Korean Society for Genetic Diagnostics

KSGD News Forum

Vol.14
June 2021

ksgd.org | 발행인 서을주 | 간행이사 고대현 | 간행위원 박혜원 김영은 임지숙 | 편집 Hicomp Int.

Focus on
클라우드 기반 NGS 데이터 정보분석

Technology Trend
Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 panel을 이용한 코로나19 바이러스의 Whole Genome Sequencing

Technology Trend 사용자 경험
SARS-CoV-2 유전자 감시를 가능하게 하는 Genexus System

Notable Research
Paternal leakage of mitochondrial DNA and maternal inheritance of heteroplasmy in Drosophila hybrids

최신 보험정보

임상지침
병원체 검출을 위한 다중분자유전검사의 CLSI 검정 지침

연간 후원사 안내

대한진단유전학회
Korean Society for Genetic Diagnostics

클라우드 기반 NGS 데이터 정보분석

김남신

한국생명공학연구원

NGS 데이터의 정보분석에서 많은 연구자들이 가장 어려워하는 부분은 (1) Linux 환경에서 구동되는 소프트웨어의 설치 및 사용 (2) Linux 계산서버의 부재 (3) 대용량 파일의 저장 및 관리의 3가지 문제점으로 요약할 수가 있다. 일반적으로 NGS 데이터는 보통 Exome은 10GB, Genome은 100GB이며, 적절한 장비를 보유하고 있더라도 분석에 필요한 시간은 Genome의 경우 일주일 정도 소요가 된다. 대부분 GATK (Genome Analysis Toolkit, https://gatk.broadinstitute.org)의 권고사항 (Best Practices)을 사용하며 WDL (The Workflow Description Language)로 개발된 Workflow를 다운로드 받아서 Cromwell (https://github.com/broadinstitute/cromwell)로 구동이 가능하다.

Broad Institute에서 개발한 Terra (https://terra.bio)는 클라우드를 Backend로 웹기반의 Jupyter Notebook (https://jupyter.org) 인터페이스에서 구동할 수가 있다. 기본적으로 Python 언어 (https://python.org)를 사용하여 GATK의 권고사항에 따른 정보분석 과정을 수행한다. 일주일 정도 소요되는 분석 시간은 실제 유전체진단 등 활용에 지연이 될 수 있으며, 최근에는 Illumina 社에서는 FPGA (Field-Programmable Gate Array Technology)를 사용한 DRAGEN Bio-IT Platform을 판매하고 있으며 몇 시간 이내에 분석을 완료할 수가 있다. NVIDIA 社에서는 GPU (Graphics Processing Unit)를 사용할 수 있는 Clara Parabricks (https://developer.nvidia.com/clara-parabricks) 라이브러리를 제공하며, 다양한 오믹스 데이터 분석에 필요한 기본 소프트웨어 및 Deep Learning을 이용한 인공지능 소프트웨어를 제공한다.

국내에서는 대부분 Microsoft 社의 Windows를 기본 OS (Operating System)으로 사용하고 있다. Apple 社의 macOS는 Linux 기반의 소프트웨어를 컴파일해서 사용할 수 있는 개발환경을 제공하지만, Windows 환경에서는 매우 제한적이다. 최근에 Microsoft 社는 Linux를 Kernel에 통합할 수 있는 WSL2 (Windows Subsystem for Linux 2, https://docs.microsoft.com/en-us/windows/wsl/install-win10)를 배포하였다. https://wsldl-pg.github.io/docs에서 다양한 Linux 버전에 대한 WSL2를 다운로드 받아서 사용할 수 있다. Linux는 크게 Red Hat과 Ubuntu 계열로 구분되며 시스템 관리 명령어가 다르다.

그러나, Linux를 사용환경을 구축하더라도 NGS 데이터 분석에 사용되는 소프트웨어의 설치는 더 어렵다. BWA (http://bio-bwa.sourceforge.net), SAMTOOLS/BCFTOOLS/HTSLIB (https://www.htslib.org), GATK, SnpEff (http://pcingola.github.io/SnpEff) 또는 ANNOVAR (https://annovar.openbioinformatics.org) 가 사용되며 추가적으로 BEDTOOLS, VCFTOOLS, CROMWELL 등이 필요하다. 소프트웨어의 설치 이외에 다양한 옵션을 모두 이해하기는 매우 어렵다. 모든 클라우드는 사용자가 요청한 자원 (vCPU, vMEM, DISK)을 Docker (https://hub.docker.com)를 OS로 제공한다. 일반적인 계산서버가 직접적으로 연결된 하드웨어 자원을 활용하는 반면, Docker는 OS를 image 파일로 저장하고 바로 구동한다. Docker는 모든 OS에 설치가 되며, 플랫폼에 독립적으로 docker image를 구동 (instance 생성)할 수가 있다. 그렇다면, 여기에 NGS 데이터 분석에 필요한 모든 소프트웨어를 미리 설치하고 저장이 가능하다. https://hub.docker.com 에서 GATK를 검색해 보면, 많은 사람들이 다양한 Linux를 사용하여 정보분석 용으로 제작된 공개 image를 다운로드 받아서 사용할 수가 있다. Broad Institute의 Terra 플랫폼도 docker image를 사용한다.

정보분석 단계를 하나의 묶음으로 연결한 것을 Pipeline이라고 부른다. GATK에서 제공하는 권고사항도 하나의 Pipeline이라고 할 수가 있다. 이전에는 Shell Script로 명령어들을 하나의 텍스트 파일로 묶어서 사용하였다. 다양한 옵션들을 미리 정해놓고 샘플, 코호트의 이름을 변수로 넘겨주고 실행하면 정보분석이 오류가 없이 완료될 때까지 기다리기만 하면 된다. 하지만, 이러한 방식은 클라우드에서 사용하기에는 분산컴퓨팅 환경에 맞지 않아 불편한 점이 있다. 최근에는 이보다 한단계 향상된 WDL 언어로 개발된 Workflow를 사용한다. GATK도 모

든 권고사항을 WDL로 배포하고 있다. GATK3의 Apache 2.0 라이선스에서 GATK4의 BSD-3 라이선스로 변경이 되면서, 전체 분석 절차에 대한 자세한 설명 대신 INPUT 파일을 위한 JSON 포맷 텍스트 파일과 WDL 파일로 전체 Workflow를 제공하고 있다. CROMWELL로 구동되는 WDL은 분산 컴퓨팅 환경에 적합하며, 필요한 vCPU, vMEM 및 interval (chromosome)에 의한 동시 작업 개수를 제한하여 구동할 수 있는 장점이 있다. 물론 계산서버가 구비되어 있을 경우에는 docker 이미지와 WDL Worlfkow를 사용하여 NGS데이터 분석을 수행할 수가 있다. JSON 포맷의 INPUT 파일에서 어떤 데이터를 분석할 것인지 파일의 위치를 입력해 주고 계산을 진행하면 된다.

Linux가 구동되는 계산서버 환경을 어떻게 준비할 것인가? 클라우드를 활용하면 구매 비용으로 수천만원이 드는 계산서버 환경을 마우스 클릭으로 필요한 시간만큼 요금을 지불하고 사용할 수가 있다. 이러한 환경은 Amazon, Microsoft, Google 등 많은 업체에서 제공하고 있다. 예를 들어, Google Cloud (https://cloud.google.com)에서는 콘솔로 들어가서 3가지 환경을 설정한다.

첫번째로 vCPU와 vMEM의 할당을 위한 Compute Engine을 제공하고 있다. VM instance를 생성할 때 주의할 점은 데이터의 저장 보다 인터넷 전송 비용이 더 비싸다는 점이다. 따라서, VM instance는 해외에 생성하지 않고 Region/Zone을 살펴보고 서울 및 Asia 지역으로 한정해야 한다. 그렇지 않으면 각종 파일의 전송에 매우 비싼 요금이 청구될 수가 있다. Exome 및 Genome의 분석에는 매우 고사양 환경이 필요하지 않으므로 실제적으로 vCPU=8, vMEM=30 수준이면 적은 수의 샘플을 분석하기에 적합하다. 클라우드의 장점은 이러한 vCPU/vMEM 자원을 동시에 여러 개 요청이 가능하다는 점이다. 따라서 1개의 데이터 분석에 5일이 소요되면, 10개의 데이터 분석도 5일이 소요된다. 모든 작업을 동시에 자원을 할당 요청하여 진행하기만 하면 된다.

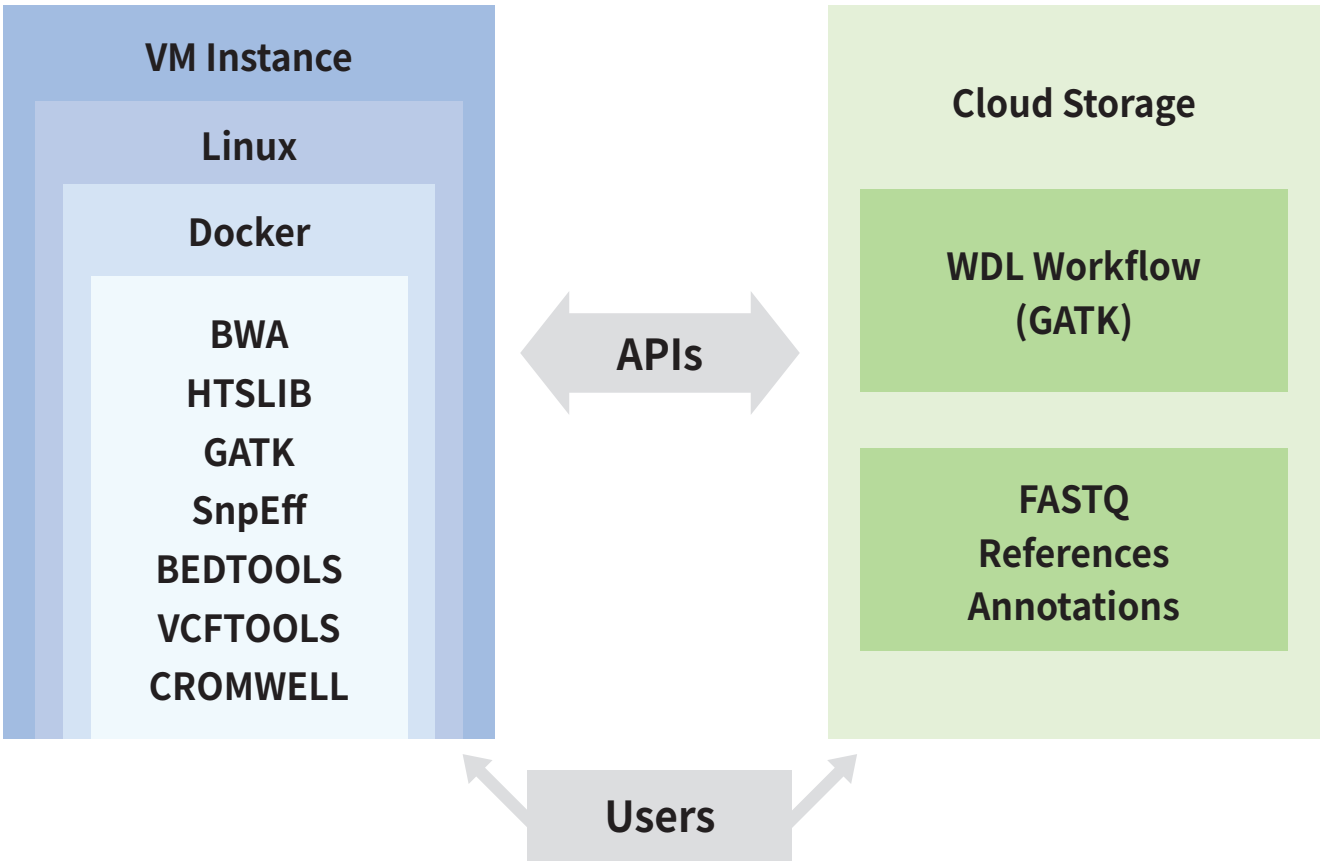
두번째로, 파일을 저장하기 위한 공간이 필요하다. Google Storage (Bucket)은 gs://로 시작하는 URI를 제공하며 Class에 따라 요금은 조금씩 다르지만 Google Drive와 달리 사용하는 만큼만 지불하면 되는 장점이 있다. 단, Google Drive와 Google Storage는 서로 파일을 이동할 수 있는 API가 없다. NGS 데이터 분석은 Compute Engine에서 VM instance를 생성하여 vCPU/vMEM을 할당 받고, 필요한 모든 파일을 미리 Google Storage에 올려 놓은 다음, 분석이 시작되면 이 파일을 복사한다. 모든 데이터 분석 과정이 끝나면 다시 Google Storage로 어떤 OUTPUT 파일들을 복사할지를 지정하면 된다.

세번째로 Container Registry는 docker image를 위한 파일의 보관 및 URI를 제공한다. 사전에 NGS데이터 분석을 위한 모든 소프트웨어를 탑재

한 docker image를 Container Registry에 업로드하면 VM instance에서 URI를 통하여 docker image를 불러와서 실행할 수가 있다. 여기까지 설명한 Google Cloud에서 분석 환경은 API를 통하여 좀더 쉽게 해결이 되는데 APIs & Services 메뉴에 들어가면 lifesciences API를 검색하여 활성화하고 사용할 수가 있다. API는 자원의 할당, Google Storage에서 파일의 복사, 분석 Workflow의 실행, OUTPUT 파일의 복사, 할당된 자원의 반납 등 전반적인 과정을 대행한다.

현재 수백만명의 인간유전체에 대한 NGS데이터가 생산되었고, 전세계적으로 수십 페타바이트(Petabyte = 1000 Terabyte) 분량이라고 예상할 수가 있다. 국외에 있는 파일을 국내로 전송하기도 매우 어렵고 그 많은 데이터를 저장할 수 있는 스토리지서버를 갖춘 기관도 국내에 많지 않다. 개인연구자가 접근하기에는 불가능하다. 원자자의 허락이 없이는 데이터에 대하여 접근할 수 없을 뿐만 아니라, 그 많은 데이터를 직접 다운로드 받아서 원하는 정보분석을 수행하고 결과를 얻는 것은 불가능하다고 생각할 수 있다. 이러한 문제점에 대한 해결을 위하여 암유전체, UK Biobank, 의료영상이미지 정보들은 모두 클라우드 환경에서 공유가 된다. NGS 데이터 정보분석을 위해서 클라우드를 사용하는 것이 일반화된다는 의미가 된다.

마지막으로 본문에서 언급한 Google Cloud 환경에서 Exome 및 Genome 데이터 분석 WDL workflow는 http://dnaseq.exome.kr 및 http://rnaseq.exome.kr 에서 간단한 정보 입력후 다운로드가 가능하다.



Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 panel을 이용한 코로나19 바이러스의 Whole Genome Sequencing

Thermo Fisher Scientific

2020년 전 세계를 휩쓴 COVID-19 사태는 2021년 현재도 수많은 감염자와 사망자를 낳고 있다. 2020년 말부터 코로나19 바이러스인 SARS-CoV-2의 백신 접종이 시작되었고, 일부 대량 접종이 진행된 국가들은 예상보다 훨씬 좋은 효과를 보였다[1]. 예를 들어, 미국 CDC의 5월 25일 보고서에 따르면 2021년 1월부터 4월 30일까지 미국에서 코로나19 백신 접종을 완료한 사람은 약 1억 100만 명이었고, CDC가 각 주 등의 보건당국 데이터 기반으로 집계한 결과, 접종 후 감염이 보고된 사람은 약 0.01%에 불과한 10,262명으로, 입원 995명, 사망 160명이었다. 실제 감염자 수는 더 많을 가능성도 있지만, 이 결과는 백신이 충분히 효과적이라는 결론을 내릴 수 있다[2].

하지만, SARS-CoV-2는 지속적으로 변이형이 발견되고 있으며, 이에 따라 백신의 효능이 저하될 우려가 있다. 2020년 12월, 영국 보건국은 소위 영국변이로 알려진 코로나19 변이주 B.1.1.7을 보고하였고 이는 기존 코로나19 바이러스보다 감염력이 더 높다고 알려져 있다. 현재 WHO, CDC, 영국 보건국 등은 우려 대상인 코로나19 주요 변이 바이러스를 VOC (Variants of Concern), 관심을 두고 관찰 중인 기타 변이 바이러스는 VOI (Variant of Interest)로 분류하며 2021년 5월 31일 기준 주요 변이 바이러스 정보 및 관련 변이는 아래 표와 같다. (WHO, Tracking SARS-CoV-2 variants, https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/)

현재까지 알려진 변이형과 새로운 변이형을 모두 확인할 수 있는 대표적인 방법은 NGS (Next Generation Sequencing)이며, 써모 피셔는 코로나19 바이러스의 Whole Genome Sequencing을 지원하는 Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 research panel을 선보였다. 이 패널은 30kb 정도인 SARS-CoV-2 유전체의 99% 이상을 포함하는 247개 amplicon과 human gene expression controls인 5개 amplicon으로 구성되며, 1-10 ng의 total RNA 또는 5-10 ng의 cDNA를 사용한다. Ion Torrent의 대표적인 차세대 시퀀서인 Ion S5 또는 Ion GeneStudio S5 시리즈에서는 cDNA를 준비 후 Ion Chef로 라이브러리를 자동으로 만들 수 있으며 template 준비와 칩 로딩도 가능하다. 시퀀서에 들어가는 Ion 530 chip은 한 번에 15~20개 검체를, Ion 540 chip은 60~80개 검체를 동시에 분석할 수 있다. 2020년에 출시된 최신형 전자동 시퀀서인 Ion Torrent Genexus integrated sequencer는 바이러스 RNA만 넣으면 cDNA 역전사부터 모든 NGS 과정을 자동으로 수행하며 24시간 안에 분석 리포트까지 완료할 수 있다. 한 번의 run으로 16개 검체를 동시에 처리할 수 있으며, Genexus의 GX5 chip은 32개 검체까지 가능하다. 또한 Genexus는 칩과 시약을 장비에 세팅하고 2주 동안 보관 가능하며 최대 4번에 나누어 시퀀싱을 시행할 수 있기 때문에 검체를 8개씩 4번에 걸쳐 run하거나 16개씩 2번 run하는 등 검사실의 상황에 맞추어 이용할 수 있다.

이 름	WHO label	주요 변이 바이러스의 Spike Protein 변이	최초 발견지
B.1.1.7	Alpha	69/70del, 144del (E484K), (S494P), **N501Y**, A570D, D614G, P681H, T716I,S982A, D1118H, (K1191N)	United Kingdom
B.1.351	Beta	D80A, D215G, 241/242/243del, K417N, E484K, **N501Y**, D614G, A701V	South Africa
P.1	Gamma	L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, **N501Y**, D614G, H655Y, T1027I	Japan/Brazil
B.1.427	Epsilon	L452R, D614G	US-California
B.1.429	Epsilon	S13I, W152C, L452R, D614G	US-California
B.1.617.2	Delta	T19R, (G142D), 156-157del, R158G, L452R, T478K, D614G, P681R, D950N	India

표 1. 코로나19 바이러스의 S (spike) 유전자 영역 변이 중에서 단백질 아미노산이 바뀐 정보를 기반으로 변이 바이러스를 분류. 괄호는 일부에서 발견되는 경우.

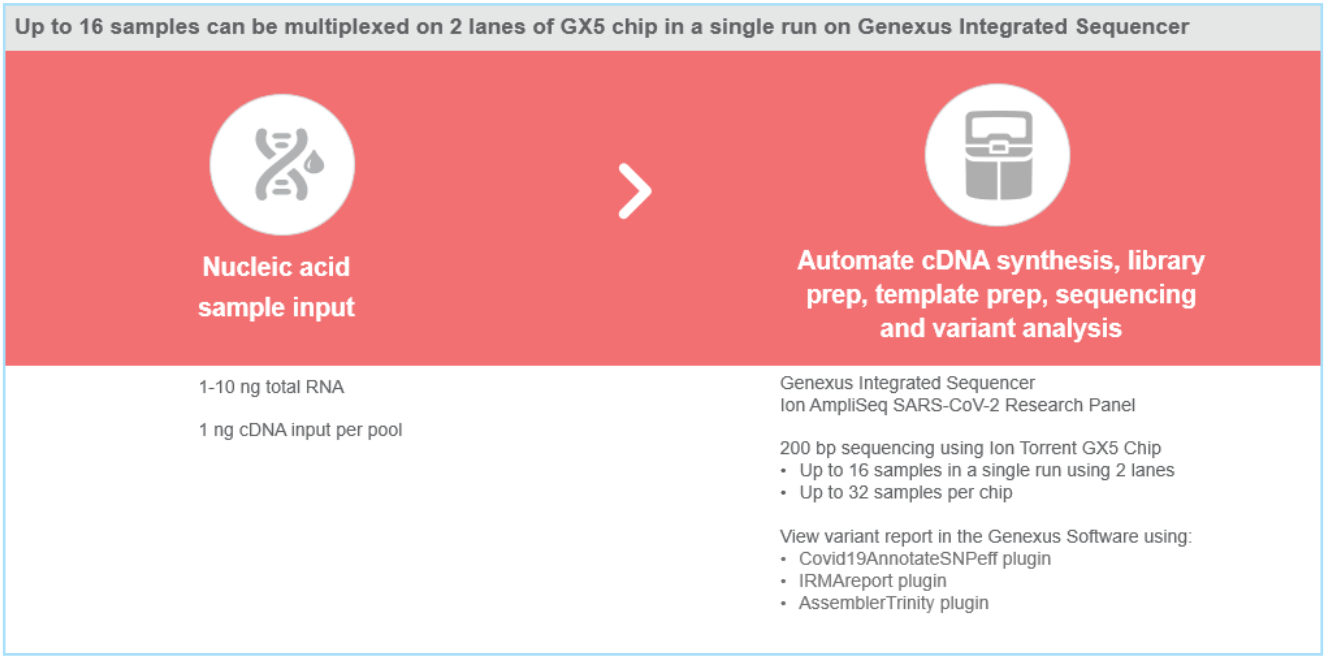


그림 1. cDNA 역전사부터 최종 리포트까지 전체 과정이 자동화된 유일한
NGS 시스템인 Ion Genexus 시퀀서의 SARS-CoV-2 research panel 시퀀싱 작업 흐름.

현재 모든 Ion Torrent 시퀀서에는 Ion AmpliSeq SARS-CoV-2 research panel을 위한 3개의 소프트웨어가 무료로 제공되며자동 분석도 가능하다. 기본 mapping과 variant calling 후 SnpEff, IRMA, TRINITY 3개의 plugin 소프트웨어로 각각 SARS-CoV-2 바이러스 변이의 annotation, consensus 서열 생성, de novo assembly가 가능하다. 예를 들어, SnpEff 분석에서는 유전자의 염기서열의 변이와 아미노산 변이 정보가 제공되므로 변이형 바이러스 판독도 가능하다.

써모 피셔는 SARS-CoV-2의 수십 여개 변이를 검출할 수 있는 Real-time PCR probe와 Sanger sequencing을 이용한 프로토콜, S 유전자 전체를 sequencing할 수 있는 primer 등을 공개하였다. 그러나 바이러스 변이형에 대한 우려가 높아지고 앞으로 발생할 변이형을 발견, 추적 관찰하기 위해서는 NGS를 기반으로 한 검사법이 필요하다. Ion Torrent 시퀀서를 이용한 Ion AmpliSeq SARS-COV-2 research panel과 연관 소프트웨어들은 바이러스 시퀀싱이 처음이거나 NGS 자체가 처음인 많은 연구소와 병원들도 코로나19 사태에 적극적으로 대처할 수 있는 강력한 수단이 되고 있다[4][5][6][7]. 지난 2월에 일본의 야마나시 현립중앙병원은 Ion Genexus를 도입했고, 지역 내 최초로 SARS-CoV-2 Gamma 변이형을 확인할 수 있었다[8]. 올해 5월 MAKO Medical은 미국 CDC와 COVID-19 시퀀싱 파트너십 구축을 구축하였으며, 현재까지 25개 주의 바이러스 변이형을 확인했고 최대 주당 20만 개 검체까지 시퀀싱을 시행할 수 있다[9]. 코로나19 사태는 매우 비극적인 상황이지만, 인류 역사상 최초로 바이러스 실시간 분석 기반의 대응체계를 수립한 사례로도 기록될 것이다.

COVID19 Annotate SnpEff Results

ThermoFisher SCIENTIFIC

POS	REF	ALT	VAR TYPE	GEN[*].GT	ANN[*]. GENE	ANN[*]. FEATUREID	EFF[*]. RANK	ANN[*]. HGVS_C	ANN[*].HGVS_P	ANN[*].EFFECT	EFF[*]. IMPACT	AF	QUAL	DP
241	C	T	SNP	Homozygous	orf1ab	QHD43415.1	-1	c.-25C>T	.	upstream_gene_variant	MODIFIER	0.998997	14478	21956
344	C	T	SNP	Homozygous	orf1ab	QHD43415.1	1	c.79C>T	p.Leu27Phe	missense_variant	MODERATE	0.997491	14657.7	52444
1059	C	T	SNP	Homozygous	orf1ab	QHD43415.1	1	c.794C>T	p.Thr265Ile	missense_variant	MODERATE	0.995996	14558.2	5044
3037	C	T	SNP	Homozygous	orf1ab	QHD43415.1	1	c.2772C>T	p.Phe924Phe	synonymous_variant	LOW	0.810648	14633.8	40461
7331	G	A	SNP	Homozygous	orf1ab	QHD43415.1	1	c.7066G>A	p.Val2356Ile	missense_variant	MODERATE	0.996983	14555	4742
11916	C	T	SNP	Homozygous	orf1ab	QHD43415.1	1	c.11651C>T	p.Ser3884Leu	missense_variant	MODERATE	0.998491	14631.4	32626
14408	C	T	SNP	Homozygous	orf1ab	QHD43415.1	2	c.14144C>T	p.Pro4715Leu	missense_variant	MODERATE	0.986993	14104.6	4245
23403	A	G	SNP	Homozygous	S	QHD43416.1	1	c.1841A>G	p.Asp614Gly	missense_variant	MODERATE	0.999499	14751	67682
25563	G	T	SNP	Homozygous	ORF3a	QHD43417.1	1	c.171G>T	p.Gln57His	missense_variant	MODERATE	0.999498	14761.9	88412
28606	C	T	SNP	Homozygous	N	QHD43423.2	1	c.333C>T	p.Tyr111Tyr	synonymous_variant	LOW	0.997995	14680.1	12954
29179	G	T	SNP	Homozygous	N	QHD43423.2	1	c.906G>T	p.Pro302Pro	synonymous_variant	LOW	0.997993	14671.8	22229

그림 2. cDNA 역전사부터 최종 리포트까지 전체 과정이 자동화된 유일한
NGS 시스템인 Ion Genexus 시퀀서의 SARS-CoV-2 research panel 시퀀싱 작업 흐름.

[참고문헌]

[1] Eric J Haas et al., The Lancet 397, P1819-1829 (May 2021) Impact and effectiveness of mRNA BNT162b2 vaccine against SARS-CoV-2 infections and COVID-19 cases, hospitalisations, and deaths following a nationwide vaccination campaign in Israel: an observational study using national surveillance data.

[2] COVID-19 Vaccine Breakthrough Infections Reported to CDC — United States, January 1–April 30, 2021. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. ePub: 25 May 2021. DOI: https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/70/wr/mm7021e3.htm

[3] https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/959438/Technical_Briefing_VOC_SH_NJL2_SH2.pdf

[4] https://thewell.unc.edu/2021/03/19/tracking-sars-cov-2-variants/

[5] https://newschannel9.com/news/local/baylor-school-lab-uses-new-machine-to-detect-variants-as-new-cases-detected-in-tennessee

[6] https://newschannel9.com/news/local/baylor-school-lab-shows-evidence-that-covid-19-vaccines-help-combat-variants

[7] https://www.washingtonpost.com/graphics/2020/national/genetic-science-coronavirus-outbreak-iowa/

[8] https://www.nikkei.com/article/DGXZQOFB111ST0R10C21A2000000/

[9] https://www.globenewswire.com/en/news-release/2021/05/13/2229380/0/en/MAKO-Medical-Forges-Partnership-with-the-CDC.html

SARS-CoV-2 유전자 감시를 가능하게 하는 Genexus System

한 학교 실험실이 지역 변종에 대한 모니터링을 돕겠다고 나섰습니다.

베일러 중등학교(Baylor School)의 베일러 난해성 분자 실험실(Baylor Esoteric and Molecular Laboratory)에 소속된 던 리차즈(Dawn Richards) 및 엘리자베스 포레스터(Elizabeth Forrester) 박사는 지역의 SARS-CoV-2 유전자 감시 노력을 개선하는 데 전념하고 있습니다. 채터누가시에 위치한 사립 중등학교와 연계된 이 실험실은 해밀턴 카운티 인구에 대한 qPCR 기반 검사의 진행에 이미 중요한 역할을 하고 있으며, 지역 내 첫 B.1.1.7 균주 사례를 발견한 이후 NGS를 도입하여 역량을 확대하기로 결정했습니다. 채터누가 지역 주변 인구에서 새로운 변종의 확산과 출현을 지속적으로 모니터링하는 통합 워크플로우를 구축하는 것이 목표였습니다. 하지만 관련 정보를 제때에 지역 보건당국에 제공하여 중대한 의사결정을 지원하기 위해서는 빠른 시간 안에 검사를 해야 할 필요가 있습니다. 베일러 중등학교의 교사이자 베일러 난해성 분자 실험실의 책임자인 포레스터 박사는 이런 어려움을 잘 알고 있기 때문에 Genexus System이 필요하다고 생각했습니다. “표준실험실에 검사를 위탁하면 결과를 얻기까지 수주가 걸립니다. Genexus System을 사용하면 24-48 시간 안에 공중보건 관계자에게 염기서열 결과를 공유할 수 있습니다.” 실험실은 SARS-CoV-2 분석 워크플로우와 함께 Genexus System의 Ion AmpliSeq™ SARS-CoV-2 Research Panel을 사용하여, 이제 하루도 채 안 되는 기간 안에 추출된 샘플에서 30 kb 바이러스 게놈의 공통서열 분석까지 진행할 수 있게 되었습니다.

2021년 2월, 일본 최초의 P.1 변이형이 Genexus System의 AmpliSeq SARS-CoV-2 Research Panel로 확인되었습니다.

일본 야마나시현 중앙병원의 게놈분석센터에 소속된 히로쓰 요스케 박사는 브라질에서 처음 확인된 P.1 SARS- CoV-2 변종이 처음으로 일본에서 발견되었다고 보고했습니다. 염기서열 분석 결과, 20J/501Y.V3(P.1 혈통)의 SARS-CoV-2 균주는 missense variant 22개, synonymous variant 10개, intergenic region의 variant 3개, frameshift variant 1개, 그리고 in-frame variant 1개를 포함하여 총 37개의 변이를 가지고 있었습니다. 스파이크 단백질을 코딩하는 S 유전자에서는 12개의 missense variant (L18F, T20N, P26S, D138Y, R190S, K417T, E484K, N501Y, D614G, H655Y, T1027I, and V1176F)가 확인되었습니다. 이 변이들은 이전에 브라질에서 발견된 P.1 변이형과 완전히 일치했습니다. 스파이크 단백질의 RBD 영역에서는 3개의 변이(K417T, E484K, and N501Y)가 확인되었습니다. 이 결과는 일본에 20J/501Y.V3(P.1 혈통)와 관련된 바이러스주가 새로 나타났음을 시사합니다. 연구진은 Genexus System 사용 경험에 대해 매우 흡족하다고 평가했습니다. 현재까지 샘플 135개를 분석하였으며 133개에 대한 결과를 확인하였습니다. 2건은 바이러스 양이 매우 적었던 검체입니다. 연구진은 특히 사용하기 쉽다는 장점과 빠른 TAT에 대해 높은 만족도를 나타내었습니다.

Paternal leakage of mitochondrial DNA and maternal inheritance of heteroplasmy in Drosophila hybrids

박혜원

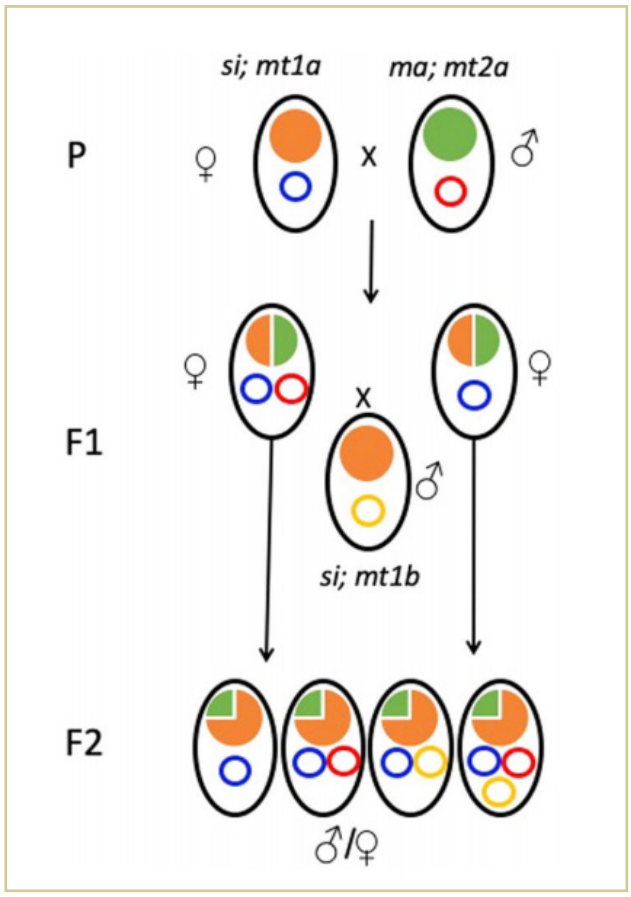
씨젠의료재단

미토콘드리아 DNA(mtDNA) 분석은 모든 이에게 난제이겠으나, 특히 개인식별검사(라고 쓰고 친자검사라고 읽는다)를 하는 진검의에게 mtDNA를 분석해야하는 상황, 그 중에서도 소위 '미싱 링크'가 존재하는 모계 혈족 중 일부에서 3개 이상의 PHP (point heteroplasmy)라도 발견되는상황은 정말 괴로운 것이다. 검체에 따른 heteroplasmy의 비율도 중세 의사의 처방전만큼이나 제멋대로이며, 모두가 납득할 만한 exclusion criteria가 있는 것도 아니다. Heteroplasmy의 발생 기전은 somatic mtDNA mutation, 수정 과정에서 paternal leakage, heteroplasmy를 가진 모체로부터 유전 등 여러 가지가 제시되고 있다. 그 중에서도 paternal leakage로 인한 heteroplasmy의 발생 빈도와 역학 가설의 실험적 증거를 제시한 논문이 있어 소개하고자 한다.

저자들은 부모 세대(P generation)에서 4가지 다른 타입의 초파리를 교배하였다: 2가지 D. simulans (각각 sil과 silI의 mitotype을 가짐)를 모계로, 2가지 D. mauritiana (각각 mal과 malI의 mitotype을 가짐) 부계와 교배하여 아래 표와 같이 4가지 잡종을 만들었다.

Cross type	Family code	F1 female A/B/C	F1 male A/B/C	Very young D/E	Young D/E	Old D/E	Very old D/E
1	24A	0/5/5	4/4/4	-	0/3	0/2	-
1	24B	19/41/43	5/5/55	0/6	5/17	9/13	5/5
1	24C	0/2/2	0/0/0	-	0/2	-	-
1	24D	0/33/34	5/5/33	-	0/15	0/15	0/3
1	24E	1/34/37	5/5/35	0/3	0/9	1/20	0/2
1	24F	1/1/1	0/0/0	1/1	-	-	-
2	22E	9/66/66	10/10/86	3/13	3/20	3/30	0/3
2	22F	0/1/1	0/0/0	0/1	-	-	-
2	22G	0/13/15	10/10/19	0/9	0/4	-	-
2	22H	0/19/22	10/10/45	0/15	0/4	-	-
2	22I	0/6/6	8/8/8	0/5	0/1	-	-
2	22J	0/74/76	10/10/63	0/2	0/28	0/27	0/17
3	23C	0/11/16	5/5/22	0/8	0/3	-	-
3	23D	0/14/16	5/5/15	0/14	-	-	-
3	23E	0/38/41	5/5/65	0/13	0/16	0/9	-
4	25A	0/34/37	5/5/44	0/12	0/9	0/13	-
4	25B	0/16/16	5/5/12	-	0/8	0/4	0/4
4	25C	0/6/7	5/5/7	-	0/6	-	-
4	25D	0/49/53	5/5/57	0/8	0/12	0/22	0/7
4	25E	0/30/33	5/5/9	0/11	0/8	0/8	0/3
4	25F	2/25/26	7/7/31	2/13	0/11	0/1	-
4	25G	0/27/27	5/5/34	0/10	0/7	0/10	-
4	25H	0/26/26	5/5/27	0/11	0/6	0/7	0/2
4	25J	0/31/34	5/5/31	0/13	0/7	0/11	-
Total		**32/602/640**	**129/129/702**	**6/168**	**8/196**	**13/192**	**5/46**

4가지 잡종을 다시 D.simulans 암컷 혹은 D.mauritiana 수컷과 교배시켰다. 어떤 개체는 교배에 실패하였으므로 각 잡종 타입별 개체수는 상이하다. 이 과정을 각 모체마다 4회씩 시행하여, 수정 당시 모계 연령(very young, young, old, very old)에 따른 4가지 F1 잡종이 존재하게 된다. simulans x mauritiana 교배는 가임(可妊) 암컷과 불임 수컷을 생산했다. 모든 F1 수컷을 에탄올로 보존하고 모든 F1 암컷을 아래 그림과 같이 D.simulans (P세대의 D.simulans와 다른 mitotype을 가짐)과 교배하였다.



예를 들어, F1 암컷(sil x mal)을 sill 일배체형을 가진 수컷과 교배시켜, F2의 heteroplasmy가 부모 어느 쪽에서 왔는지 식별할 수 있게 하였다. F1 암컷에 총 602번의 교배를 실시하였다. F2 세대를 모은 후, F1와 F2 모두 에탄올에 보존하였다. heteroplasmy는 SSP-PCR로 시행하였으며 mitotype 별 primer sequence와 실험 조건은 원 논문에서 제공한다. R을 이용한 카이 스퀘어 검증으로 개별 개체 간, 동일 가계(같은 모체를 가진 동기 개체들) 구성원 간의 2가지 비교를 시행하였다. 가계 구성원 간 비교에서 적어도 한 개체가 heteroplasmic인 경우 해당 가계를 heteroplasmic으로 간주하였다.

부모 세대(D. simulans x D. mauritiana)에서 24건의 교배가 성공하여(구체적인 잡종 패턴은 앞 페이지 표 참조) F1세대에서 702마리의 수컷과 640마리의 암컷 잡종을 얻었다. F1 암컷은 5.3% (32/602), F1 수컷은 100% (129/129)에서 heteroplasmy를 보여 성별에 따른 heteroplasmy의 발생 빈도에 유의한 차이를 보였다($p<2.2*10-16$). 가계별 잡종 타입에 따른 차이는 없었다($p=0.7946$). 동일 모계를 가진 가계 별로 heteroplasmy 발생 빈도를 분석한 결과, 가계(모계)에 따라 유의한 차이를 보였다($p<9.99*10-5$). 가장 높은 heteroplasmy 발생률을 보인 가계를 대상으로 시행한 추가 분석에서, 모체의 연령이 증가할수록 heteroplasmy 발생률이 유의하게 높았는데($p<0.00069$), very young 군에서는 heteroplasmy 발생이 0건이었고 very old 그룹에서는 모든 progeny에서 heteroplasmy를 보였다.

F1의 모든 heteroplasmy가 paternal leakage에서 기인한 반면, F2의 heteroplasmy는 paternal leakage와 maternal inheritance 두 가지 기전으로 발생할 수 있으므로(그림 참조) F1 암컷을 D.simulans (sill)수컷과 역교배시켰다. 10개의 heteroplasmic F1 가계와 10개의 homoplasmic F1 가계가 있었고, 역교배로 각 가계에서 390 개체의 F2를 얻었다(총 780 마리). F2 개체를 대상으로 가계 별 heteroplasmy 발생률에 차이가 있는지 분석한 결과, 가계에 따라서 F2의 heteroplasmy 발생 빈도가 유의하게 차이남을 알 수 있었으며 ($p<0.000099$). 모체의 heteroplasmic 상태가 paternal leakage에 영향을 미치는지 분석한 결과, homoplasmic F1 모체에서 paternal leakage에 의한 F2의 heteroplasmy 발생이 유의하게 많이 발생함을 알 수 있었다($p=0.00009$). F2의 heteroplasmy가 P 모체에 따라 발생률의 차이가 있는지 분석한 결과 유의한 차이가 있었다

(p=0.000013). F1 모체의 heteroplasmy state와 F2 자손의 heteroplasmy 발생 빈도는 hetero/homo F1 모체에 따른 차이가 없었으며(p=1), 이는 homoplasmy F1이라고 생각했던 F1 암컷이 LoD 이하의 paternal mtDNA를 가지고 있어, 후세대로 전달하였음을 시사한다. Heteroplasmy의 모계 유전과 paternal leakage가 독립사건인지 분석한 결과는 F2 개체를 전체로서(pooling) 분석할 경우 두 군 간에 차이가 없었지만(p=1), 가계 별로 나누어 분석한 경우, 모계유전된 heteroplasmy를 가진 개체에서 paternal leakage에 의한 heteroplasmy 발생이 유의하게 높았다(p=0.0299).

본 연구에서 heteroplasmy 발생률은 가계에 따라 유의하게 차이가 난다는 것과, heteroplasmy 발생률이 높은 가계에 paternal leakage와 maternal inheritance 기전이 둘 다 관여한다는 점을 알 수 있었다. 이것은 유전 성분이 heteroplasmy 발생을 조절한다는 점을 시사하며, 수정 시 정자의 사립체를 파괴하는 과정이 무작위가 아니라는 점을 시사한다. 예를 들어, 수정 당시 모체의 연령이 증가할수록 paternal leakage가 더 빈번하게 관찰되었으며, 이전에 사람을 대상으로 한 다른 연구에서도 동일한 내용이 보고되었다. 이는 아마도 uniparental transmission에 관여하는 유전자에 체세포변이가 축적되기 때문이라 생각된다. 기존에 초파리를 이용한 비슷한 연구들에서 상기 두 과정이 무작위라는 결론이 많았는데, 가계를 분리하지 않고 초파리 개체 간 비교만 시행하였기 때문에 본 연구결과와 상충되는 결론이 나온 것으로 생각된다. 한 번 후세대로 전달된 heteroplasmy가 지속적으로 다음 세대로 전달되는지에 대해 저자들은 'strong heteroplasmy'와 'weak heteroplasmy'의 두 가지 특성이 존재한다고 가정하는데, F1에서 관찰된 heteroplasmy origin의 D.mauritiana : D.simulans가 1:1인 반면, F2에서 그 비율이 1:3으로 전달되기 때문이다. 이러한 'strong' 패턴이 가계별 heteroplasmy 발생 빈도 차이와 관련이 있으며, 다른 논문에서 제시한 nuclear genetic contents의 피드백 및 epigenetics 기전이 관여할 것으로 생각된다. 또한 heteroplasmy 발생률이 높은 가계의 개체가 3가지 이상의 mtDNA의 heteroplasmy를 나타낼 가능성을 시사하였다.

본 연구는 초파리를 가계에 따라 분류하고 각 초파리에게 ID를 부여하여 분석함으로써(원 논문 참조) 기존 연구에 비해 좀 더 유의한 결과를 얻을 수 있었다. 본 연구는 방법론적으로는 SSP-PCR 후 GE가 F1에서 절반 가량의 heteroplasmy를 놓칠 정도로 (suspicious false negative) 퍼포먼스가 좋지 않았다. 그럼에도 불구하고, 664 건의 교배를 시행하고, 2,162 마리의 초파리에게 식별번호를 부여하여 기록한 결과, IF 3.998의 저널에 등재되는 쾌거를 이룩한 점에서 가난한 연구자들에게 노오력의 중요성을 알려주었다. 또한, 본 연구가 필자가 임상검사실에서 mtDNA를 해석하는 데 직접적인 도움을 주지는 못했지만, 3 PHP 불일치에서 '친족 관계를 배제할 수 없을' 때 느끼는 죄책감은 확실히 덜어주었다.

1. Polovina ES et al. Paternal leakage of mitochondrial DNA and maternal inheritance of heteroplasmy in Drosophila hybrids. Sci Rep. 2020;10(1):2599.

2. Kopinski PK et al. Regulation of nuclear epigenome by mitochondrial DNA heteroplasmy. Proc Natl Acad Sci USA. 2019;116(32):16028-16035.

3. Bruce B et al. Interpretation Guidelines for Mitochondrial DNA Sequencing. Conference Proceedings. 2000

최신 보험정보

항 목	제 목	세부인정사항	고 시
누591 핵산 증폭	누591나(13) 쯔쯔가무시병(16S rRNA)의 급여기준	누591나 핵산증폭-정성그룹2-(13) 쯔쯔가무시병(16S rRNA)은 야외활동(등산, 성묘, 밭일 등) 이후, 발열·발진, 가피, 근육통, 림프절 비대 등의 의심증상이 발생하여 실시한 경우 1회 요양급여를 인정함.	보건복지부 고시 제2021 - 102호 (2021년 4월 1일부터 시행)
누840 조직형 검사	누840 HLA Typing DP의 급여기준	1. 누840나 조직형검사-[핵산증폭(저해상도)]-HLA Typing (Class II): DP는 장기이식 또는 조혈모세포 이식시 환자 및 공여자에게 시행하는 경우 인정함. 다만, 장기이식 환자의 경우에는 환자 혈청내 HLA-DP항체가 확인된 경우에만 인정함. 2. 누840라 조직형검사-[염기서열분석]-HLA Typing (Class II): DP는 HLA-A, B, C, DR, DQ Typing 결과가 있는 비혈연간 동종조혈모세포 이식 대상 환자와 공여자에게 시행하는 경우 인정하며, 그 외 장기 등 이식시 진료내역 및 담당의사의 소견서 등을 참조하여 사례별 인정함.	보건복지부 고시 제2021-153호 (2021년 6월 1일부터 시행)
	3종 이상 동시 시행하는 조직형검사 (HLA Typing)의 급여기준	누840라. '주'항 3종 이상 동시 시행하는 조직형검사(HLA Typing)는 차세대염기서열분석법으로 시행한 경우로서 다음과 같은 요건을 모두 충족한 경우 요양급여함. - 다 음 - 가. 적응증 1) 3종 이상 ~ 5종 이하 동시 시행하는 경우 : 신장, 췌장 및 조혈모세포 이식 대상 환자와 공여자 2) 6종 이상 동시 시행하는 경우 : 비혈연간 동종조혈모세포 이식 대상 환자와 공여자 3) 단, 상기 1)과 2)의 중복산정은 인정하지 아니함. 나. 실시기관 :「차세대 염기서열분석기반 유전자패널검사」의 시설, 인력, 장비에 대한 요건을 충족하는 기관	

항 목	제 목	세부인정사항	고 시
누658 핵산 증폭	SARS-CoV-2 [실시간역전사 중합효소연쇄반응법] 검사의 급여기준	1. 누658라. 핵산증폭-정성그룹4-SARS-CoV-2[실시간역전사중합효소연쇄반응법]검사는 다음과 같은 경우에 요양급여함 -다 음- 가. 급여대상 1) 질병관리청 「코로나바이러스감염증-19 대응 지침」*에 따른 확진환자, 의사환자, 조사대상 유증상자 등의 진단 및 추적관찰을 위해 실시하는 경우 * 진단검사 시행 당일 유효한 질병관리청「코로나바이러스감염증-19 대응 지침(지자체용)」의 사례정의를 기준으로 하며,「감염병의 예방 및 관리에 관한 법률」제11조에 따라 관할 보건소를 거쳐 질병관리청에 신고되어야 함 2) 코로나19 관련 임상증상이 없이 선별목적으로 실시하는 경우 1회 인정 (1) 응급실* 내원환자로서, 중증응급환자** 또는 6시간 이상 지연할 수 없는 응급수술(시술 포함)이 필요한 중증응급의심환자**에게 선별목적으로 실시 *「응급의료에 관한 법률」에 따라 지정된 응급의료기관의 응급실 **「응급의료에 관한 법률 시행규칙」 제18조의3(응급환자의 중증도 분류)에 따른 「한국 응급환자 중증도 분류기준」고시 참고 (2) 상급종합병원, 종합병원, 병원, 요양병원, 정신의료기관(상급종합병원, 종합병원은 제외), 재활의료기관으로 입원하는 환자 (3) 사회복지시설 중「노인복지법」제31조제2호에 따른 노인의료복지시설 및 「장애인복지법」제58조제1항제1호에 따른 장애인거주시설에 입소하는 입소자 나. 검사방법 단독검사와 취합검사로 구분하며 표1의 급여대상별 적용가능검사에 따라 선택하여 실시함 다. 수가산정방법 검사방법 및 급여대상에 따라 표2와 같이 수가를 적용하며, 상기 가. 급여대상 2)의 경우 상기도검체로 실시한 경우에 한하여 인정함. 급여대상 가. 2)의 (2), (3)에 해당되는 취합검사와 단독검사의 청구코드는 표2와 같이 구분하여 신종 감염병 관리의 목적으로 한시적으로 기재토록 함	보건복지부 고시 제2021 - 122호 (2021년 4월 30일부터 시행) **표1** [1] **표2** [2] **(p19) 참조**

항 목	제 목	세부인정사항	고 시
누658 핵산 증폭	SARS-CoV-2 [실시간역전사 중합효소연쇄반응법] 검사의 급여기준	라. 본인부담률 상기 가. 급여대상 2)의 (2), (3)은 입원 환자(입소자) 및 입원(소) 예정자로 입원진료에 준하여 「국민건강보험법」 제44조 및 동법 시행령 [별표2] 제1호 가목에 따라 해당 검사비용의 본인부담률은 20%로 적용하며, 해당 수가의 세부코드를 '97'로 기재하여 청구함 마. 기타 1) 코로나바이러스감염증-19 응급용 선별검사와의 동시 실시는 불인정함 2) 허가병상이 150병상 미만인 병원은 취합검사가 어려운 경우 단독검사를 1회 인정하며, 본인부담률은 해당 검사비용의 20%로 함 2. 동 검사를 요양급여로 실시할 수 있는 기관은「감염병의 예방 및 관리에 관한 법률」제16조의2제2항에 따라 실험실 검사능력 평가를 완료한 요양기관으로 하며, 식품의약품안전처장이 긴급사용을 승인한 검사시약을 사용할 수 있는 기간은 식품의약품안전처장이 별도로 정한 기간까지로 함 3. 상기 가. 급여대상 1)에 해당하는 환자가 코로나19 검사가 필요하다는 타 요양기관의 소견에 따라 종합병원, 병원 내 선별진료소를 내원하여 별도 진찰 등 없이 코로나19 검사 시행만을 원하는 경우 해당 검사비용만 산정함 4. 상기 1.의 급여대상 이외에 환자가 원하여 시행하는 경우 등은 요양급여비용 전액을 본인이 부담토록 함	보건복지부 고시 제2021 - 122호 (2021년 4월 30일부터 시행) **표1 [1)]** **표2 [2)]** **(p19) 참조**

1) 표1

급여대상	검사방법
1) 확진환자, 의사환자, 조사대상유증상자	단독검사
2) - (1) 코로나19 관련 임상증상이 없는 중증응급환자 또는 응급수술(시술 포함)이 필요한 중증응급의심환자	단독검사
2) - (2) 코로나19 관련 임상증상이 없는 상급종합병원, 종합병원, 병원 입원환자 *단, 허가병상이 150병상 미만인 병원은 취합검사다 어려운 경우 단독검사 가능	취합검사
2) - (2) 코로나19 관련 임상증상이 없는 요양병원, 정신의료기관(상급종합병원, 종합병원은 제외), 재활의료기관으로 입원하는 환자 2) - (3) 코로나19 관련 임상증상이 없는 「노인복지법」 제31조제2호에 따른 노인의료복지시설 또는 「장애인복지법」 제58조제1항제1호에 따른 장애인 거주시설 입소자	단독검사 취합검사

2) 표2

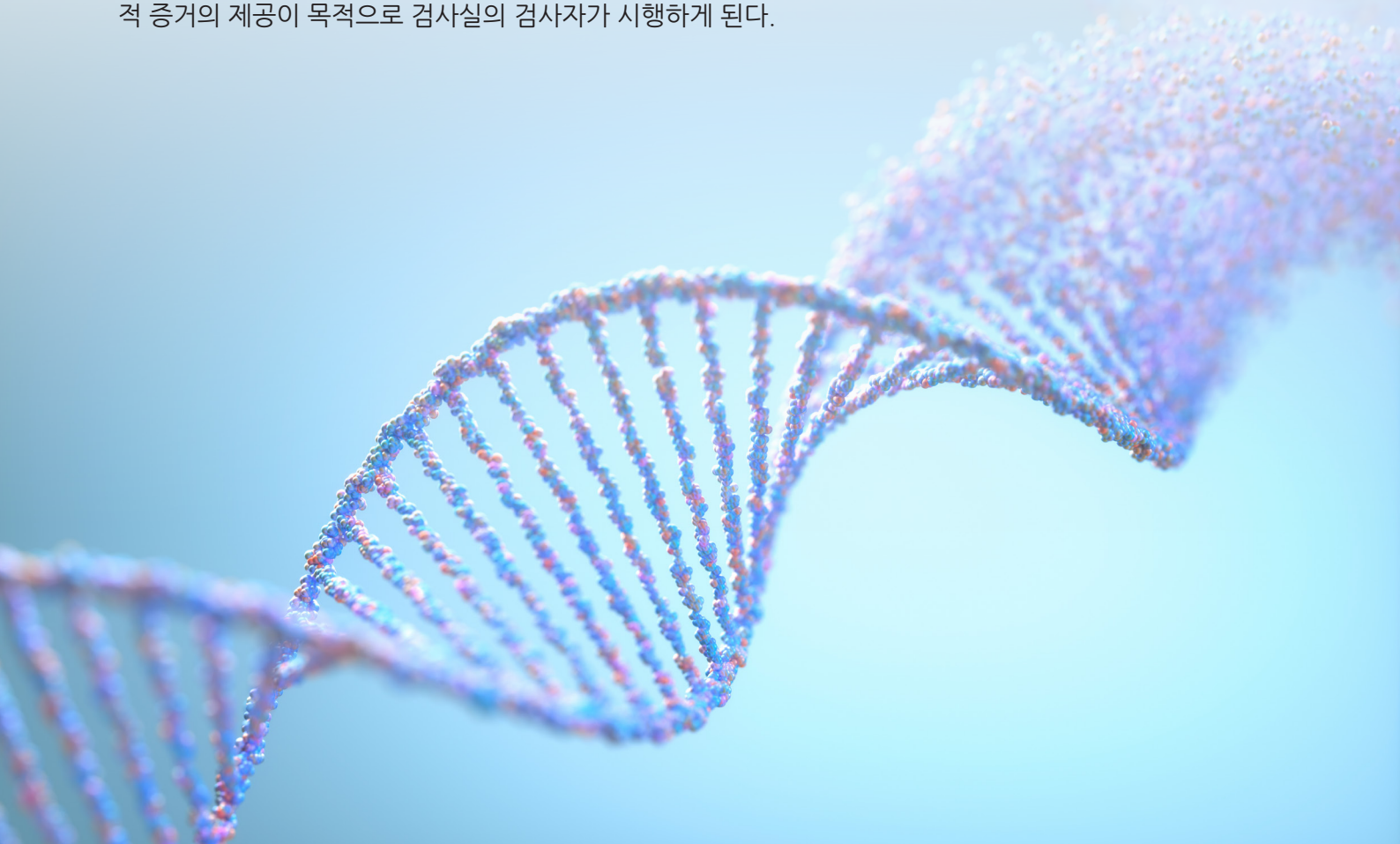
검사방법	유 형	산정기준	적용수가	청구코드
단독검사	-	1인 검사시	누-658 라. 핵산증폭-정성그룹4-SARS-CoV-2 [실시간역전사중합효소연쇄반응법] (727.94점)	D6584 세부코드(04)
				D6584 세부코드(97)주)
취합검사	1단계 (그룹검사)	2~5인 취합 검사시	누-658 라. 핵산증폭-정성그룹4-SARS-CoV-2 [실시간역전사중합효소연쇄반응법] 소정점수의 75% (181.99점)	D6588 세부코드(00), (97)주)
	2단계 (개별검사)	1단계 검사결과 양성 그룹에 대한 개별검사 실시	누-658 라. 핵산증폭-정성그룹4-SARS-CoV-2 [실시간역정사중합효소연쇄반응법] 소정점수의 75% (545.96점)	D6589 세부코드(00), (97)주)

병원체 검출을 위한 다중분자유전검사의 CLSI 검정 지침

김영아

국민건강보험 일산병원

분자유전검사는 검사 의학에서 가장 빠르게 성장하는 분야 중 하나로 초기에는 단일 목표를 확인하거나 양을 측정하는 검사가 널리 사용되었지만 최근에는 다중 분석이 보편화 되었다. 다중 분석은 검체 준비, 신호의 증폭, 검출 및 해석의 과정에서 두 가지 이상의 표적을 동시에 검출하는 것으로 정의할 수 있다. 검사실에서 새로운 다중 분자유전검사법을 도입할 때에는 환자에게 사용하기 적절한 검사성능을 가지고 있는지 '검정'할 필요가 있다. 흔히 검증(validation)과 검정(verification)을 혼동하기 쉬운데, '검증'은 특정 요구사항이 의도된 용도에 적합한 확인으로 주로 시험 개발자가 수행하는데 반해 '검정'은 특정 항목이 특정 요구사항을 충족한다는 객관적 증거의 제공이 목적으로 검사실의 검사자가 시행하게 된다.



다중 분석은 복수의 측정량을 대상으로 하므로 고유한 측정량에 대한 검증이나 검정으로 접근하는 것은 때로는 불가능할 수 있다. 따라서 통상적으로 별도의 검사 단계를 독립적으로 평가하여 각 검사 단계의 성능에 영향을 미치는 핵심 요인을 주의 깊게 검토하는 오류기반 평가를 주로 이용한다. CLSI의 MM17 'Validation and Verification of Multiplex Nucleic Acid Assays' 2판에서는 다중 분자유전검사의 검증 및 검정의 지침을 담고 있는데, 여기에서는 병원체 검출을 위한 다중분자유전검사의 검정 지침에 적용할 수 있는 내용을 소개하고자 한다.

1. 병원체 검출을 위한 검체

미생물 감염은 세균, 바이러스, 결핵균, 진균 및 기생충에 의하며, 이를 진단하기 위해서는 전혈, 혈장, 혈청, 객담, 코 세척물, 비인두 면봉 검체, 비강흡인, 기관지폐포 세척, 기관 내 흡인, 자궁 경부 및 요도 면봉 검체, 뇌척수액, 배양 세포, 소변, 대변, 및 미생물 분리주 등의 다양한 환자 검체에서 DNA나 RNA를 추출하게 된다. 효과적인 감염진단을 위하여 감염위치, 감염체의 병원성 및 병원체 농도에 따라 적절한 검체의 종류를 선택해야 한다. 이때는 DNA와 RNA 바이러스의 중복감염과 집락화된 상재균의 존재를 고려해야 한다.

검정을 위한 검체 선택시 일반적으로 환자 검사용과 동일한 검체를 사용하며 검정하는 것이 추천된다. 또한 다중 분석에 적합한 핵산을 제공할 수 있도록 검정 과정에서 검체수송 도구 내 항응고제, 방부제 또는 안정제와 검체의 보관 및 배송 조건을 확인해야 한다. 병원체 검출을 위한 검체는 병원성을 알 수 없기 때문에 표준지침을 지켜 안전하게 취급하는 것이 중요하다.

2. 핵산의 추출

자동화 장비를 사용할 경우 잠재적 잔효(carry over)와 오염의 문제를 고려해야 한다. 잔효를 줄이기 위해서는 에어로졸 장벽이 있는 일회용 팁, 일회용 플레이트 및 밀봉된 시약 카트리지와 같은 핵산 추출용 시약을 사용한다. 사용하기 전 추출 키트에 다중 핵산 검사에 포함된 표적이 존재하는 지 시험할 필요가 있다.

추출에서 얻은 핵산의 양과 순도는 다중 분석에서 매우 중요하므로 A260/A280 비율로 순도를 측정하고 형광 시약을 사용하여 정량화 한다. 핵산은 추출 과정과 보관 중에 분해되기 쉽기 때문에 반복적인 동결 해동을 피하고 장기간 보관 후에는 사용하기 전에 한천겔의 전기영동 등으로 핵산의 무결성(integrity)를 평가한다.

3. 정도관리

검사 성능을 추적할 때 적절한 정도관리를 포함해야 하며, 내부 정도관리와 외부 정도관리를 서로 보완하여 사용한다. 내부 정도관리에 실패하는 원인으로는 장비 오작동, 최적화되지 않은 시약, 반응 웰에 존재하는 중합효소 활성도 및 검체 매트릭스 내 억제 물질 등이 있다.

4. 분석적 성능 검정

정확도(Accuracy)는 참고방법(reference method)으로 양성과 음성이 결정된 최소 20개 양성 및 10개 음성 검체를 포함한 총 30개 이상의 검체로 검사한다. 잘 확립된 참고방법이 없는 경우, 음성 검체에 참고물질을 첨가한 스파이크 검체를 사용할 수 있다. 민감도는 진양성 /(진양성 + 위음성) • 100으로 계산하고, 특이도는 진음성/(진음성 + 위양성) • 100으로 계산한다.

정밀도(Precision)의 측정은 정량적인 결과가 숨어 있는 정성적 시험의 경우 평균, 표준편차 및 변이계수를 측정한다. 최소검출농도 부근의 농도, 중간 농도, 고농도를 사용하여 매일 각 표적에 대한 중복 검사의 평균을 구한다.

검출한계(limit of detection)는 통계적으로 배경 또는 음성 검체와 구별할 수 있는 가장 낮은 측정량으로 분석물을 포함하는 검체의 95 %가 양성을 보이는 농도로 추정한다.

간섭(Interference)의 평가시 관심 있는 측정치 농도는 감염성 질환 분자유전 분석에서 보고 가능한 범위 중 가장 낮은 농도로 하고, 간섭 물질은 실제 검체에 있을 것으로 예상하는 최고 농도로 한다. 이를 위하여 잠재적으로 반응하는 물질을 스파이크한 정도관리 물질로 시험할 수 있다.

5. 참고치(reference value)
병원체는 정상 모집단에서 검출되지 않으므로 참고치는 별도의 평가가 없이 '검출 없음'으로 한다.

6. 임상적 성능 검정
임상적 타당성 및 효용성을 확립하기 위한 것으로 검사실 책임자의 재량으로 수행할 수 있다. 양성과 음성 환자의 차트의 검토를 포함하며, 이에 영향을 미치는 중요한 변수로는 표적의 지역 유병율, 숙주 요인 및 감염성 질환의 집단발병이 있다. 임상적 검정이 현실적으로 어려운 경우 동료간 심사를 거친 간행물을 이용할 수 있다.

7. 검정 자료의 판정
검정 평가의 요약에는 분석의 설계, 수행된 연구 및 관련된 결과를 간략하게 제시해야 하며, 때 검정의 수락 기준은 미리 검사실에서 정립하는데, 예를 들면 검정 중인 시험과 기준 시험 사이의 일치도를 각 표적과 모든 표적에 대해 90% 이상으로 사용할 수 있다. 모든 측정량에 대한 허용 가능한 성능을 입증하는 것은 불가능 할 수 있으며, 일부 측정량의 성능이 불량한 경우 환자군에서 임상적 유의성과 기대 효과 내에서 성능 평가를 해석해야 한다.

[참고문헌]

Clinical and Laboratory Standards Institute, MM17 Validation and Verification of Multiplex Nucleic Acid Assays (2nd edition) https://clsi.org/standards/products/molecular-diagnostics/documents/mm17/ (Update 2021. May)

P 플래티넘 PLATIUM

한국로슈진단

- 대표제품 KAPA Hyper Exome/Choice/Explorer, cobas CMV, cobas 6800/4800 system
- 회사소개 스위스 헬스케어그룹인 로슈의 진단사업부 국내법인으로서 1990년 외국인 투자기업으로 창립되었으며 혈액, 체액, 조직 등을 검사하여 질병의 조기발견, 예방, 진단, 치료 및 모니터링을 위한 혁신적인 제품과 서비스를 공급하고 있습니다.
  로슈진단은 로슈제약과의 공조를 통해 개인의 유전적, 조직적 특성을 진단해 최적의 치료법을 선택할 수 있도록 환자와 의료진 모두를 위한 맞춤의료시대를 본격적으로 열어 인류의 삶의 질을 향상시킬 수 있도록 노력하고 있습니다. 또한 에이온휴잇(Aon Hewitt)이 선정한 '한국 최고의 직장(Best Employer in Korea)' 본상을 2015년, 2016년, 2017년 3회 연속 수상했으며. , 2019년에는 Great Place To Work Institute주관 '대한민국 일하기 좋은 100대기업 대상'을 수상했습니다.

G 골드 GOLD

써모피셔사이언티픽

- 대표제품 Ion Torrent™ Ion S5 XL(차세대 염기서열분석기, NGS),
  CytoScan® Dx (마이크로어레이, CMA)
- 회사소개 써모피셔 사이언티픽 (ThermoFisher Scientific)은 전 세계 50여 개 국가, 약 70,000명의 직원들과 함께 연 매출 $200억 이상을 달성하는 세계적인 과학 회사입니다. 써모피셔 사이언티픽은 고객들이 세상을 더욱 건강하고, 깨끗하며, 안전하게 만들 수 있도록 돕는다는 사명을 가지고, 생명과학 분야 연구 촉진, 복잡한 분석 난제 해결, 환자 진단 개선 및 의약품 개발, 실험실 생산성 향상에 주력하고 있습니다.

다우바이오메디카 & 일루미나코리아

- 대표제품 체외진단용 의료기기 & Next Generation Sequencing System
- 회사소개 ▶다우바이오메디카 회사소개 : Dow Biomedica is a market developer & distributor of in-vitro diagnostics products. Through partnership with global leaders, we are introducing cutting-edge technology products to our customers. Dow intends not to compete in the established market segments but to develop specialty areas which may be required for development. Dow is proud to have contributed to improvement of medicare for human health through providing innovative technology products. ▶ 일루미나코리아 회사소개: There is a dramatic 'DNA revolution' happening today and Illumina is leading it. Our technology and the solutions we continue to bring to market are transforming our understanding of the genome and will ultimately transform health care.

S 실버 SILVER

디엑솜

- 대표제품 NGS용 진단 시약(DxSeq), 혈중 암DNA 추출 튜브(DxTube)
- 회사소개 디엑솜은 최근에 각광받는 액체생검 (Liquid biopsy)을 통한 진단기법에 주목하여 차세대염기서열분석 (NGS) 기반의 체외진단 시약을 개발하고 있습니다. 극소량의 혈중 암 유래 DNA (ctDNA)를 검사하기 위해 자체 기술 역량을 바탕으로 개발된 시약 및 분석 프로그램을 통해 높은 정확도의 결과가 제공됩니다. 현재 ctDNA를 분석하여 암의 조기진단 및 예후진단이 가능한 정밀 진단시약 및 분석방법 개발을 진행하고 있습니다.

B 브론즈 BRONZE

녹십자지놈

- 대표제품 DES/CMA/NGS패널/G-NIPT
- 회사소개 GC녹십자지놈은 GC녹십자의 유전체분석 부문 자회사로서 산전 유전체 및 유전자 검사와 암유전체 분석, 개인별 약물반응 예측 등 유전체 분석을 통한 질병 진단 서비스 사업을 진행하고 있습니다. GC녹십자지놈은 향후 유전체 분석정보를 활용한 맞춤 치료를 실현하여 건강산업의 패러다임을 바꿔나가고, 유전체 분석 시장의 리더로 성장해 나갈 것입니다.

엔젠바이오

- 대표제품 BRCAaccuTest PLUS / HEMEaccuTest / SOLIDaccuTest / NGeneAnalySys
- 회사소개 엔젠바이오는 `15년 10월에 설립한 유전체분야소프트웨어 연구개발 및 판매를 하는 정밀의료 회사이며, 다년간의 NGS 기술역량과 경험을 기반으로 한 바이오 및 IT 전문 인력들이 암 체외진단 및 동반진단 분야 등에서 효과성과 안전성이 입증된 유전체분야진단시약 제조/개발과 서비스를 제공하고 있습니다.

아스트라제네카

- 대표제품 타그리소 / 린파자
- 회사소개 아스트라제네카는 현재 치료제가 극복하지 못한 난치병 치료의 한계를 뛰어넘고, 환자들의 삶을 변화시키는 의약품을 제공하기 위해 과학적 혁신을 추구하는 글로벌 바이오 제약회사입니다. 세 개의 주요 질환 분야인 암, 심혈관 및 신진대사 질환(CVMD), 그리고 호흡기 뿐만 아니라 자가면역질환, 전염병 및 신경과학질환 등의 치료제의 발굴, 개발, 공급에 집중하고 있습니다. 모든 일의 중심에 과학이 있고, 내리는 모든 결정에 과학을 앞세웁니다. 또한, 지금껏 알려지지 않은 것에 도전하고 한계를 넘기 위한 선택을 하며 매 순간 새로운 문을 엽니다.

한국MSD

- 대표제품 KEYTRUDA
- 회사소개 본 항암제사업부에서는 13개 암종에서 국내 론치 된 면역항암제 KEYTRUDA 를 담당하고 있습니다.

시스멕스코리아

- 대표제품 SafeSEQ (Ultra-Sensitive NGS Liquid Biopsy Technology)
- 회사소개 시스멕스(Sysmex)는 체외 진단 의료장비 및 진단시약을 제공하는 글로벌회사로, 전세계 혈액 검사 의학 분야를 선도하는 헬스케어 회사다. 일본 고베에 본사를 두고, 170여개 국가에 제품을 제공하고 있다. 시스멕스코리아(Sysmex Korea)는 2013년 4월부터 한국에서 본격적으로 사업을 전개하고 있다. 국내에 많은 의료기관에 진단검사 관련 기기 및 시약을 공급하고 있으며, 특히 혈액검사 분야에서는 글로벌 마켓 점유율 No.1인 업체로, 헬스케어 분야의 최신의료기술을 지원하고 있다.

바이오세움

- 대표제품 -
- 회사소개 ㈜바이오세움은 PCR을 기반으로하는 체외진단용 의료기기를 개발 및 생산하며 다양한 품목군으로 구성된 70여개 제품이 있습니다. 당사 제품은 종양, 감염성, 유전질환, HLA typing 관련 제품과 백혈병, 감염성관련 정량 진단 제품을 개발, 제조하는 전문 의료기기 제조회사입니다. 품질, 서비스, 연구 등 모든 부분에서 고객만족의 극대화를 최고의 가치로 삼고 있으며 GMP 프로세스를 준수하고 있습니다.

이제 cobas® 6800/8800 system 을 활용하여 자동화된 SARS-CoV-2 & Influenza A/B 검사를 진행하실 수 있습니다.

Discover absolute automation of SARS-CoV-2 & influenza A/B virus detection with PCR on the Molecular Work Area

cobas® SARS-CoV-2 & Influenza A/B

Accuracy
견고하게 보존된 SARS-CoV2 ORF-1a/b 와 E-gene Region을 targeting하며 Influenza A/B를 동시 및 단독 검출을 진행합니다.

Hands-on Time
8hr

3번의 간단 작업을 통해 검사를 진행할 수 있으며, 최대 8시간의 인력 개입 없이 검사를 진행할 수 있습니다. (cobas® 6800 System 기준)

Specificity
Negative, positive 그리고 internal control 를 통하여 전체 검사 과정을 진행합니다.

Throughput
384 results – cobas® 6800 System
960 results – cobas® 8800 System (8시간 기준)

Contamination control
밀폐된 시스템을 제공함으로써 외부 물질 유입을 차단합니다.

Simplicity
검사자의 별도 작업없이 바로 사용가능 한 reagents 와 controls 을 제공함으로써 결과의 Variation을 최소화 합니다.

한국로슈진단(주)
서울특별시 강남구 테헤란로 108길 22 서경빌딩 4층 (우.06174)
TEL. 02-550-1212 FAX. 02-550-1218

cobas® 6800 system, cobas® 8800 system 체외 수인 15-1087호
cobas® SARS-CoV-2 & Influenza A/B 체외 수허 21-115호
cobas® SARS-CoV-2 & Influenza A/B control Kit 체외 수허 21-115호
cobas® Buffer Negative Control Kit 체외 수신 15-922호

MC-KR-00584

ion torrent

The Genexus System

전세계 최초 자동화 NGS 시스템!

- 두 번의 조작과 10분의 hands-on time

- 샘플 준비부터 리포트 작성까지 단 하루만에 가능!
- 적은 수의 샘플도 경제적으로 실험

- Lysate from FFPE tissue
- Plasma
- Whole blood
- Peripheral blood leukocytes (PBLs)
- Lysate from fresh-frozen tissue
- Lysate form bone marrow

Ion Torrent™ Genexus™ Purification System

Automated nucleic acid extraction, purification, and quantification*

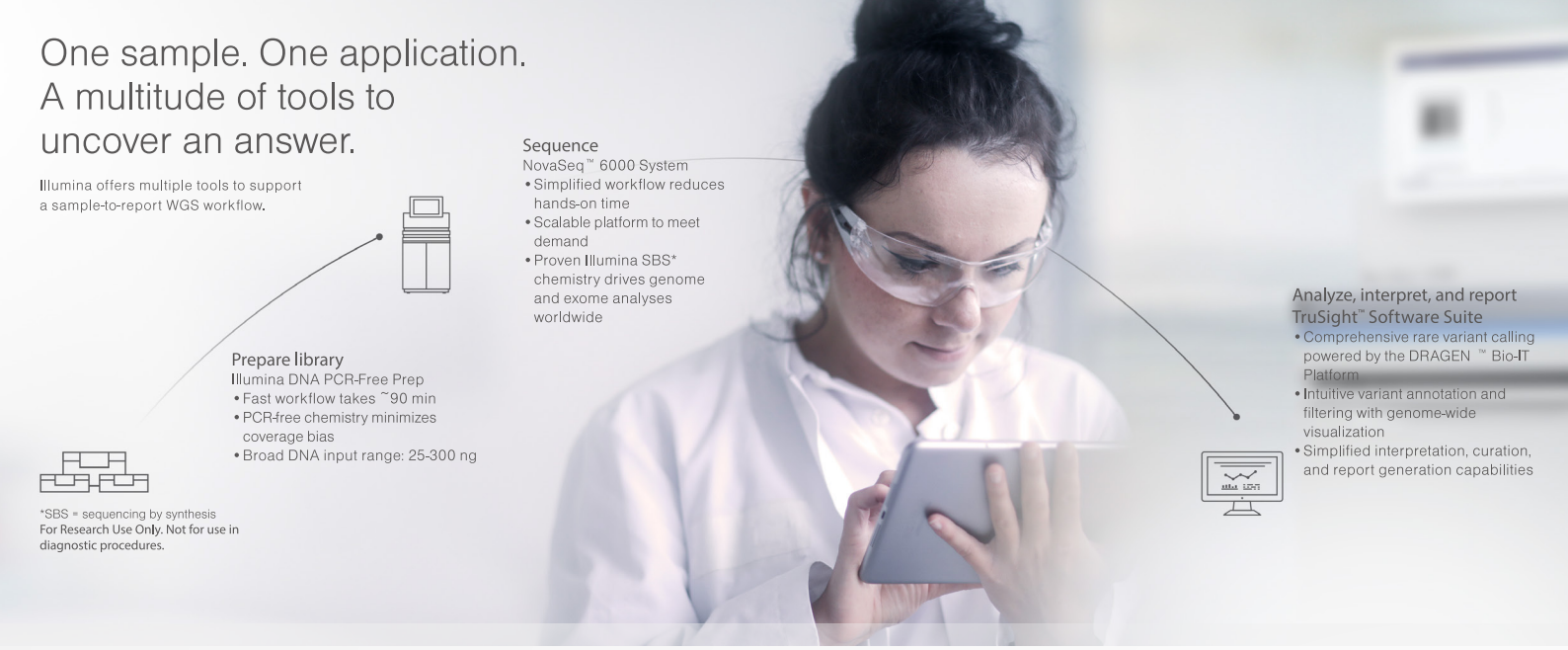
Ion Torrent™ Genexus™ Integrated Sequencer

Automated library preparation, sequencing, variant analysis, and report*

Find out more at **thermofisher.com/genexus**

ThermoFisher SCIENTIFIC

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.



Why adopt WGS for rare genetic disease?

Performing WGS with next-generation sequencing (NGS) provides a comprehensive view of the genome, enabling simultaneous assessment of many genes. This information can help identify diverse variants of genetic disorders.

Superior diagnostic potential

WGS demonstrates the highest diagnostic yield, compared to standard of care,* in multiple patient groups [1,3-5]

Decreased time to diagnosis, decreased costs

WGS has been shown to decrease time to answer and cost of care compared to iterative testing [1,2-6]

Comprehensive variant detection

A single WGS test can detect small variants (SNVs, indels), CNVs, mitochondrial variants, structural variants, repeat expansions, and paralogs †

Broadest analysis of the genome available

WGS enables the most extensive analysis of the genome in patients suspected of rare disease, including coding or noncoding regions or coupling with epigenetic or transcriptomic evaluations

*Standard of care testing defined as karyotype, microarray, gene panels, whole exome sequencing

†SNVs = single nucleotide variants, CNVs = copy number variations

WGS use is becoming more prominent in clinics worldwide as evidenced by Rady's Children's Hospital, National Health Services (NHS) in the United Kingdom, and the Karolinska Institute in Sweden. It is being used to make strides in population genomics through initiatives like All of Us and the Million European Genome Alliance. All to improve health care today and tomorrow.

Learn more at illumina.com/raredisease

1. Lionel AC, Costain G, Monfared N, et al. Improved diagnostic yield compared with targeted gene sequencing panels suggests a role for whole-genome sequencing as a first-tier genic test. Genet Med . 2017; Aug 3. doi: 10.1038/gim.2017.119.
2. Farnaes L, Hildreth A, Sweeney NM, et al. Rapid whole-genome sequencing decreases infant morbidity and cost of hospitalization. NPJ Genom Med. 2018;3:10. doi: 10.1038/s41525-018-0049-4.
3. Lindstrand A, Eisfeldt J, Pettersson M, et al. From cytogenetics to cytogenomics: whole-genome sequencing as a first-line test comprehensively captures the diverse spectrum of disease-causing genetic variation underlying intellectual disability. Genome Med . 2019;11(1):68. doi:10.1186/s13073-019-0675-1.
4. Clark MM, Stark Z, Farnaes L, et al. Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected diseases. NPJ Genom Med . 2018 Jul 9;3:16. doi: 10. 1038/s41525-018-0053-8.
5. Splinter K, Abrams DR, Bacino CA et al. Effect of Genetic Diagnosis on Patients with Previously Undiagnosed Disease. N Engl J Med. 2018;379(22):2131-2139.
6. French CE, Delon I, Dolling H, et al. Whole genome sequencing reveals that genetic conditions are frequent in intensively ill children. Intensive Care Med . 2019;45(5):627636. doi:10.1007/s00134-019-05552-x.

© March 23, 2021 7:24 PM Illumina, Inc. All rights reserved. PUB 1070-2020-001 QB 10225

다우 바이오메디카 DOW BIOMEDICA

illumina® AUTHORIZED CHANNEL PARTNER

Dxome

RUO

DxLiquid

HEADQUARTER
#1002, 8, Seongnam-daero 331 beon-gil, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

CONTACT
+82 2-363-3336
WEBSITE
www.dxome.com

[Pan100 & TMB 500]

Optimal solution for cancer detection using ctDNA!

DxLiquid provides a comprehensive analysis genomic abnormalities for the detection of multiple cancers. The panel incorporates SNV, InDel, CNV, RNA-fusion, Microsatellite instability(MSI), Tumor Mutation Burden (TMB) for a complete coverage of cancer detection.

Product Information

Core Genes	HER2, EGFR, ALK, KRAS, NRAS, BRAF, BRCA1, BRCA2, KIT, PDGFRA, IDH1, IDH2 MYC(C-myc), N-myc(MYCN) and more

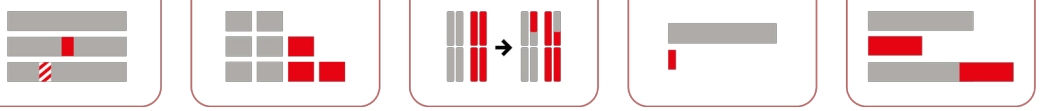
- Non-Invasive
- High value biomarkers
- Low input DNA
- Robust analysis

Validation conditions		
Product	Pan100	TMB500
Sample	30ng	30ng
Sequencing	20Gb	120Gb
Depth	20,000x	35,000x
LOD	AF ≤ 0.25%	AF ≤ 0.25%
Platform	NextSeq	NovaSeq

DxLiquid Platform

Sample Collection → Sample Preparation → Target Enrichment → Sequencing → Analysis & Report

SNP & InDel | CNV | Translocation | MSI | RNA Fusion | TMB



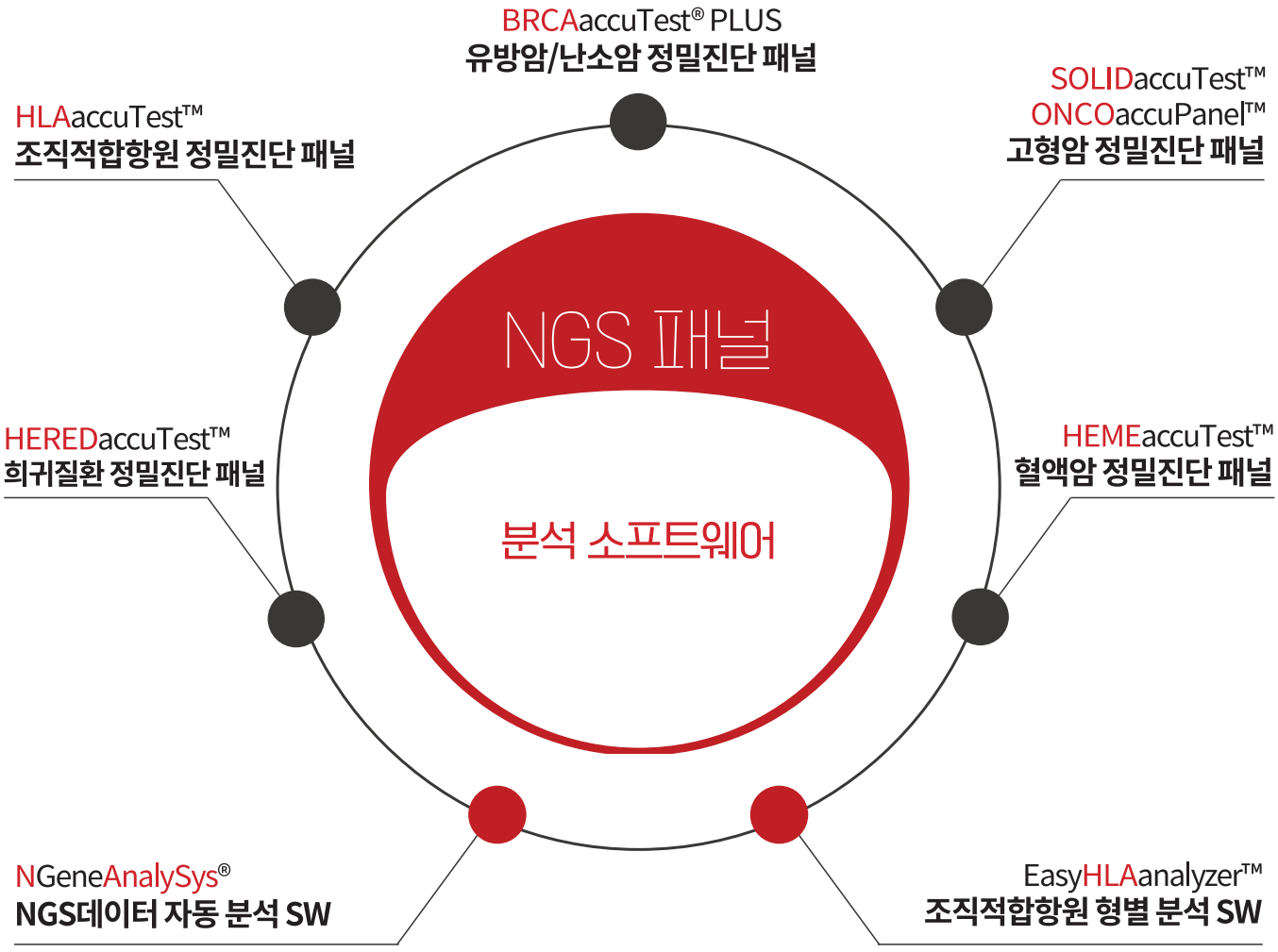
DxLiquid Pan100

DxLiquid TMB500

Copyright© 2021. Dxome. All rights reserved.

NGS TOTAL SOLUTION

NGeneBio는 NGS 기반의 정밀진단 키트와 유전자 변이 분석 소프트웨어를 제공함으로써,
임상 연구 및 진단에 빠르고 정확한 결과를 얻을 수 있는 환경을 만들어 드립니다.



NGeneBio Office 303~307, Daerung Post Tower 1st, 288, Digital-ro Guro-gu, Seoul, Korea E-mail support.technology@ngenebio.com

www.ngenebio.com

These products are for research use only

NGB-MT-500UAK-20.004(0)-P

DIAGNOSE THE UNDIAGNOSED...

DES/WES/DGS

Diagnostic Exome Sequencing/Whole Exome Sequencing/Diagnostic Genome Sequencing

[NGS 기반의 유전질환 진단 유전자 검사 종류]

DES 진단용 엑솜 시퀀싱	잘 알려진 유전질환 관련 유전자의 compact한 분석	5,870개 (mtDNA 포함)	21일
WES 전장 엑솜 시퀀싱	대부분의 유전질환 관련 유전자의 wide한 분석	22,000개 (mtDNA 포함)	50일
DGS 진단용 전장 유전체 시퀀싱	가장 총합적인 인간 전체 유전체의 complete한 분석	Whole Genome (mtDNA 포함)	60일

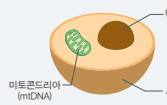
"무료 가족검사를 제공합니다."

- 부, 모, 형제 무료
- 환자 검사 결과에 보고된 변이에 대해 제공

◆ 검사 가능 질환 카테고리 ◆

◆ 검출 가능 변이 및 검사 영역 ◆

			DES	WES	DGS
검출 가능 변이	SNV		V	V	V
	InDel		V	V	V
	CNV		V	V	V
	GR				V
검사 유전자	nDNA		V	V	V
	mtDNA		V	V	V



* SNV(Single Nucleotide Variant) / InDel(Insertion & Deletion) / CNV(Copy Number Variant) / GR(Gene Rearrangement)

◆ NGS 기반 유전질환 진단 유전자검사

검사명	DES	WES	DGS
검사 유전자	5,870개(mtDNA 포함)	22,000개(mtDNA 포함)	Whole Genome(mtDNA 포함)
검체	Whole blood 1~3cc		
검체 용기/보관	EDTA/실온(1일), 냉장(3일)		
검사 소요일/결과 제공일	월-금, 21일/28일	월-금, 50일/55일	월-금, 60일/65일
검사 방법	NGS		
급여 여부	해당없음		
필수서류	유전자검사동의서, DES/WES/DGS 의뢰서		

[유전체]DES/WES/DGS(플랫)-LI(KR)-v1.0-EX-MKT-LCY-21.01.25

GC 녹십자지놈

16924 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107
고객센터. Tel.031-280-9900 **Fax**.031-260-9087 www.gcgenome.com

CAP ACCREDITED
COLLEGE of AMERICAN PATHOLOGISTS

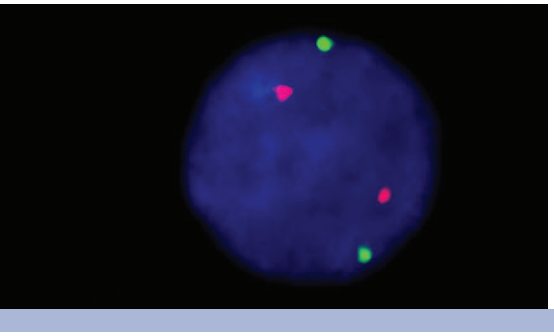
sysmex | Lighting the way with diagnostics

Oxford Gene Technology

The Molecular Genetics Company™

ogt

Cytocell



SureSeq™

CytoSure™

Let our expertise work for you

- **Cytocell® FISH probes** – a comprehensive range of probes for haematology, pathology and constitutional applications. All probes demonstrate tight, bright signals to give you the confidence you require in your analysis.
- **CytoSure™ array products** – Labelling kits, microarrays and software designed to offer superior resolution and data quality on the most important genomic targets across a range of applications.
- **SureSeq™ NGS products** – an extensive range of next generation sequencing (NGS) panels and library preparation products delivering unparalleled coverage uniformity and confident detection of low-frequency variants.

Oxford Gene Technology - we have all the bases covered

시스멕스코리아㈜ Tel. 1833-5366 Fax. 02-3498-5312 www.sysmex.co.kr

대한진단유전학회
Korean Society for Genetic Diagnostics

ksgd.org 02-772-9004 ksgd.office@gmail.com 04323 서울시 용산구 한강대로 372 센트레빌아스테리움 A동 505호