



**차세대염기서열분석(Next Generation Sequencing)
임상검사실 인증
검사분야별 가이드라인 -
비침습적 산전 기형아 검사(NIPT)
[민원인 안내서]**

2018. 2.



식품의약품안전처



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

**차세대염기서열분석(NGS) 임상검사실 인증
검사분야별 가이드라인 - 비침습적 산전 기형아 검사(NIPT) (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.	
<p>상기 사항에 대하여 확인하였음.</p> <p style="margin-top: 20px;">2018 년 2 월 7일</p> <p style="margin-top: 10px;"> 담당자 손 미 정 </p> <p style="margin-top: 10px;"> 확 인(부서장) 신 준 수 </p>		

이 안내서는 차세대염기서열분석Next generation Sequencing, ‘이하 NGS’) 임상 검사실 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 1
- 2. 목적 10
- 3. 적용범위 10

II. 용어의 정의 11

III. 세부 평가 분야 및 기준

- 1. 품질관리체계 15
- 2. 숙련도 19
- 3. 검사성능 19

IV. 신청 및 평가 27

V. NGS 검사분야별 제출사항 체크리스트 28

VI. 참고문헌 29

1. 배경

다운 증후군(Downs syndrome)은 염색체 이상 중 가장 흔한 질환으로 각 세포 내에 정상적으로 2개 존재해야 하는 21번 염색체가 3개 존재하여 나타난다. 다운 증후군은 지능저하와 전형적인 얼굴 모양을 가지며 그 외 특이적인 증상으로는 저혈압, 단두증, 선천성 심장기형, 백내장/근시/원시 등의 눈의 이상, 짧은 손가락, 일자로 가로지른 손금, 항상 입을 벌리고 있는 모양 등이 있다. 또한 면역체계가 약하여 폐렴 등의 감염성 질환에 잘 걸린다. 다운증후군은 인종, 종족, 경제적 환경 등에 관계없이 출생아 600명에서 800명 중 1명의 빈도로 발생하며, 국내에서만 연간 600명 이상의 다운증후군 아이들이 태어난다. 남녀의 비는 약 1.15:1이다. 산모의 연령이 높을수록 발생 빈도가 높아져, 45세 이상에서는 46명 당 1명의 비율로 나타난다. 한국에서는 임신부 전 연령에서 약 1/800의 빈도를 보이고, 25세 미만 산모에서 1/2,100, 36세 이상에서 1/75, 46세 이상에서는 1/3의 빈도가 보고된 바 있다.

에드워즈 증후군(Edwards' syndrome)은 희귀 염색체 질환으로 각 세포내에 정상적으로 2개 존재해야 하는 18번 염색체가 3개가 존재하여 나타난다. 심장기형, 손/발의 사지 기형, 두개골 형태 이상, 얼굴의 형태이상, 척수 수막류, 태내 성장 지연, 제대 탈장 등을 동반한다. 신생아 5,000~7,000명 중 한 명의 빈도로 발생한다. 이 질환은 치명적인 증상이 많기 때문에 90% 이상이 생후 6개월 이내에 사망하고 5%만 1세까지 생존이 가능하다. 또한 어머니의 나이가 많을수록 더 많이 나타난다.

13번 삼염색체증후군(Trisomy 13 syndrome) 또는 파타우 증후군(Patau syndrome)은 희귀 염색체질환으로 각 세포 내에 정상적으로 2개씩 있어야 하는 13번 염색체가 3개 존재하여 나타난다. 두개안면(머리와 얼굴)기형, 작은 안구증, 홍채 결손, 전전뇌증, 선천성 심장기형, 다지증 등을 동반한다.

이러한 염색체 이상은 모든 세포에서 나타나거나, 일부분의 세포에서만 나타나고 이외의 다른 세포는 정상 염색체 쌍을 가지는 경우(섞임증 혹은 모자이시즘)도 있다.

다운 증후군의 출생 전 선별검사는 산모의 나이, 초음파 소견(nuchal translucency), 모체 혈액의 단백질(pregnancy associated plasma protein-A, human chorionic gonadotropin 등) 등을 이용해 왔으며, 5%의 위양성율에서 약 90%의 민감도를 보인다. 이러한 선별 검사는 양성 예측도가 약 5% 정도로 낮기 때문에, 불필요한 융모막검사나 양수검사와 같은 침습적 검사를 시행해야 하는 경우가 많았다. Denis Lo 등은 태반에서 기원한 apoptotic trophoblasts로부터 유래된 cell free fetal DNA(cffDNA)가 산모의 혈장 내에 존재함을 밝혔다. cffDNA는 약 150bp 크기의 잘려진 DNA 조각으로, 임신 4주 이후부터 발견된다. 10주 이후에는 평균 10% 정도가 태반에서 기원한 cell free DNA(cfDNA)이며, 나머지 90%는 모체에서 유래한 cfDNA이다. 분만 2시간 이내 모체 혈장에서는 발견되지 않는다. cffDNA 양은 일반적으로 임신 주수가 증가할수록 증가하고, 모체의 체중이 증가할수록 감소한다.

cffDNA를 이용하여 태아의 염색체 이상에 대한 선별검사가 개발되었으며, 2011년부터 미국과 중국에서 상업적 서비스가 시작되었다. cffDNA를 이용한 비침습적 산전 기형아 검사는 “Noninvasive prenatal test(NIPT)”로 불리고 있으며, 일부 학회에서는 진단적 검사가 아닌 선별검사임을 강조하는 의미에서 “Noninvasive prenatal screening(NIPS)”라고 부를 것으로 권장하고 있다.

염색체 이수성을 검출하는 방법은 크게 1)counting method와 2)single nucleotide polymorphism(SNP) genotyping으로 분류할 수 있다. 모체 혈액을 원심분리하면 혈장, 백혈구연층(buffy coat), 적혈구의 세 층으로 분리되는데, 백혈구 연층은 모체의 유전형 정보를, 혈장은 모체유래cfDNA와 태아유리cfDNA 유전형 정보를 담고 있다. counting method는 모체 혈장의 모든 cfDNA를 시퀀싱하는 전장 유전체 분석과 선별 대상이 되는 염색체에서 유래된 cfDNA만을 시퀀싱하는 targeted massively parallel sequencing으로 분류할 수 있다.

Shotgun massively parallel sequencing : 모체 혈장에 존재하는 모든 cfDNA 조각을 증폭하여 sequencing한 후, 몇 번 염색체에서 유래된 DNA 조각인지를 분류하고 (alignment), 그 개수를 센다(counting). 다운 증후군처럼 21번 염색체가 하나 더 있는 경우에 21번에서 유래된 DNA 조각이 상대적으로 조금 더 많을 것이기 때문에 이 차이를 이용하여 선별해낸다. 예를 들어 정상 태아를 임신한 것을 알고 있는 산모군의 혈장에서 21번 염색체에서 유래한 DNA 조각이 평균 1.5%를 차지하고 표준편차가 0.02인 경우, 검사한 샘플에서 21번 염색체에서 유래한 DNA 조각이 1.58%를 차지한다면 $Z\text{-score}=(1.58-1.5)/0.02=0.08/0.02=4$ 이다. 일반적으로 Z-score가 3 이상인 경우 다운 증후군 고위험군으로 분류 되므로 이 경우 다운 증후군 고위험군으로 분류될 수 있다.

Targeted massively parallel sequencing : 비용을 줄이고, 효율성을 높이기 위해 선별하고자 하는 염색체 13, 18, 21, X, Y에서 유래된 cfDNA 조각만을 선택적으로 증폭하여 시퀀싱한 후에 그 개수를 센다(counting). 정상군과 비교하여 삼염색체(trisomy)나 일염색체(monosomy)를 선별해낸다.

Single nucleotide polymorphism method(SNP) : SNP는 인간집단에서 1% 이상의 빈도로 존재하는 단일 염기서열의 변이로 정의되며, 유전체 변이 중 가장 흔한 것으로 1억 4천만개 이상이 밝혀져 있다(dbSNP build 144). SNP 기반 검사의 경우 혈장(모체 cfDNA + 태반cfDNA)과 백혈구 연층(buffy coat)에 대해서 약 20,000개의 SNP 부위를 다중중합효소연쇄반응(multiplex polymerase chain reaction)으로 증폭한 후 시퀀싱한다. SNP 유전형과 감수 분열 시의 교차 등을 고려하여 태아의 유전형을 추정하는데, 정상, 삼염색체(trisomy), 일염색체(monosomy) 중 가장 가능성이 높은 상태를 유추함으로써 선별해낸다.

Read counting method의 경우 검사의 정확도는 태아분획 및 sequencing depth에 영향을 받으며, 한 문헌에 의하면 태아분획이 5%인 경우 5 million read, 3%인 경우 10 million read를 분석해야 다운 증후군 검출률이 99.9% 이상인 것으로 예측되었다(Prenat Diagn 2014;34:778-83). 일반적으로 태아분획이 4% 이상이 되어야 신뢰성 있는 결과를 도출할 수 있다고 알려져 있으며, 태아분획에 영향을 미치는 중요한 인자로는 재태연령과 산모의 체중으로 알려져 있다. 재태연령 10-20주의 평균 태아 분획은 10% 정도이며, 주당 0.1%씩 증가하고, 재태연령 21주부터는 주당 1%씩 증가한다(Prenatal Diagnosis 2013;33:662-666). 대부분 임상 연구의 경우 특정 재태연령(예: 10-20 completed weeks gestation)에 대해서만 검사의 임상적 민감도와 특이도가 검증되어 있다. 염색체 이수성에 대한 위험도 계산 시 재태연령에 따라 위험도를 교정할 수 있다(삼염색체증은 임신 2삼분기 혹은 만기임신보다 임신 1삼분기에 더 흔하다). 산모의 체중이 높을수록 태아분획은 감소하는데, 태아분획의 중앙값은 11-13주쯤에 약 10%이며, 60kg인 경우 11.7%에서 160kg일 때 3.9%로 감소하는 경향을 보였다. 태아분획이 4%가 되지 않는 산모의 빈도는 60kg일 때 1%, 100kg일 때 6-7%, 160kg일 때, 51.1%로 증가하였다(Prenatal Diagnosis 2013;33:662-666, Ultrasound Obstet Gynecol 2013;41:26-32). 태아분획이 낮은 경우 분석적 민감도를 감소시킬 수 있으며, 정상과 염색체 이수성 사이의 구분이 잘 되지 않아 분석적 특이도를 감소시킬 수 있다. 체중 대신 BMI가 사용될 수 있다.

다운 증후군의 경우 대부분의 문헌에서 99% 이상의 민감도와 특이도를 보인다. 에드워즈 증후군과 파타우 증후군의 경우 다운 증후군에 비해서는 민감도가 떨어지며, 문헌에 따라 80-100%의 민감도를 보이고, 특이도는 모두 99% 이상으로 알려져 있다.

cffDNA를 이용한 NIPT 검사에서 음성인 경우, 13, 18, 21번 삼염색체 태아의 위험이 낮은 것을 의미한다. 또한 다른 염색체 이상을 검사한 경우, 해당 염색체 이상을 가진 태아의 위험이 낮은 것을 의미한다. 그러나 이러한 염색체의 수적 이상 또는 유전적 결함을 완전히 배제할 수는 없으며, 다른 염색체 이상의 위험은 여전히 남아 있다. 위음성의 주요한 원인은 낮은 태아분획을 들 수 있으며, 태아분획에 영향을 주는 요인으로는 재태연령 및 산모의 체중 등과 같은 생물학적 요인과, 혈장분리 지연 등과 같은 기술적 요인을 들 수 있다.

만약 cffDNA를 이용한 NIPT 검사가 양성인 경우, 태아가 해당 염색체 이상을 가질 위험이 높은 것을 의미한다. 그러나 이 검사는 확진 검사가 아니기 때문에 염색체 이상을 진단하기 위하여 임신 10-12주 사이에 융모막 검사나 임신 15-20주 사이에 양수 검사와 같은, 보다 침습적인 검사를 시행해야 한다. 위양성의 주요한 원인으로는 형성 태반섞임증(confined placental mosaicism)이 있으며, 이는 태아염색체는 정상이지만 태반에만 비정상 핵형을 가진 세포가 있는 경우를 의미한다. 그 외 쌍둥이소실(vanishing twin), 산모의 종양, 산모의 염색체 이수성 혹은 반복단위변이(copy number variation) 혹은 섞임증(mosaicism) 등이 알려져 있다.

이 외에 검사의 정확도에 영향을 줄 수 있는 기술적인 요인으로는 검체의 전처리 과정을 들 수 있다. cffDNA의 절대량은 채혈 후 24시간 내에 안정하지만, cffDNA의 DNA의 분획은 산모의 백혈구가 용해되는 과정에서 유리되는 산모유래cffDNA로 인해 감소한다. EDTA 혈장 사용 시 일반적으로 6시간 이내 분리하는 것을 권장한다. EDTA 혈장 분리 시 일반적으로 2차례에 걸쳐 분리하게 되는데, 저속 원심분리를 통해 혈장을 세포층으로부터 분리하고, 초원심분리(ultracentrifugation)를 통해 남아 있을 수 있는 세포 잔해로부터 혈장을 한 번 더 분리한다(예: 1600×g 에서 10분간 냉장 원심분리를 시행하고, 혈장을 다른 튜브에 옮겨 담은 후 16,000×g 에서 10분간 2차 원심분리를 시행한다). 산모의 백혈구를 안정화 시켜주는 첨가제를 사용하는 경우(예: BCT tube) 일반적으로 실온에서 7일 정도 안정한 것으로 알려져 있다.(PNAS 2008;105:20458-20463, Prenatal Diagnosis 2016;36:304-311, Clin Biochem 2013;46:1099-104)

미국 산부인과 학회(American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG)는 13번, 18번, 21번 삼염색체 태아를 임신할 위험이 높은 산모에서 검사 전 유전 상담을 거친 후 cffDNA 검사를 시행할 것을 권장하고 있다. 고위험 산모의 기준은 다음과 같다.

- 산모의 나이가 35세 이상
- 초음파 검사에서 태아의 염색체 이상이 의심되는 경우
- 과거 삼염색체 이상을 가진 임신력
- 임신1분기 혹은 2분기 산전 선별검사에서 양성인 경우
- 부모의 염색체 균형전좌로 다운증후군, 에드워드증후군, 파타우 증후군의 위험도가 증가할 경우

저위험군 산모에서 시행하는 것에 대해서는 유관 학회에서 서로 다른 의견을 보이고 있으며, 미국 산부인과 학회는 저위험 산모에서는 현재까지 충분한 데이터가 없어 cffDNA 검사를 권장하지 않으나(Obstet Gynecol 2015;126:e31-37), 국제산전진단학회(International Society for Prenatal Diagnosis) 및 미국의학유전학회(American College of Medical Genetic sand Genomics)에서는 모든 산모에게 제공될 수 있다는 성명을 발표하기도 하였다(Genet Med 2016;18:1056-1065).

2. 목적

본 가이드라인은 「의료기기 허가·신고·심사 등에 관한 규정」 제20조의2 및 「차세대 염기서열분석(NGS) 임상검사실 인증 가이드라인」에 따라 차세대 염기서열분석(Next Generation Sequencing, 이하 NGS) 임상검사실 인증 시, 비침습적 산전 기형아 검사(Non-Invasive Prenatal Test, NIPT)를 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 산모의 혈장에 존재하는 태아의 cffDNA를 이용하여 태아의 염색체 이수성 여부를 선별하는 검사를 시행하는 유전자검사기관으로 신고된 NGS 임상검사실에 적용 될 수 있다.

검출한계(Limit of Detect, LOD)

검출될 수 있는 분석 물질의 최소량

단위반복변이 (CNV, Copy Number Variation)

유전체 단위반복변이, DNA의 구조적 변형, DNA의 긴 부위의 삽입 또는 결실을 말함

대조물질 (Reference material)

시험물질과 비교할 목적으로 시험에 사용되는 물질

분석물질 (Analyte)

검사실이 수행하는 검사의 물질 또는 구성요소

분석적 민감도 (Analytical Sensitivity)

양성(positive) 검체 중 검사 결과에 의해 정확히 양성으로 판정된 검체의 비율 또는 알려진 변이를 가진 생물학적 시료와 명확히 양성(positive)으로 분류된 시료의 비율

분석적 특이도 (Analytical specificity)

음성(negative) 검체 중 검사 결과에 의해 정확하게 음성으로 판정된 검체의 비율 또는 확인되지 않은 유전 변이를 가진 생물학적 시료와 명확히 음성(negative)으로 분류된 시료의 비율

섞임증 (Mosaicism)

동일한 개체 내 다른 유전 구성의 세포가 존재하는 결과를 초래하는 생물학적 현상으로, 대개 유사 세포 분열의 과정 중에 발생

세포유리 태아 DNA (Cell-free fetal DNA)

태반 기원의 유전물질이며 임신 중 산모 혈액에서 순환함. cffDNA는 임신 1분기부터 산모의 혈액에서 소량 발견되기 시작하여 임신이 지속될수록 증가함. cffDNA는 일반적으로 태아의 발달 과정에서 유전적인 형성을 반영함.

위양성 (False positive, FP)

실제로는 질병이 없음에도 불구하고 질병이 있는 것처럼 양성으로 검사 결과가 나오는 것

☞ 예) 질환에 이환되지 않은 개체에서 비정상적으로 질환에 양성인 것으로 나온 결과

위음성 (False negative, FN)

실제로는 질병이 있음에도 불구하고 질병이 없는 것처럼 음성으로 검사 결과가 나오는 것

☞ 예) 질환에 이환된 개체에서 비정상적으로 질환에 음성인 것으로 나온 결과

임상적 민감도 (Clinical sensitivity)

특정질환을 가지고 있는 사람들 중 검사 결과가 양성으로 나오는 비율

임상적 특이도 (Clinical specificity)

특정 질환을 가지고 있지 않은 사람들 중 검사 결과가 음성으로 나오는 비율

전장 유전체 분석 (Whole Genome Sequencing)

어떤 한 개체의 전체 게놈을 해독하는 염기서열 분석

재현성 (Reproducibility)

다른 측정조건에서 수행된 동일한 측정물의 결과값 사이의 일치도의 근접성

정밀도 (Precision)

규정된 조건 하에서 얻어진 독립적인 검사결과들 가운데 일치도의 근접성

☞ 정밀도는 전형적으로 수치로 표현되지 않지만 비정밀도는 반복 측정값 결과들의 '표준편차' 또는 '변이계수'라는 용어로 정량적으로 표현

정성분석(Qualitative assay)

분석물질의 농도가 아니라 단지 분석물질이 있고 없음을 알려주는 검사 시스템

☞ 양성 검사 결과는 검사신호가 분석 역치를 넘는 것만을 의미하고 판단 기준치 (cut-off value)는 진단 민감도와 특이도의 인위적 조합에 의해 구함

정확도 (Accuracy)

측정치와 참값 사이의 일치도

- ☞ 평가대상 검사법에 의한 다수의 연속적인 결과 값들에서 얻은 평균값과 공인된 참고값(accepted reference value)사이의 일치 근접도(closeness of agreement)

진양성(True positive, TP)

환자의 질병 상태와 검사의 양성판정이 일치하는 결과

진음성(True negative, TN)

환자의 질병 상태와 검사의 음성판정이 일치하는 결과

차세대염기서열분석법(NGS, Next Generation Sequencing)

차세대염기서열분석법(NGS)은 Massive parallel sequencing을 일컫는 말로, 한국어로는 '대용량 염기서열분석법', '대규모 병렬형 염기서열 분석법' 등으로 번역되기도 함. 이 분석법의 기본 발상은 컴퓨터 공학에서 한 작업을 동시에 수행하는 것을 뜻하는 병렬 컴퓨팅(Massively parallel processing)과 유사한데, 하나의 유전체를 무수히 많은 조각으로 분해하여 각 조각을 동시에 읽어낸 뒤, 이렇게 얻은 데이터를 생물정보학적 기법을 이용하여 조합함으로써 방대한 유전체 정보를 빠르게 해독하고자 하기 위함임. 현재는 2세대에 해당하는 NGS 기술 발달에 힘입어 수십만 내지 수십억 개의 서로 다른 대용량 염기서열 분석 반응이 동시에 진행되고 관측되는 기술을 말함.

참고 표준물질/참조제작 (Reference material / Reference preparation, RM)

- 1) 하나 이상의 지정된 양에 대하여 충분히 균질하고 안정하여 측정 시스템의 교정이나 측정 절차의 평가, 또는 같은 종류의 다른 물질의 양의 값과 측정 불확도를 설정하는데 사용되는 물질
- 2) 인증참고물질(CRM) - 기술적으로 입증된 과정에 의해 공인되었고 인증서나 다른 인증기관에 의해 발행된 서류가 있거나 추적 가능한 하나 또는 그 이상의 값을 갖는 참고 물질
 - ☞ a) 인증참고물질(CRM)은 "인증서가 있는 참고물질로서 하나 또는 그 이상의 특성 값이 절차에 따라 공인되며, 그 절차는 특성 값이 표현되는 단위의 정확한 구현에 대한 추적을 할 수 있고, 그것에 대해 각 공인된 값은 신뢰의 명시된 수준에서의 불확실성과 함께한다" 라고 정의

- b) 표준참고물질(SRM)은 인증참고물질(CRM)의 한 이름으로서 과거에 국립 표준원 (NBS)으로 알려졌던 미국정부기관으로, 국립표준기술 연구소(NIST)에 의해 인증 되고 배포되는 인증 참고물질의 상품명

판정기준치 (Cut-off value)

정성검사에서 경계치 이상을 양성으로, 경계치 미만을 음성으로 보고할 수 있는 경계 값

형성 태반 섞임증 (Confined placental mosaicism)

태반에 제한된 핵형이 다른 2가지 이상의 세포주가 소견되며, 태아에서는 소견되지 않음. 형성 태반 섞임증의 경우, 거짓 양성 NIPT 결과가 도출될 가능성이 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, 비침습적 산전 기형아 검사(NIPT) 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) 검사를 시행하기에 부적절한(unacceptable) 검체 및 검사 거절 기준

- 특히, NIPT의 경우 산모 DNA의 오염을 최소화하기 위한 검체 및 검사 거절 기준 포함

2) 검사 의뢰, 검체 수집 및 운송 절차

3) 검사 의뢰서에는 다음의 사항을 포함할 것을 권장함

- 가) 재태 연령 측정치(초음파 측정 기반), 마지막 월경 시작일 혹은 출산예정일
- 나) 산모 생년월일 혹은 출산 예정 시의 산모 연령
- 다) 산모 체중, 키, BMI
- 라) 혈통 정보(Parentage Information) (예 : 체외수정(IVF) 여부 등)
- 마) 단태아 혹은 다태아 여부
- 바) 본인의 염색체 이상 혹은 가족력(전좌 보인자, translocation carriers), 다운 증후군 자녀)
- 사) 염색체 이수성에 대한 사전 위험도(prior risk)(예: 생화학적 표지자 검사 결과, 목덜미투명대(nuchal translucency))

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 절차

2) NGS 검사 수행능 모니터에 사용되는 품질평가 지표(metrics)와 품질관리(질관리, quality control) 변수설정 및 모니터링

※ 예시 : NGS library fragment size distribution, NGS instrument cluster densities, NGS instrument sequence output, quality, error rates

3) NGS 검사 분석능 모니터에 사용되는 품질평가 지표(metrics)와 품질관리(질관리, quality control) 변수설정 및 모니터링

※ 예시 : on target %, average coverage 및 coverage uniformity %, mapping quality 등

4) NIPT 검사 성능 모니터에 사용되는 품질평가 지표(metrics)와 품질관리(질관리, quality control) 변수설정 및 모니터링

※ 예시 : 태아 분획 중앙값, 판정기준치(cut-off value)를 벗어난 샘플의 분획, 분석하는 염색체 별 z-score의 중앙값 혹은 normalized value, 혹은 태아 성별 비율 등

- 5) 검사의 품질관리(질관리, quality control) 지표를 벗어난 검체에 대한 처리지침
- 6) 검사 과정 중 잠재적 생물학적 위해(biohazard) 등 문제가 발생할 경우 대응 방법
- 7) 결과 분석 및 해석 절차
 - 생물정보학분석 파이프라인의 검증, 구성체계 및 버전 정보 등 포함

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

- 검사결과의 타당성을 보장하기 위하여, 다음 사항을 포함하는 검사 후 업무 관련 절차를 문서화하고, 이를 준수하여야 한다.
 - 1) 필요시 양성, 음성, 민감도 대조물질을 사용하고, 결과를 확인하여 분석의 품질 관리를 시행하며, 기준 및 빈도 등 절차 문서화
 - 각 검사대상 염색체 이상 양성 대조물질을 각 분석마다 포함시키기 어려운 경우 적절한 빈도로 양성 대조물질을 사용할 수 있음. 단, 그 기준에 대해 명시되어 있어야 함
 - ※ 양성/음성 대조물질 또는 표준물질 정보 포함
 - ※ 대조물질의 사용법과 여러 대조물질을 순환식으로 사용하는 경우 알고리즘을 포함
 - 2) 검사결과 보고를 위한 내부정도관리 지표 및 허용 기준을 설정되어 있어야 하며, 허용범위를 벗어날 경우 수정조치 방안이 마련되어 있어야 함
 - NIPT의 경우 내부정도관리 지표로 최소 read 수, 최소 read quality score, 허용 가능한 태아 분획(fetal fraction)의 범위 등이 포함될 수 있음
 - 3) 검사결과의 통계(정상 및 비정상결과의 비율, 대립유전자(alleles)의 빈도가 적절하게 이루어지고, 검사실 책임자는 이를 정기적으로 검토하도록 함
 - NIPT의 경우 양성율, 검사 실패율, 결과 도출이 어려운(inconclusive(grey zone)) 결과 비율, 확진검사(음모막 혹은 양수 핵형 검사 등) 결과와의 일치도 등이 포함될 수 있음
 - 4) 잔여 검체의 보관 방법, 보관 기간, 폐기 절차

라. 검사결과에 대한 보고 절차

- 검사결과에 대한 보고 관련 절차를 문서화하고, 이를 준수하여야 한다.

1) NIPT 보고서에 포함되는 항목의 예시는 다음 등이 있음

가) 각 검사 대상 염색체에 대한 정성적, 정량적 결과(예 : z-score, 태아 분획(fetal fraction), 우도비(likelihood ratio)), 참고 범위 혹은 판정기준치(cut-off value), 위험도/카테고리

나) 검사의 민감도, 특이도, 양성 및 음성 예측도

※ 양성 및 음성 예측도는 유병율, 산모의 연령 혹은 생화학적 표지자 결과, 초음파 소견 등에 따라 달라질 수 있다. 검사실의 검사 성능(민감도, 특이도) 및 유병율, 산모 연령 등에 따른 양성 및 음성 예측도를 추정하여 보고서에 제시해야 하며, 다음의 웹페이지를 이용할 수 있다

(<https://www.perinatalquality.org/Vendors/NSGC/NIPT/>).

다) 검사결과 양성인 경우, 후속 진단적 검사(융모막 혹은 양수 핵형 검사 등)의 필요성에 대한 권고

라) 검사의 한계

마) 검사가 실패(test failure or uninformative result)한 경우 후속 조치(초음파, 융모막 혹은 양수 핵형 검사 등의 진단적 검사)에 대한 권고

바) 검사 결과에 따른 보고서 예시(고위험군/저위험군 등)

마. 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) 개인정보 유출 방지를 위한 방안 포함

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: 염색체 핵형 검사, FISH 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(각 단계마다), 시약, 중요 소모품, 포함된 표준물질 등
 - 나) 시험 Run 수
 - 다) 시험 검체유형과 수(specimen type and number)
 - 라) 시행 검사 수

- 마) 검사실이 설정한 시퀀싱 품질지표(quality metrics) 및 threshold 기준
 - 바) QC 합격/불합격 여부
 - 사) 염색체 이수성 여부 판정을 위한 score 기준 및 score 산출의 대략적 방법
 - 아) 검사 성능을 보증하기 위한 depth of coverage 기준
- 4) 성능평가 프로토콜을 작성함

나. 성능평가 프로토콜의 작성

- 1) 사용목적(intended use)에 대한 명시적인 설명으로 시작하여, 검사 가능한 검체 유형과 성능평가 항목을 기재함

< 예시 : 성능평가 프로토콜 >

NIPT version 1 성능평가 프로토콜

- o 사용목적: NIPT Ver 1은 산모의 혈장에 존재하는 태아의 cffDNA를 이용하여 태아의 염색체 이수성 여부를 선별하는 검사임.
- o 검체유형: 혈장
- o 성능 평가 항목
 - 정확도 (accuracy)
 - 정밀도 (precision)
 - 민감도 (sensitivity)
 - 특이도 (specificity)
 - 최소검출한계(limit of detection)
 - 판정기준치(cut-off value)
 - 참조방법 (reference method)
 - 성능평가를 위한 검체 목록
 - : 검체 유형 (예, 혈액)
 - : 검사대상 염색체 이상(예, 다운 증후군, 에드워즈 증후군, 파타우 증후군 등)

- 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, REPRO: 재현성, LOD: 최소검출한계, SPE: 분석민감도

- 3) 검사 대상인 염색체 이상 각각을 성능 평가에 포함함(예: 다운 증후군, 에드워즈 증후군, 파타우 증후군 등)

다. 성능평가를 위한 검체 구성

- 1) 다음 각 분류의 검사 대상 물질을 평가 목적에 따라 사용함

가) 참고 표준물질(reference material): 이는 국제 표준품, 상용 패널, 제조사 제조 표준물질 등으로, 그 특성과 세부 정보가 잘 확립되어 있고 공식 문서로 명시되어 있는 물질임.

나) 검사 대상인 염색체 이상이 없는 정상 대조군 임상 검체(normal clinical specimen)

다) 검사 대상인 염색체 이상이 있는 환자 검체(abnormal clinical specimen)

- 2) 인공 물질(artificial material)만을 사용하여 성능평가를 하는 경우, 임상 검체와 matrix가 영향을 배제할 수 없도록 다른 경우에 matrix effect에 대한 평가를 추가함

- 3) 생물정보학적 파일(In silico materials)은 생물정보학 과정(dry bench process, bioinformatic analysis)만을 평가하고자 할 때 사용할 수 있음

- 4) 검사에서 대상으로 정한 임상 검체 유형(clinical specimen type)에 대해 시행함

- 5) 적절한 검증을 위해 필요한 최소 샘플 수는 적절한 통계적 기법 또는 타당한 근거를 제시하고 설계하는 것이 바람직함.

※ 검체 수 산출 예시: CLSI(Clinical and Laboratory Standards Institute) 가이드라인 EP24-A2(Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves)

3-2 성능평가

가. 정확도(Accuracy)

1) 검체

- WHO international reference standard 물질 등 국제 표준품, 상용 패널, 제조사 제조 표준물질 등 특성이 명시되어 있는 물질을 사용하여 평가할 것을 권장함

※ 현재 상용 패널이 시판되어 있으며, 이는 염색체 이수성을 가진 태반의 영양막 세포 (trophoblast)로부터 추출한 genomic DNA와 정상 여성의 세포로부터 추출한 genomic DNA를 혼합한 후 cfDNA와 유사한 길이로 단편화시킨 물질이다. 또한 염색체 수적 이상이 없는 DNA를 정상 여성의 DNA와 혼합한 후 cfDNA와 유사한 길이로 단편화시킨 상용화된 염색체 이수성 음성 표준물질도 시판되고 있다.

2) 방법

- 검체를 최소 2회 반복 측정하며, 검사 대상 염색체 이상을 모두 포함하도록 함

나. 정밀도(Precision)

1) 검체

- 측정하고자 하는 물질을 포함하는 검체 또는 표준품에 준하는 물질을 사용할 수 있으며, 음성, 양성, 판정기준치 주변 값의 검체를 모두 포함하도록 함.

2) 방법

가) 검사특성에 맞추어 일정 기간 동안 매일 반복 측정하는 계획을 수립하여 시행함.

나) 평가를 시행하기 전 검사방법에 익숙해진 후에 평가를 수행하도록 함.

다) 검사 내(intra-assay) 정밀도 확인을 위하여 run 당 최소 3 회 반복 측정하는 것을 권장함.

라) 검사일 간(inter-assay) 정밀도 확인을 위하여 최소 3일 반복 측정하는 것을 권장함.

마) 장비 간, 검사자 간 정밀도 확인을 위하여 검사실의 특성에 따른 반복 검사의 기준을 수립하고 반복 검사를 실시함.

3) 설명

- 가) 시험결과 및 정밀도를 나타내는 지표(검사 내 정밀도, 검사 간 정밀도, 장비 간 정밀도, 검사자 간 정밀도, 총 정밀도 등)를 제시하도록 함.
- 나) 결과의 일치도를 %로 표기하거나, score의 표준편차 또는 변이계수를 산출하여 기재할 수 있으며, 필요 시 통계처리 과정에서 로그변환을 할 수 있음.

다. 민감도(Sensitivity)

1) 검체

- 가) 확진 검사(양수 핵형 검사, FISH 등)로 검사 대상 염색체 이수성이 양성으로 확인된 임상 검체(혈장)
 - ※ 현재 시판되고 있는 상용 패널의 경우 genomic DNA를 단편화시킨 것으로, 혈장 내 존재하는 cfDNA의 성상과 동일하지 않을 수 있음. 따라서 확진 검사로 대상 염색체 이수성이 검증된 혈장을 포함시켜 평가하는 것을 권장함.
- 나) 검사 대상 염색체 이상을 확인할 수 있는 검체를 포함하도록 함
 - ※ 질환의 발생 빈도가 낮아 양성 임상 검체의 확보가 어려운 경우(예: trisomy 18, trisomy 13) 다음 인증 갱신 심사 일까지 자료를 제출할 수 있음

2) 설명

- 가) 검사 대상 염색체 이상 양성(positive)인 검체 중 검사 결과에 의해 정확히 양성으로 판정된 검체의 비율을 의미함
- 나) 민감도와 함께 신뢰구간(confidence interval)을 제시하도록 함.

라. 특이도(Specificity)

1) 검체

- 가) 확진 검사(양수 핵형 검사, FISH 등)로 검사 대상 염색체 이수성이 음성으로 확인된 임상 검체(혈장)
 - ※ 현재 시판되고 있는 상용 패널의 경우 genomic DNA를 단편화시킨 것으로, 혈장 내 존재하는 cfDNA의 성상과 동일하지 않을 수 있다. 따라서 확진 방법으로 검사 대상 염색체 이수성이 검증된 혈장을 포함시켜 평가하는 것을 권장한다.
- 나) 검사 대상 염색체 이상을 확인할 수 있는 검체를 포함하도록 함

2) 설명

가) 검사 대상 염색체 이상 음성(negative)인 검체 중 검사 결과에 의해 정확히 음성으로 판정된 검체의 비율을 의미함.

나) 특이도와 함께 신뢰구간(confidence interval)을 제시하도록 함.

마. 최소검출한계(Limit of detection)

1) 검체

가) 유전형이 실험적으로 검증되어 있는 세포주나 진단 목적에 적합한 특정질환 세포주, 참조 표준물질 또는 국제 표준품 등을 사용하여 평가할 것을 권장함. 또는 태아분획을 알고 있는 검체의 혼합물을 이용할 수 있음.

※ 현재 다양한 태아 분획으로 제조한 상용 패널이 시판되고 있으며, 이는 염색체 이수성을 가진 태반의 영양막 세포(trophoblast)로부터 추출한 genomic DNA와 정상 여성의 세포로부터 추출한 genomic DNA를 혼합한 후 cfDNA와 유사한 길이로 단편화시킨 물질임.

※ (혈장 혼합물을 통한 최소검출한계 검증 예시) 태아 분획을 알고 있는 aneuploid male fetus를 가진 산모의 혈장검체와 산모가 아닌 여성의 혈장검체를 혼합하여 최종 태아분획이 1-4%가 되도록 혈장 혼합물을 준비함. Aneuploidy 혈장검체는 태아의 염색체 핵형검사 등을 통해 염색체 이수성이 확인된 산모의 혈장을 이용함 (Prenatal Diagnosis 2016;36:304-311).

나) 검사 대상 염색체 이수성을 가진 검체의 비율을 최소 4단계 이상 계대 희석한 검체를 검사하여 민감도를 판정함.

다) 검체 희석 시에는 DNA의 성상이 안정적으로 유지될 수 있도록 일반적으로 DNA 추출에 사용되는 용액을 이용함.

2) 방법

가) 추정되는 검출한계 주변 농도 중 최소 3개의 희석 검체는 3회 이상 반복 검사한다. NIPT의 경우 추정되는 검출한계의 주변 농도 혹은 임상적으로 중요한 검출한계 농도인 4% 부근을 포함하도록 한다.

나) 총 시험 건수 중 95%에서 양성으로 판정될 수 있는 검체의 농도를 프로빗 분석(probit analysis) 등으로 산정하여 최소검출한계를 결정한다. 계산된 값이 실제로 측정되지 않은 농도라면 실제 측정 농도 중 계산값과 가장 가까운 높은 값의 농도로 결정하거나, 계산값에 대해 95% 검출되는지 시험을 통해 재확인하는 것을 권장한다.

3) 설명

가) 참조 표준물질, 국제 표준품을 이용하여 측정할 것을 권장하며 일관되게 검출되는 최소 농도값으로 설정할 수 있음. 일관되게 검출이 가능한 핵산 농도 및 전체 cfDNA 중의 태아분획을 최소검출한계로 설정할 수 있음.

※ 산모의 혈장에는 산모와 태아의 DNA가 혼합되어 있으며, 검사의 정확도에 미치는 중요한 인자 중의 하나로 알려져 있다. 재태 연령 10-20 주의 평균 태아 분획은 10% 정도이며, 일반적으로 태아 분획이 4% 이상 되어야 신뢰성 있는 결과를 도출할 수 있다고 알려져 있다(Expert Rev Mol Diagn 2015;15:111-124). NIPT의 최소검출한계는 aneuploidy가 검출될 수 있는 가장 낮은 태아 분획으로 정의할 수 있으며, NIPT 방법/기법 및 sequencing depth에 따라 달라진다.

나) 통계적으로 유효한 검출 한계치와 설정에 사용된 검체의 종류, 검체 수, 반복회수, 계산법을 함께 제시함. 또한, NIPT의 태아분획의 최소검출한계는 sequencing depth에 의존적이므로 이를 함께 제시하도록 함

다) 검체 유형별(검체의 종류 및 양)로 설정된 최소검출한계를 제시하도록 함.

라) 태아분획의 최소검출한계는 일반적으로 %로 표시함.

바. 판정기준치(cut-off value)

1) 설명

가) 양성결과에 대한 기대 판정기준치를 결정한 근거 자료를 제시하도록 함

나) 측정항목, 측정원리, 판독방법 등에 따라 판정기준치의 설정 방법이 달라질 수 있으므로 전문가 그룹의 자문 등을 거칠 것을 권장함. 일반적으로 NIPT 검사의 경우 z-score 혹은 NCV(normalized copy number) 등으로 설정되며, 검사실 자체적으로 개발한 고유의 score 및 판정기준치를 사용할 수도 있음.

다) 판정기준치가 최소검출한계의 산출을 근거로 설정된 경우에는 해당 자료로 대신할 수 있음.

라) 판정기준치가 공란 한계의 산출을 근거로 설정된 경우 결과분포 및 설정 방법을 명시하도록 함.

마) 검사과정에서 판정기준치를 산정하는 방법을 기재하도록 함

바) 경계범위(gray zone 또는 equivocal zone)가 있을 경우 이를 설정한 근거를 제시하도록 함

※ 판정기준치의 설정이 임상적 판정기준치(민감도, 특이도)를 바탕으로 한 경우, 타당한 임상적 근거를 제시한다.

3-3 임상적 유효성(Clinical Validity)

임상적 성능평가에는 NIPT 검사의 내용, 검사의 목적, 잠재적인 임상적 민감도와 유용성 및 참고문헌(예: 임상적 민감도에 대한 논문 기보고)과 이에 대한 검사실 자체 검토 문서가 포함되어야 함

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

<비침습적 산전 기형아 검사(NIPT)>

1. Kunwoo Kim; Non-invasive prenatal test using cell free DNA. J Korean Med Assoc 2015; 58(11): 995-1002.
2. Jeong In Yang; Clinical application of non-invasive prenatal testing using cell free fetal DNA. J Korean Med Assoc 2014;57(9):771-779.
3. Chiu, R. W., et al. (2008). "Noninvasive prenatal diagnosis of fetal chromosomal aneuploidy by massively parallel genomic sequencing of DNA in maternal plasma." Proc Natl Acad Sci U S A 105(51): 20458-20463.
4. Wang, E., et al. (2013). "Gestational age and maternal weight effects on fetal cell-free DNA in maternal plasma." Prenat Diagn 2013;33: 662-666.
5. Thung, D. T., et al. (2015). "Implementation of whole genome massively parallel sequencing for noninvasive prenatal testing in laboratories." Expert Rev Mol Diagn 15(1): 111-124.
6. Gregg, A. R., et al. "Noninvasive prenatal screening for fetal aneuploidy, 2016 update: a position statement of the American College of Medical Genetics and Genomics." Genet Med 2016;18:1056-1065.
7. "Committee Opinion No. 640: Cell-Free DNA Screening For Fetal Aneuploidy." Obstet Gynecol 2015;126:e31-37.
8. <https://www.seracare.com/>
9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves. CLSI document EP24-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012
10. 희귀질환헬프라인 (<http://helpline.nih.go.kr>)

차세대염기서열분석(Next Generation Sequencing) 임상검사실 인증
검사분야별 가이드라인 - 비침습적 산전 기형아 검사(NIPT)(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>