ 보고서 상에는 tier IV나 양성(benign)/양성 가능성이 높은 변이는 보고하지 않는 것이 좋음

다) 필요한 최소한의 시퀀싱 커버리지 기준을 충족시키지 못하는 모든 유전자 또는 핫스팟은 보고서 상에서 실패한 것으로 선언해야 함.

라) 결과 보고는 양성 결과(positive findings)에 국한되어서는 안 되며, 음성 결과는 질환 특이적인 방법으로 보고하는 것을 권장함.

※ 예를 들면, 폐암 환자에서 EGFR 변이가 없음을 기술함.

※ 중요한 유전자 중 불확실한 변이가 있다면 이는 보고서에서 언급이 되어야 함.

바. 임상검사실 정보관리(검사결과에 대한 개인정보 등의 처리절차 및 관리 등)

- 환자 정보, 검사 결과 등의 조회 및 수정을 포함하여 임상검사실의 정보관리에 대한 책임 및 권한 등을 규정하고 이를 준수하여야 한다.

- 환자 정보의 비밀보호 유지를 보장하기 위한 절차 등을 문서화하고 이를 준수하여야 한다.

1) 검사 과정에서 생성된 시퀀싱 자료 및 검사 결과의 보관 방법, 보관 기간, 보안 유지 방법에 대한 절차 등 포함

2) 검사실은 반드시 검사실에서 발견한 변이의 추적과 지속적인 변이 주석을 제공하는 내부(in-house) 데이터베이스를 구축함. 이러한 내부 데이터베이스 구축 시 개인정보 유출 방지를 위한 방안이 반드시 마련되어야 함

3) 자료를 폐기하는 경우, 폐기 절차 등 포함

2. 숙련도

가. NGS 검사 및 검사결과의 해석에 적합한 숙련도평가 프로그램에 참가 여부

- NGS 검사 및 검사결과의 해석에 적합한 숙련도평가 프로그램이 없는 경우, 대체 프로그램을 마련하여야 한다.

- 1) 유전자검사평가원, 대한병리학회, 대한진단검사의학회, CAP proficiency test, UK NEQAS 등의 국내외 숙련도 평가 및 정도관리 프로그램에 참가하거나, 또는
- 2) 대체 프로그램으로 다른 검사실과 비교하는 방법(검사실간 비교, inter-laboratory proficiency test)을 권장하며, 검사실간 비교가 불가능한 경우에는 검사실 내에서 정기적(예: 연 1회 이상)으로 다른 검사 방법과의 비교 등의 방법으로 숙련도 평가 계획을 수립하고 시행할 수 있음

3. 검사성능

3-1 성능평가의 개요

가. 일반사항

- 1) 성능시험의 대조법은 해당 항목에 대해 성능이 잘 규명되어 있는 방법으로 함 (예: 예: Sanger sequencing 방법으로 시행한 gene panel test 등).
- 2) 성능시험법은 실제 사용하는 검사법과 동일하게 시행함
- 3) 성능평가 결과 자료 중 다음을 별도 요약으로 명시함
 - 가) 검사인력, 검사에 사용하는 장비, 소프트웨어 및 그 버전(variant calling, filtering, annotation 등 각 단계마다), 시약, 중요 소모품, 포함된 표준물질 등
 - 나) 시험 Run 수
 - 다) 시험 검체유형과 수(specimen type and number)
 - 라) 검사실이 설정한 시퀀싱 품질지표(quality metrics) 및 threshold 기준
- 4) 성능평가 프로토콜을 작성함

나. 성능평가 프로토콜의 작성

- 1) 사용목적(intended use)에 대한 명시적인 설명으로 시작하여, 검사 가능한 검체의 유형과 성능 평가 항목을 명기해야 함

< 예시 : 성능평가 프로토콜 >

000 Panel KKK version 1 성능평가 프로토콜

- o 사용목적: 000 Panel KKK Ver 1은 암환자의 종양조직을 이용하여 000종 유전자의 SNV, Indel 돌연변이를 표적 심층 염기서열(Targeted deep sequencing)로 조사하여 맞춤 항암치료에 최적화된 검사 플랫폼임.
- o 검체유형: 대부분의 병리검체(파라핀 조직, 생검 조직, 세침흡인 조직)에 적용 가능함.
- o 성능 평가 항목
 - 정확도 (accuracy)
 - 정밀도 (precision)
 - 민감도 (sensitivity)
 - 특이도 (specificity)
 - 보고 범위 (reportable range)
 - 참조 범위 (reference range)
 - 확인 행렬 (validation matrix)
 - 참조방법 (reference method)
 - 성능평가를 위한 검체 목록
 - : 검체 유형 (예, FFPE, 혈액, 골수)
 - : 검출하고자 하는 각 유형의 병원성 변이 (예, SNVs: EGFR L858R)

- 2) 성능평가가 합당하게 설계 혹은 계획되었는지 여부를 조사하기 위하여 확인 행렬 (validation matrix)을 이용하는 것이 권장됨. 확인 행렬은 2차원의 테이블을 사용하여, 행에는 검증 실험 및 검사자 정보를 사용하고 열에는 검체의 구성을 표기함.

< 예시 : 확인행렬 >

NGS 실험수	실험자	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	A	ACC1	LOD11	REPE AT1	LOD42	REPR O2	ACC5	ACC6	LOD24	SPE1	LOD33
2	B	REPR O1	LOD34	LOD12	ACC2	LOD21	REPE AT2	LOD43	ACC7	ACC8	SPE2
3	A	REPR O1	ACC10	REPE AT2	LOD13	ACC10	LOD22	ACC3	LOD31	LOD44	ACC11
4	B	ACC4	LOD41	ACC12	ACC13	REPR O2	REPE AT2	LOD23	ACC14	LOD32	ACC15

- A, B: 성능평가를 수행하는 개별 실험자
- ACC: 정확도, REPEAT: 반복성, REPR: 재현성, LOD: 최소검출한계, SPE: 분석민감도

다. 성능평가를 위한 검체 구성

- 1) NGS 패널 검사의 경우 다수의 유전자를 대상으로 다양한 변이 유형을 검사하는 관계로 검체 유형, 검사 변이(variant) 유형, 타겟 영역(target genomic region)의 특성에 따라 성능 평가의 결과가 상당히 달라질 것으로 예상되므로 검사의 사용 목적에 따라 검체 유형, 변이 유형 등의 특성을 잘 반영하는 특성화된 검체들로 성능평가를 수행하는 것이 바람직함. 예를 들어, 폐암 검사 패널의 경우, 검사의 목적과 관련된 호발부위(hotspot) 변이 즉, EGFR L858R 변이를 포함하는 검체를 포함해야 함.
- 2) 성능 평가 시, 필요한 각 샘플 유형의 수는 임상 서비스 내에서 검사 할 예상 표본 유형에 비례해야 하나, 샘플 유형이 FFPE 조직과 같이 고려사항이 많은 경우 일반적인 환자 샘플에서 예상되는 수에 관계없이 검사 결과에 대한 샘플의 품질 또는 수량의 영향을 결정하기 위하여 추가 성능 평가 샘플을 권장함.
- 3) 다만, 대부분의 패널에서 검출 될 수 있는 모든 병원성 변이를 대표하는 특성화된 샘플을 얻는 것이 쉽지 않으므로, 적절한 검증을 위해 필요한 최소 샘플 수는 적절한 통계적 기법 또는 타당한 근거를 제시하고 설계하는 것이 바람직함. 참고로 아래의 문헌에 따르면, 약 20~80개의 범위 내에서 설정할 수 있음
 - ※ 2017 AMP-CAP consensus recommendation (J Mol Diagn 2017;19:341-365) : 최소 59개 샘플
 - ※ 2017 The Molecular Pathology Study Group of Korean Society of Pathologists (J Pathol Transl Med 2017;51:191-204) : 20~80개 샘플
- 4) 상업적으로 이용 가능한 일부 세포주 (예: HapMap 세포주 NA12878)는 이를 위한 특성화가 잘 되어있어 활용이 가능하며, 검체 유형이 FFPE를 포함할 경우, 기준 세포주를 FFPE화하여 새로운 검사법에서 사용되는 검체에 보다 가깝게 모방할 수 있는 저품질(lower-quality)의 DNA를 생성하여, 잠재적인 시스템적 오류를 탐지하는데 이용될 수 있음.
- 5) 성능평가 검체는 아래의 유형이 포함되어야 하며, 성능평가 프로토콜에 포함되는 것을 권장함.
 - 가) 패널 검사에서 사용되는 검체 유형(예, FFPE, 혈액, 골수)
 - 나) 패널 검사에서 검출하고자 하는 각 유형의 병원성 변이를 가지고 있는 검체 (예: SNVs, indels, CNAs, SVs)

- 다) 패널의 검사 목적 관련된 가장 흔한 돌연변이(common mutation)를 가지고 있는 검체(예: 폐암 패널 검사의 EGFR L858R)
- 라) 생물정보학적 파일(In silico materials)은 생물정보학 과정(dry bench process, bioinformatic analysis)만을 평가하고자 할 때 사용할 수 있음

< 예시 : 성능평가 표준물질 및 세포주 >

아이디	품명	유형	판매처	품명	Unit Size Concentration	변이종류	성능평가항목
SP1	HD701	Genomic DNA	Horizon Discovery	Quantitative Multiplex Reference Standard	1µg 50ng/µl	SNV/ INDEL	Accuracy (PPA, PPV) Sensitivity (LOD)
SP2	HD752	Genomic DNA	Horizon Discovery	Tru-Q0 (100% WT) Reference Standard	1µg 50ng/µl	SNV normal	Accuracy (PPA, PPV) Sensitivity (LOD)
SP3	NA12878	Genomic DNA	Coriell Institute	-	50 µg	Negative	Specificity
SP4	CRL-2321	Cellline	ATCC	HCC1143	약 10 µg	CNV	Accuracy (PPA, PPV) Sensitivity (LOD)
SP5	CRL-2362	Cellline	ATCC	HCC1143 BL	약 10 µg	Matched Normal	
SP6	CRL-2955	Cellline	ATCC	SU-DHL-1	약 10 µg	Fusion	Accuracy (PPA, PPV) Sensitivity (LOD)

< 기존에 검출 또는 알려진 SNV 목록 >

샘플명	유전자	변이	% Expected Allelic Frequency
HD729	ALK	F1174L	5.00%
	BRAF	V600E	8.00%
	BRAF	V600G	4.00%
	EGFR	G719S	16.70%
	EGFR	L858R	4.20%
	FGFR2	S252W	4.00%
	GNAQ	Q209L	5.00%
	IDH2	R140Q	5.00%
	KRAS	G12V	3.80%
	KRAS	G13D	25.00%
	KRAS	Q61L	5.00%
	NRAS	Q61L	5.00%
	PIK3CA	E545K	5.00%
	PIK3CA	H1047R	30.00%

< 기존에 검출 또는 알려진 Indel 목록 >

아이디	유전자	변이	Indel 길이 (bp)	기존에 검출된 변이 allele frequency	Genomic coordinates (hg19)	Reference sequence	Alternative sequence
A2058	PTEN	Deletion	35	35%	chr10:89711905-89711940	GTGTATTATTAT AGCTACCT GTTAAAGAATCAT CTG	G
A253	CDKN2A	Deletion	13	100%	chr9:21974766-21974779	CCGCGGCCGTGGC C	C
	TP53	Deletion	1	100%	chr17:7578390-7578391	CT	C
A549	SMA RCA4	Deletion	23	100%	chr19:11121116-11121139	TGCAGTCCTACTA TGCCGTGGCCC	T

< 기존에 검출 또는 알려진 CNV 목록 >

Tumor 샘플	Ploidy	Normal 샘플	Previously known amplifications (copy number)	Previously known deletions (copy number)	Novel amplifications (copy number)	Novel deletions (copy number)
HCC1143	3-4	HCC1143 BL	CCND1 (12), MYC (8)	-	AKT1 (11), FGF3 (12), FGF4 (12), FGF19 (12), MDM2 (9), SRC (7)	PBRM1 (0)
HCC2218	2	HCC2218 BL	ERBB2 (9)	-	-	CDH1 (0)

< 기존에 검출 또는 알려진 translocation 목록 >

아이디	유전자	기존에 검출된 변이
SU-DHL-1	ALK	NPM1-ALK
NCI-H2228		EML4-ALK
HCC-78	ROS1	SLC34A2-ROS1
LC-2/ad	RET	CCDC6-RET

6) 성능평가 대상이 된 각 검체의 품질 행렬 (quality metrics)를 보여주는 것이 바람직함.

< 예시 : 품질 행렬 >

아이디	총 read	Uniquely aligned read	On target read	Median coverage	% 100X 이상 지역	Sequence error rate
SP1	56,997,382	92%	17,929,700	871	100%	0.34%
SP2	48,694,571	92%	15,462,657	739	100%	0.34

3-2 성능평가

가. 정확도(Accuracy)

- 1) 정확도(accuracy)는 NGS 체세포 변이 분석에 대한 요구를 보다 잘 충족시키기 위해, 양성일치율(PPA, positive percentage agreement)과 양성예측도(PPV, positive predictive value)의 관점에서 기술되는 것이 바람직함.

< 예시 : 양성일치율과 양성예측도 >

NGS 검사 결과	참고방법 또는 참고검체 양성	참고방법 또는 참고검체 음성	Total
양성	A	B	A+B
음성	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

* 양성일치율 (PPA) = $[A/(A+C)]$

: 양성 검사 결과(검출된 변이)와 참고방법(reference method)의 양성 검사 결과가 일치하는 비율)

* 양성예측도 (PPV) = $[A/(A+B)]$

: 양성 검사 결과 (검출된 변이) 중 진 양성 (true positive)인 비율

- 2) 양성일치율(PPA)와 양성예측도(PPV)를 평가하기 위해서는 진 양성 즉, 실제로 존재하는 유전자 변이를 알아야 하는데, 유전변이의 실제 존재 여부는 참고 검체나 참고방법을 사용하여 결정함. 그리고, NGS 방법의 특성상 양성 결과를 설정하기 위한 품질 지표와 기준, 예를 들어 coverage, quality를 명시하여야 함.

< 예시 : 정확도 설정을 위한 품질 지표 >

Mean target coverage	% Target Not Covered	% Target bases covered 30X	Quality score
> 100X	< 1%	> 85%	Q30 > 85%

- 3) 성능평가의 결과는 돌연변이 유형에 따라 달라지므로 양성일치율(PPA)과 양성예측도(PPV)는 각 변이 유형에 따라 각각 결정되어야 함(예: SNV, small indel, CNV, SV). 또한, 검사의 성능을 평가하는 것이므로, 반드시 병원성 변이 (pathogenic variants)를 포함할 필요는 없으나 가능하면 포함하는 것을 권장함.

< 예시 : 정확도 성능평가 >

변이 유형	총 변이 수*	검출된 변이수 (진 양성)	검출되지 않은 변이수 (위 음성)	위 양성	PPA	PPV
SNV	492	332	160	0	67.5%	100%
Indel	14	13	1	0	92.9%	100%

* 총 변이 수는 참고검체의 알려진 변이 수 중 최소품질 기준을 만족하는 변이의 숫자임

< SNV의 PPA/PPV 계산 >

NGS 검사 결과	참고방법 또는 참고검체 양성	참고방법 또는 참고검체 음성	Total
양성	332	0	332
음성	160	NA	NA
Total	492	NA	NA

* 양성일치율 (PPA) = $[A/(A+C)] = 332/(332+160)*100 = 67.5\%$

* 양성예측도 (PPV) = $[A/(A+B)] = 332/(332+0)*100 = 100\%$

나. 정밀도(Precision)

1) 반복성(Repeatability)과 재현성(Reproducibility)의 성능평가를 통하여 관리함

가) 반복성 : 단일 실험 내 정밀도로서 동일 시료를 동일조건에서 반복 실험하여, 얻은 결과의 일치율(repeatability for intra-run). 최소 3개의 검체에 대해 측정하는 것을 권장함.

※ 2017 AMP-CAP consensus recommendation (J Mol Diagn 2017;19:341-365): We recommend that a minimum of three samples should be tested across all NGS testing steps to include all instruments, testing personnel, and multiple lots of reagents

※ 2017 The Molecular Pathology Study Group of Korean Society of Pathologists (J Pathol Transl Med 2017;51:191-204): Ideally, testing at least three samples is recommended to adequately establish precision adequately

나) 재현성 : 재현성은 실험 간 정밀도로서 동일 시료를 동일조건으로 다른 검사자가 다른 날에 반복 실험하여 얻은 결과의 일치율(repeatability for inter-run). 3번의 독립된 다른 실험 배치에서 최소 3일 측정하는 것을 권장함.

다) 성능 평가 이전에 허용 기준을 설정하고, 이를 충족시키지 못하면 오류의 근원을 평가하기 위해 추가적인 정밀 조사가 필요함.

< 예시 : 정밀도 성능평가 >

o 반복성

- 허용기준: 동일 시료를 동일 조건에서 반복 실험하여, 90% 이상 일치하는 결과를 얻는지 여부
→ 98% 일치

검사	검사일	검사자	시료	검출 결과
Run1	20**/00/00	A	HD701 DNA	동일 시료의 3번 반복 실험에서 검출된 alternation의 수는 각각 234, 238, 231개였으며, 이 중 228개가 정확하게 일치함. (97.3%, 95.8%, 99.7%)
Run1	20**/00/00	A	HD701 DNA	
Run1	20**/00/00	A	HD701 DNA	

o 재현성

- 허용기준: 동일 시료를 다른 실험에서 다수의 검사자가 반복 실험하여, 90% 이상 일치하는 결과를 얻는지의 여부 → 93% 일치

검사	검사일	검사자	시료	검출 결과
Run1	20**/00/00	A	HD752 DNA	동일 시료를 서로 다른 검사자가 독립적으로 실험하여 검출된 SNV의 수는 각각 245, 242, 246 었으며, 이 중 228개가 정확하게 일치함 (93.6%, 94.21%, 92.86%)
Run1	20**/00/XX	B	HD752 DNA	
Run1	20**/XX/00	C	HD752 DNA	

다. 민감도(Sensitivity)

- 1) 검체에 포함되어 있는 변이를 검출할 수 있는 최소 allele 비율을 결정하기 위하여 최소 검출한계(LOD, Limits of Detection) 성능평가를 수행함.
- 2) 사용목적에 정의된 각 변이 유형 각각에 대해 최소 검출 한계 (LOD) 를 결정해야 하며, 일반적으로 세포주의 순차적인 희석 실험을 사용함.

< 예시 : 민감도 성능 평가 >

Sample	gene	mutation	Dilutions	Total reads	Variant reads	variant allele frequency, %
EGFR Ex19 del18	EGFR	p.Leu747_Pro753delinsSer	1:1	5,275	898	17.0
			1:2	4,406	414	9.4
			1:4	3,347	156	4.7
EGFR Ex19 SNV	EGFR	p.Ala755Asp	1:1	10,491	1,849	17.6
			1:2	8,721	862	9.9
			1:4	6,596	336	5.1
KRAS Ex2 SNV	KRAS	p.Gly12Cys	1:1	2,026	394	19.5
			1:2	3,961	343	8.7
			1:4	2,674	85	3.2

라. 특이도(Specificity)

- 1) 분석 특이성은 이론적으로 참고방법(reference method)에 의해 검출된 wild type 유전자형(true negative) 당 검사에 의해 측정된 wild type 유전자형인 검사 음성(test negative)의 비율로 결정되나, 많은 수의 잠재적인 변이가 포함되는 전형적인 NGS 암 패널 검사에서는 적용하기 쉽지 않음.
- 2) 따라서 잘 특성화된 여러 임상 샘플에서 시험된 지역에 대해서 참고방법에 의해 결정된 genotype의 평균 검출 횟수를 결정하여 분석 특이도를 결정하는 것이 바람직하며, 일부 세포주(NA12878 혹은 Genome In A Bottle Reference Standards)의 경우 이를 위한 특성화가 잘 되어있어 활용이 가능함.

< 예시 : 특이도 성능 평가 >

Total number of loci tested	2,051
True Negatives confirmed by pre-characterization	2,048
Alleles falsely detected (False Positive)	3

* 분석 특이도: $[\text{True Negative} / (\text{True Negative} + \text{False Positive})] * 100$
 $= [2048 / (2048 + 3)] * 100 = 99.85\%$

마. 결과 보고 범위(Reportable range) 및 참고 범위(Reference range)

- 1) 보고 범위는 유효한 것으로 간주되는 모든 성능평가 결과의 범위로 여기에는 최소 품질 요구 사항, 유효성이 검증된 변이 유형 및 이들에 대한 최소 검출 한계(LOD)를 충족시키는 대상 지역이 포함되어야 함. 이를 통해 어떤 지역, 변이 및 allele burden이 검출되지 않는지를 명확하게 이해할 수 있도록 해야 함.

< 예시 : 보고 범위 >

- o 120개 유전자의 Exon 영역에 대한 Somatic mutation, 36개 유전자의 intron이 관련된 translocation을 확인하고, 이에 대한 결과를 보고.
- o 해당 유전자의 list와 각 영역별 coverage 비율에 대한 자료 추가.
- o 최종 보고 범위는 아래와 같음
 - somatic SNV,
 - somatic indel
 - somatic CNV
 - Structural variation
 - 17곳의 SNP에 대한 Genotype

2) 참조 범위는 정상 값 범위로 양성(benign) 또는 비 병원성으로 간주되는 변이형을 의미하며, 유전 변이의 경우 이것은 정의하기 어려울 수 있으며 시험의 의도된 용도에 따라 다를 수 있음.

가) 유전자형 - 표현형 상관관계에 대한 이해가 완벽하지 않기 때문에 발견된 모든 변이를 보고하기도 하고 임상적으로 의미 있다고 판단되는 경우만 보고할 수도 있음. 다만, 어떤 형태의 변이가 보고될지 또는 않을지를 명확하게 할 수 있도록 해야 함.

나) 보고 범위는 환자 보고서에 포함되는 것을 권장함.

< 예시 : 참조 범위 >

o 총 00개의 정상 DNA를 분석한 결과, C*** V000 database에 somatic variation으로 보고된 유전변이는 검출되지 않았음. 일부 검출된 variation은 기존에 germline variation으로 확인된 변이였음.

3-3 임상적 유효성(Clinical Validity)

임상적 성능평가에는 체세포 검사 NGS 패널의 내용, 검사의 목적, 잠재적인 임상적 민감도와 유용성 및 참고 문헌과 이에 대한 검사실 자체 검토문서가 포함되어야 함

- 1) 체세포 검사 NGS 패널의 검사 결과는 종양의 종류, 부위, 진행정도, 조직의 세포밀도 및 종양분율, 정상인에서의 변이 빈도 등 다양한 원인에 의해 영향을 받기 때문에 NGS 검사의 분석 성능이 완벽하다 하더라도 검사의 임상적 민감도나 특이도가 달라질 수 있음.
- 2) 체세포 검사 NGS 패널을 설계하는 단계에서부터 검사의 임상적 타당도와 유용성을 정의할 수 있어야 함. 이는 체세포 검사 NGS 패널의 검사 목적에 따라 알려진 임상-유전체 데이터베이스, 문헌 및 각종 연구 결과, 전문가 의견 등을 종합하여 패널에 포함될 유전자 및 변이의 종류 등을 설계함으로써 이루어질 수 있음.
- 3) NGS 기술을 이용한 체세포 검사 NGS 패널에서의 임상적 성능 및 유용성에 영향을 미칠 수 있는 요인들은 사례별로 다음과 같음.
 - 가) 검사의 목적
 - 예를 들어 동반진단을 위한 패널은 예후 예측 또는 종양 진단을 위해 사용할 때 민감도가 낮아질 수 있음.
 - 나) 검사의 타겟
 - SNP, CNV만 검사하는 패널 vs fusion 까지 검사하는 패널
 - 다) 종양의 종류
 - 폐 선암종과 신경 교종에서 검출되는 EGFR 수용체 변이의 진단 및 치료적 의미가 다를 수 있음

1. 신규 인증

NGS 임상검사실에 대한 신규 인증을 받고자 하는 경우, 「차세대염기서열분석(NGS) 임상검사실 인증 가이드라인」의 'V. 신청 및 평가'에 따른다.

2. 인증 재검토(갱신)

NGS 임상검사실 인증에 대한 재검토를 받고자 하는 경우, 인증 받은 사항에 대해 갱신된 사항을 제출한다. 이 경우 현장평가는 생략할 수 있다.

가. 품질관리체계

- NGS 검사에 관한 국내·외 검사실 인증(인정) 프로그램에 참여하여 평가되었음을 입증할 수 있는 자료
 - ※ 검사실 인증(인정) 프로그램의 유효기간(예: 1년)에 따라 새로 평가받은 자료를 제출하고, 신규 인증 시 현장평가를 통하여 평가받은 검사실의 품질매뉴얼, 업무지침서, 검사지침서 등에 변경사항이 있을 경우 해당 사항 제출

나. 숙련도

- 가목의 국내·외 인증(인정)프로그램에 참여하여 평가된 NGS 검사에 관한 숙련도 평가(외부정도관리) 결과서
 - ※ 매년 숙련도 평가 프로그램 등에 참여하여(예: 연 2~4회) 평가받은 자료

다. 검사성능

- 해당 임상검사실에서 인증 받은 후 실시한 임상검사 결과 등을 반영하여, 검사성능에 대해 재검증(revalidation)을 실시한 자료
 - ※ 인증 받은 후 실시한 임상검사 등이 없을 경우에는 이를 확인할 수 있는 자료(예: 공문 등)

번호	신규 인증	인증 갱신	제출사항
1	✓	✓	신청 공문 - 유전자검사기관명 및 NGS 임상검사실명 - 담당자(이메일, 전화번호, 팩스) - 검사분야(예: 체세포 변이/생식세포 변이/비침습적 산전 기형아 검사) - 검사명칭(예: ABCD 패널)
2	✓	✓	NGS 검사에 관한 국내·외 검사실 인증(인정) 프로그램 참여 및 평가 결과 - 한국인정기구(KOLAS)의 공인메디컬시험기관 인정서 - 진단검사의학재단의 우수검사실 신입 인증서 - 한국유전자검사평가원의 유전자검사 정확도 평가 인증서 - 대한병리학회의 질 관리 평가 인증서 - 해외 국가의 정부 또는 정부가 위임한 기관으로부터 국제기준(ISO 15189) 또는 국제기준에 동등이상인 기준에 따라 인증된 임상검사실 인증에 관한 자료
3	✓	✓	NGS 검사에 관한 숙련도평가(외부정도관리) 결과서
4	✓	✓	검사성능 평가 자료 - 성능평가계획(방법서), 성능평가 검체구성 - 성능평가결과 및 해석(표 형태의 요약 포함) - 임상적 유효성 ※ 「차세대염기서열분석 체외진단용 의료기기의 성능평가 가이드라인」 및 본 가이드라인을 참조하며, 각 평가항목에 대한 QC 기준 및 판정치 설정에 대한 근거 등 기재 ※ 인증 재검토(갱신) 신청 시, 검사성능에 대하여 재검증(revalidation)을 실시한 자료를 제출
5	✓		검사기기에 관한 자료 - 모양 및 구조, 사용목적, 사용방법, 사용 시 주의사항, 저장방법 및 사용기간, 장비점검 등 관리에 관한 자료, 제조원(소재지 포함) 등 - 인증 신청하고자 하는 NGS 장비의 일련번호 포함
6	✓	✓	유전자검사기관 신고증(변경) 사본
7		✓	검사실 조직도/인력현황과 검사실의 품질매뉴얼, 업무지침서, 검사지침서 등의 품질관리체계 문서 ※ 「차세대염기서열분석 임상검사실 인증 가이드라인」의 ‘II. 평가 분야 및 기준’을 만족하도록 함 ※ 인증 재검토(갱신) 신청 시 변경사항이 있는 경우, 변경대비표 및 변경된 자료를 포함하여 제출

<검사분야별 특징>

1. QIAamp DNA Blood Mini manual
2. Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M, Mafficini A, Malpeli G, Lawlor RT, Scarpa A. DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. PLoS One. 2013 Jun 6;8(6)
3. Qubit® 3.0 Fluorometer user guide
4. Agilent Genomic DNA ScreenTape Assay Quick Guide for 4200 TapeStation System
5. Agilent 2100 Bioanalyzer System Application fo DNA, RNA, Protein and Cell Analysis
6. End to End Sample Quality Control for Next Generation Sequencing Library Preparation and SureSelect Target Enrichment on the Agilent 2200 TapeStation System
7. OncoPrint™ BRCA Research Assay user guide
8. TruSight Cardio Sequencing Kit Protocol Guide
9. 우수검사실 신입인증 심사점검표 분자진단검사(진단검사의학재단)
10. 유전자검사실 현장실사 점검표 분자유전검사(한국유전자검사평가원)
11. Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of ageL ten years of next-generation sequencing technologies. Nat Rev Genet 2016 17(6) 333-351
12. Jihun K, Woong-Yang P, Nayoung KDK, Se-Jin J, Sung-Min C, Chang-Ohk S, Jene C, Young-Hyeh K, Yoon-La C, Hyo Sub S, Jae-Kyung W. Good laboratory standards for clinical next-generation sequencing cancer panel tests. J Pathol Transl Med 2017 51 191-204

<체세포변이(종양패널) 검사>

1. Kim J, Park WY, Kim NKD, Jang SJ, Chun SM, Sung CO, Choi J, Ko YH, Choi YL, Shim HS, Won JK; Molecular Pathology Study Group of Korean Society of Pathologists, "Good Laboratory Standards for Clinical Next-Generation Sequencing Cancer Panel Tests," J Pathol Transl Med. 2017 May; 51(3): 191 - 204.
2. Jennings LJ, Arcila ME, Corless C, Kamel-Reid S, Lubin IM, Pfeifer J, Temple-Smolkin RL, Voelkerding KV, Nikiforova MN; "Guidelines for Validation of Next-Generation Sequencing-Based Oncology Panels: A Joint Consensus Recommendation of the Association for Molecular Pathology and College of American Pathologists." J Mol Diagn. 2017 May;19(3):341-365.
3. Frampton GM, Fichtenholtz A, Otto GA, Wang K, Downing SR, He J, Schnall-Levin M, White J, Sanford EM, An P, Sun J, Juhn F, Brennan K, Iwanik K, Maillet A, Buell J, White E, Zhao M, Balasubramanian S, Terzic S, Richards T, Banning V, Garcia L, Mahoney K, Zwirko Z, Donahue A, Beltran H, Mosquera JM, Rubin MA, Dogan S, Hedvat CV, Berger MF, Puztai L, Lechner M, Boshoff C, Jarosz M, Vietz C, Parker A, Miller VA, Ross JS, Curran J, Cronin MT, Stephens PJ, Lipson D, Yelensky R, "Development and validation of a clinical cancer genomic profiling test based on massively parallel DNA sequencing", Nat Biotechnol. 2013 Nov;31(11):1023-31. doi: 10.1038/nbt.2696. Epub 2013 Oct 20.
4. Horizon Discovery 홈페이지(<https://www.horizondiscovery.com/>)
5. Coriell Institute 홈페이지(<https://catalog.coriell.org>)
6. American Type Culture Collection(ATCC) 홈페이지(<https://www.atcc.org>)
7. Yelensky R, Donahue A, Otto G, Nahas M, He J, Juhn F, Downing S, Frampton GM, Chmielecki J, Ross JS, Zakowski M, Ladanyi M, Miller VA, Stephens PJ, Lipson D, "Abstract 4699: Analytical validation of solid tumor fusion gene detection in a comprehensive NGS-based clinical cancer genomic test", Clinical Research (Excluding Clinical Trials), Clinical Research (Excluding Clinical Trials), AM2014-4699 Published October 2014

8. Aziz N, Zhao Q, Bry L, Driscoll DK, Funke B, Gibson JS, Grody WW, Hegde MR, Hoeltge GA, Leonard DG, Merker JD, Nagarajan R, Palicki LA, Robetorye RS, Schrijver I, Weck KE, Voelkerding KV., "College of American Pathologists' laboratory standards for next-generation sequencing clinical tests", Arch Pathol Lab Med. 2015 Apr;139(4):481-93. doi: 10.5858/arpa.2014-0250-CP. Epub 2014 Aug 25.
9. Fisher KE, Zhang L, Wang J, Smith GH, Newman S, Schneider TM, Pillai RN, Kudchadkar RR, Owonikoko TK, Ramalingam SS, Lawson DH, Delman KA, El-Rayes BF, Wilson MM, Sullivan HC, Morrison AS, Balci S, Adsay NV, Gal AA, Sica GL, Saxe DF, Mann KP, Hill CE, Khuri FR, Rossi MR, "Clinical Validation and Implementation of a Targeted Next-Generation Sequencing Assay to Detect Somatic Variants in Non-Small Cell Lung, Melanoma, and Gastrointestinal Malignancies", J Mol Diagn. 2016 Mar;18(2):299-315.
10. Horizon discovery, "Proficiency Testing and Routine Validation of Molecular Diagnostics", Indian Seminar Series 2015, New Delhi - Monday 12th October 2015
11. Next Generation Sequencing (NGS) Guidelines for Somatic Genetic Variant Detection. Albany, NY: New York State Department of Health. 2016
12. Oncology Molecular Checklist. Albany, NY: New York State Department of Health. 2011

차세대염기서열분석(Next Generation Sequencing) 임상검사실 인증
검사분야별 가이드라인 - 체세포(민원인 안내서)

발행처 식품의약품안전처

발행일 2018년 2월

발행인 류영진

편집위원장 김진석

편집위원 <의료기기정책과>

신준수, 안명수, 이정애, 손미정, 박진숙, 박준모, 김병관, 방수영,
손혜경, 박선미, 홍정훈, 정형석, 우병걸, 이선주, 도미송, 김효진,
송민희, 신재련, 김아름, 김인혜, 윤 정, 류다영, 임지혜, 임준호

<체외진단기기과>

이원규, 류승렬, 안영욱, 우승민, 이용경, 서두원, 김현홍, 남미향,
손미진, 백승엽, 김빛나,정은지

문의처 (우 28166) 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

식품의약품안전처 의료기안전국 의료기기정책과

전화 : 043-719-3753~3779 팩스 : 043-719-3750

식품의약품안전평가원 의료기기심사부 체외진단기기과

전화 : 043-719-4652~4663 팩스 : 043-719-4650



식품의약품안전처



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

(우 28159) 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

식품의약품안전처 의료기기안전국 의료기기정책과

식품의약품안전평가원 의료기기심사부 체외진단기기과

<http://www.mfds.go.kr>