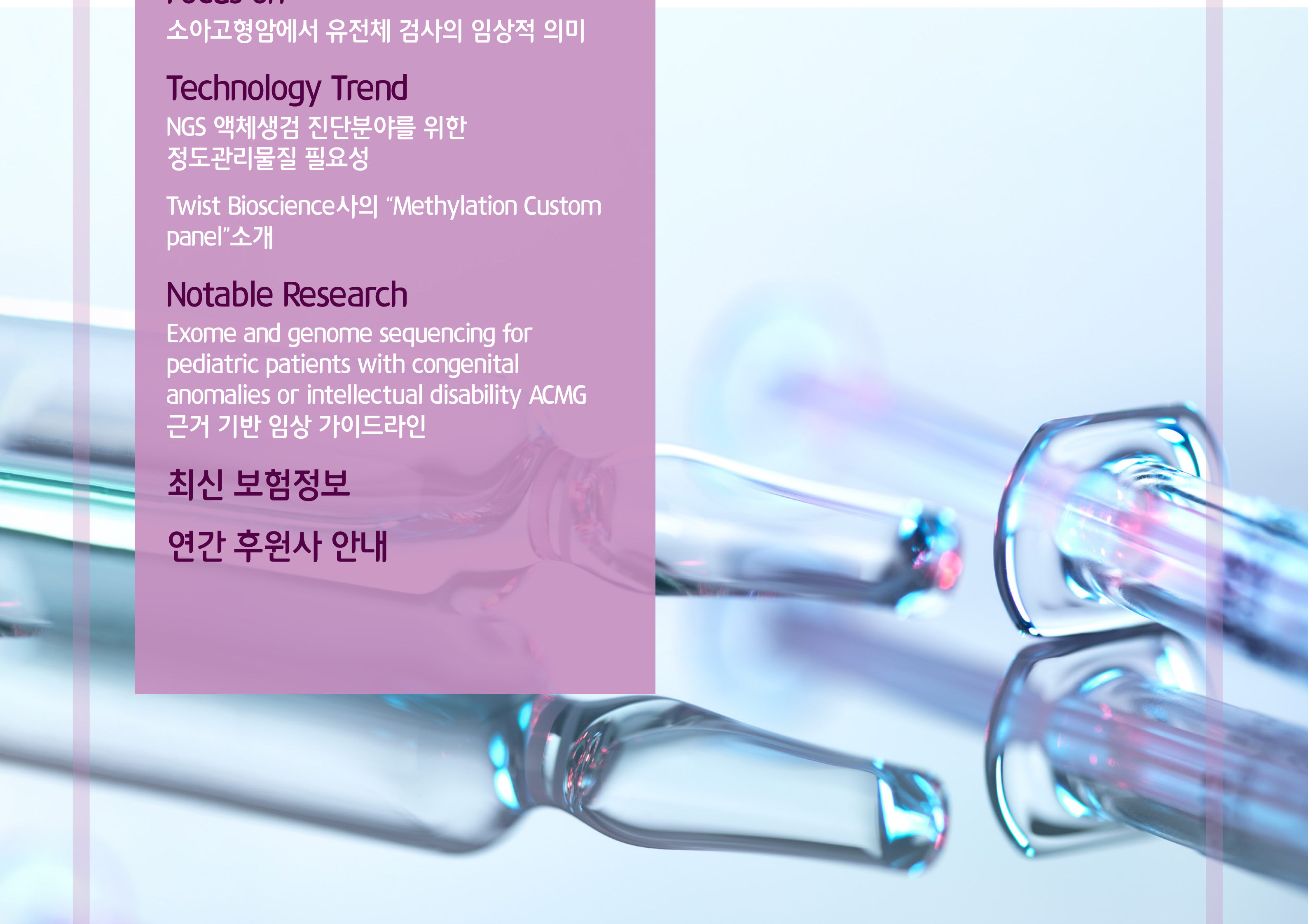
Korean Society for Genetic Diagnostics

KSGD News Forum

Vol.16

December 2021

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



대한진단유전학회
Korean Society for Genetic Diagnostics

소아고형암에서 유전체 검사의 임상적 의미

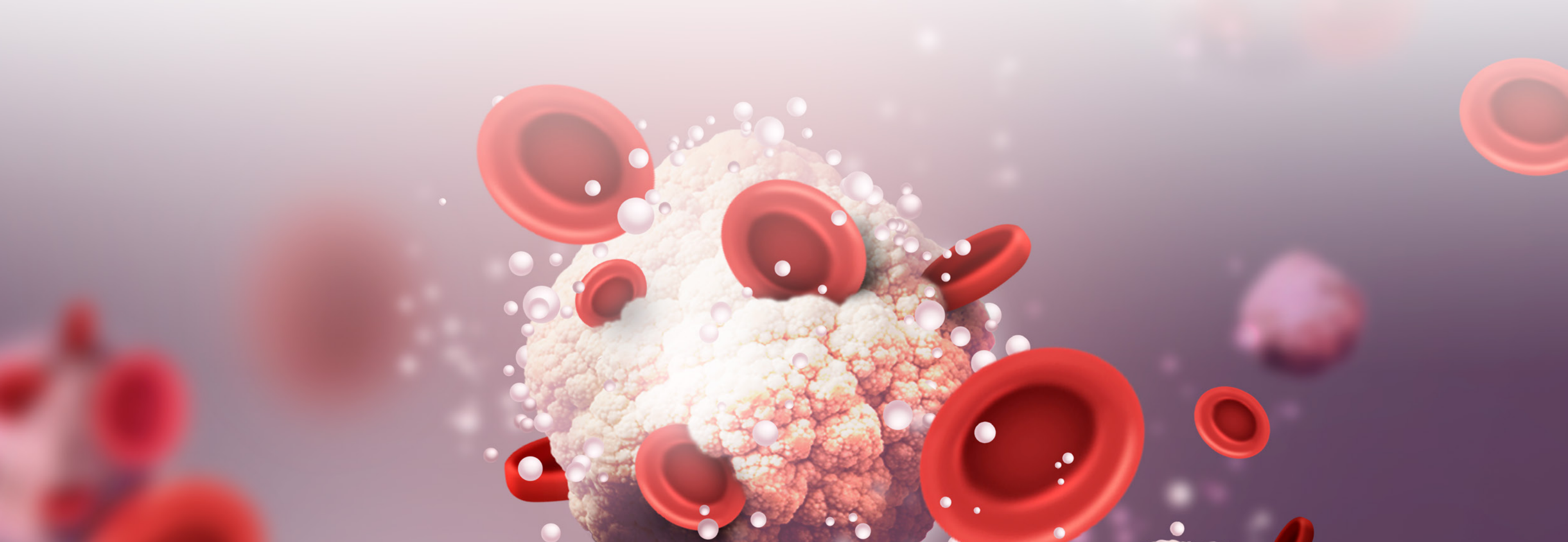
이지원

삼성서울병원 소아청소년과

전통적으로 소아고형암의 진단은 종양 조직의 병리학적 진단을 기반으로 하였으나, 형태학적 진단만으로는 질환의 다양한 임상적 경과를 설명하기에 충분하지 않은 경우가 많았다. 분자유전학적 기법이 발달하고 임상 영역에 도입되면서 소아고형암의 진단, 예후군 분류 및 치료에도 많은 변화가 생겨나고 있다.

고형암 진단에서의 중요성

차세대염기서열분석 (Next generation sequencing; NGS)이 도입되기 전에도 몇가지 분자유전학적 바이오마커가 소아고형암의 진단 및 예후군 분류에 이용되어 왔다. 예를 들어, 소아고형암 중 단일 암종으로 가장 흔한 종양인 신경모세포종 (neuroblastoma)에서는 *MYCN* 유전자의 증폭 (amplification) 혹은 분절염색체변화 (segmental chromosomal alteration)가 있는 경우 불량한 예후를 보인다는 것이 알려져 왔으며, 이 중 특히 *MYCN* amplification은 매우 강력한 예후인자로 신경모세포종 위험군 분류에 중요한 지표로 포함되어 왔다 [1, 2]. 횡문근육종 (rhabdomyosacoma)은 형태학적으로 배아형 (embryonal type)과 포상형 (alveolar type)으로 나누고, 일반적으로 포상형 횡문근육종의 예후가 불량한 것으로 알려져 왔으나, 최근에는 형태학적 분류 보다는 *FOXO1* 유전자의 전좌 (translocation)의 존재가 예후에 더 중요한 것으로 확인되었다 [3]. 이 외에도 *EWSR1* 유전자의 전좌는 Ewing 육종 혹은 결합조직성 소원형세포종양 (desmoplastic small round cell tumor; DSRCT)의 진단에 중요한 바이오마커로 활용되고 있다.



이전의 *MYCN* 증폭 혹은 *FOXO1*, *EWSR1* 유전자의 전좌 등이 주로 FISH (Flourscence in situ hybridization) 검사로 확인이 되었다면, 최근에는 NGS가 소아고형암의 진단에도 많이 응용이 되고 있다. 특히 이러한 분자유전학적 진단과 형태학적 진단을 통합한 통합진단 (Integrated diagnosis)은 특히 중추신경계 종양에서 그 역할이 두드러지고 있다. 2016년도에 개정된 중추신경계 종양의 WHO classification 에서는 기존의 형태학적 진단에 분자진단을 통합하여 진단과 예후군 분류를 보다 정확히 하고자 하였다. 분자유전학검사에 따라 기존의 진단 분류가 세분화 되거나 혹은 새로운 진단 분류가 생기기도 하였는데, 예를 들어 H3의 변이를 동반한 diffuse midline glioma-histone H3 K27M mutant 라는 새로운 진단 분류가 생겼으며, 예후가 매우 좋지 않은 종양으로 알려져 있다. 한편, 드문 암종에서는 형태학적 진단으로 정확한 진단 분류를 하기 어려운 경우들이 있으며, 이런 경우에 NGS 검사 결과가 진단에 도움을 주기도 한다. 실제로 NGS를 임상에 적용한 연구에서 약 3-5%의 환자에서 NGS 검사 후 진단이 변경된 것이 보고되기도 하였다 [4, 5].

우리나라가 NGS 패널의 급여로 인해 분자진단이 비교적 잘 되고 있는 나라임에도 불구하고, 분자진단 분류의 발전속도를 임상 현장이 따라가지 못하고 있는 상황도 발생하고 있다. 예를 들어, 소아뇌종양의 일종인 수모세포종 (medulloblastoma)에서의 분자유전학적 진단 및 그에 따른 예후군 분류는 매우 복잡한데, 여러 연구에 의해 수모세포종 안에는 WNT, SHH, Group 3, Group 4로 명명된 최소 4개의 molecular subgroup이 존재한다는 것이 알려졌으며, 이것이 2016년 WHO 분류에도 포함이 되었다. 더 나아가 이 molecular subgroup을 기반으로 하고, *TP53*, *MYC* amplification, chromosome loss 등 DNA 이상소견을 종합한 새로운 위험군 분

	WNT	SHH	Group3	Group4	Other
LR	<16y			All of the following: - Non-metastatic - Chr. 11 loss	
SR		- TP53 wt (somatic or germline) - No MYCN amplification - Non-metastatic	All of the following: - No MYC amplification - Non-metastatic	All of the following: - Non-metastatic - No Chr. 11 loss	
HR		One or both: - Metastatic - MYCN amplification		Metastatic	
VHR		TP53 mutation (metastatic or non-metastatic)	Metastatic		
Unknown	Metastatic		Non-metastatic with MYC amplification Significance of anaplasia Isochromosome 17q	Significance of anaplasia	Melanotic medulloblastoma Medullomyoblastoma Boundary between Group 3/4 Definition of MYC & MYCN amplification

그림1. 수모세포종에서 분자유전학적 검사를 기반으로 한 새로운 위험군 분류

류가 제시되었다 (그림1) [6, 7]. 이 중 특히 WNT subgroup은 예후가 매우 좋은 것으로 알려져 있다. 현재 많은 국가에서 수모세포종 WNT group에서는 치료 강도를 낮추는 임상시험을 진행 중이어서, 환자들에게 과하지도, 덜하지도 않은 맞춤치료를 시행하기 위하여는 위험군 분류를 제대로 하는 것이 필요하다. 문제는, 이 네 개의 molecular subgroup을 나누는 표준적 검사법이 methylation profiling 혹은 gene expression profiling 이어서, 실제로 이러한 검사들이 의료기관 내 혹은 CLIA 인증기관에서 시행되고 있지 않은 나라들이 대부분이고, 국내에서도 NGS, 면역조직화학염색 (immunohistochemistry; IHC)등으로 보완하거나, 혹은 외부 검사실에서 일부 검사를 하고 있지만, 임상에 완전히 도입되었다고 보기는 어려운 상황으로 앞으로 해결해 나가야할 숙제라고 하겠다.

고형암 치료에서의 중요성

성인암에서만큼 활발하지는 않지만, 소아고형암에서도 종양유전체 검사 결과에 따라 해당되는 표적항암제 혹은 면역항암제를 시도하는 임상시험이 점차 늘어나고 있다. 성인암과의 차이점은 개별 암종마다 충분한 환자수를 확보하기 어렵기 때문에, 다양한 암종을 대상으로 하는 basket trial이 주가 되고 있다는 점이다. 미국 국립암연구소 (National Cancer Institute; NCI)에서 미국소아암학회 (Children’s oncology group; COG)와 함께 시행하는 NCI-pediatric MATCH 임상연구에서는 재발성 암을 대상으로 종양 유전체 검사를 시행하고, 해당되는 유전적 변이가 있는 경우 해당되는 임상시험에 등록하는 형태의 basket trial이 진행되고 있으며, 2021년 11월 현재 총 13개의 arm이 운영되고 있다. 그 외에도 캐나다, 독일, 프랑스, 호주 등 세계 각국에서

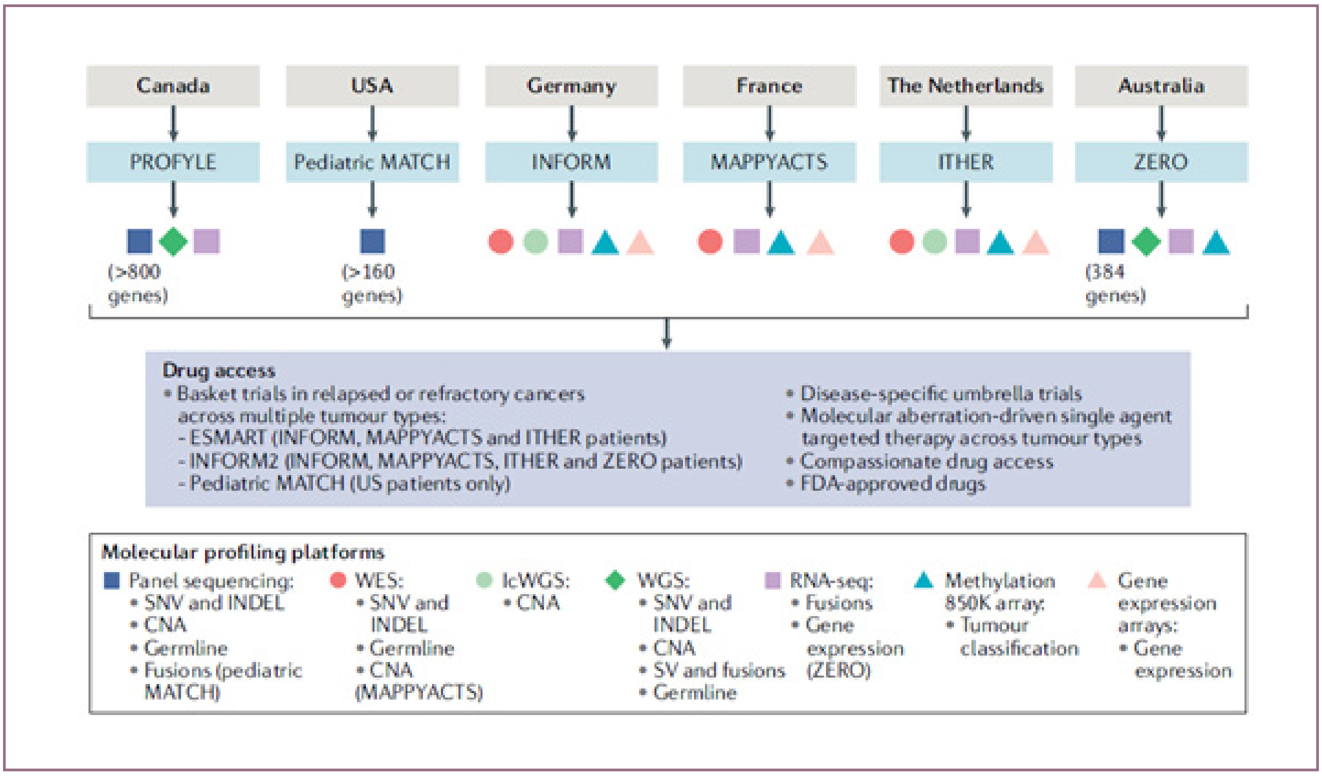


그림2. 각 나라의 소아청소년암 정밀의료 플랫폼

는 유전체 프로파일링을 진단 및 치료에 응용하는 정밀의료 플랫폼을 운영하고 있다 (그림2) [8].

실제로 이러한 접근을 통해 이전에는 치료가 불가능하였던 암에서 좋은 치료효과를 보이면서 생존기간이 증가되는 것이 확인되고 있다. 예시로, 저등급교종 (low grade glioma)은 BRAF fusion을 많이 동반하는 것으로 알려져 있는데, 재발한 저등급교종을 대상으로 MEK 억제제를 사용한 임상시험에서 뚜렷한 치료 효과가 있는 것이 확인되었다 [9]. 최근에는 TRK fusion 양성인 종양을 대상으로 TRK 억제제를 사용한 임상시험이 79%의 매우 높은 반응율과 오랜 반응지속기간을 보이면서 단시간에 미국 FDA와 국내 KFDA의 허가를 얻기도 하였다 [10]. 특히, 이 허가는 종양의 형태학적 진단과 무관하게 NTRK fusion이 있는 모든 종양을 대상으로 허가가 되었다는 점이 기존 약제들과의 차이점이다.

국내에서도 유전체 진단에 기반한 임상시험들이 다수 진행되고 있고, 허가 약제들도 점점 늘어남에 따라 소아고형암, 특히 재발성/불응성 암에서의 유전체 진단은 점점 그 중요성이 커지고 있다.

이와 같이, 소아고형암에서 유전체 검사는 정확한 진단과 예후군 분류를 가능하게 하여 환자별 맞춤 치료가 가능하게 함과 동시에, 새로운 molecular targeted drug 적용의 가능성을 제시할 수 있다. 한편으로는 성인암보다 유전체 변이가 적고, fusion과 같은 구조적 변이(structural variant)가 더 많은 소아암의 특성상, 기존에 개발된 패널검사 만으로는 여전히 유전체 진단의 한계가 있을 수 있다는 문제가 있다. 이에 보다 광범위한 유전체 검사 등을 적용하려는 노력도 필요하다고 하겠다.

1. Janoueix-Lerosey, I., et al., Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. J Clin Oncol, 2009. 27(7): p. 1026-33.
2. Schleiermacher, G., et al., Segmental chromosomal alterations have prognostic impact in neuroblastoma: a report from the INRG project. Br J Cancer, 2012. 107(8): p. 1418-22.
3. Missiaglia, E., et al., PAX3/FOXO1 fusion gene status is the key prognostic molecular marker in rhabdomyosarcoma and significantly improves current risk stratification. J Clin Oncol, 2012. 30(14): p. 1670-7.
4. Harris, M.H., et al., Multicenter Feasibility Study of Tumor Molecular Profiling to Inform Therapeutic Decisions in Advanced Pediatric Solid Tumors: The Individualized Cancer Therapy (iCat) Study. JAMA Oncol, 2016.
5. Wong, M., et al., Whole genome, transcriptome and methylome profiling enhances actionable target discovery in high-risk pediatric cancer. Nat Med, 2020. 26(11): p. 1742-1753.
6. Northcott, P.A., et al., Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. J Clin Oncol, 2011. 29(11): p. 1408-14.
7. Ramaswamy, V., et al., Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. Acta Neuropathol, 2016. 131(6): p. 821-31.
8. Jones, D.T.W., et al., Molecular characteristics and therapeutic vulnerabilities across paediatric solid tumours. Nat Rev Cancer, 2019. 19(8): p. 420-438.
9. Fangusaro, J., et al., A phase II trial of selumetinib in children with recurrent optic pathway and hypothalamic low-grade glioma without NF1: a Pediatric Brain Tumor Consortium study. Neuro Oncol, 2021. 23(10): p. 1777-1788.
10. Hong, D.S., et al., Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials. Lancet Oncol, 2020. 21(4): p. 531-540.

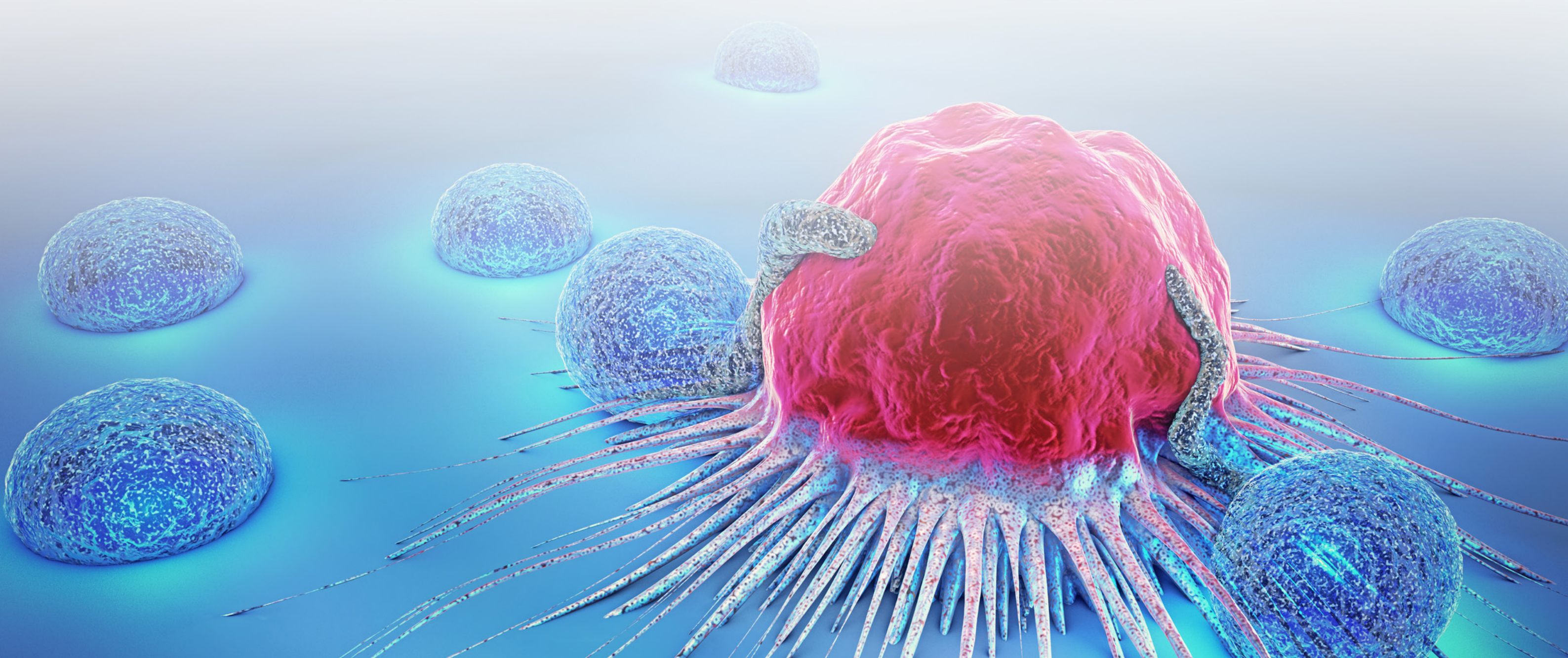
NGS 액체생검 진단분야를 위한 정도관리물질 필요성

다우바이오메디카

차세대염기서열분석법(NGS)는 2017년 NGS 유전자패널 검사가 선별급여로 보험 적용된 이후 현재 총 63기관에서 시행되고 있습니다. NGS 유전자패널 검사의 고형암 분야는 2019년 한차례 개정을 통해 전체 암종으로 확대됨과 동시에, 인정 기준을 초과한 고형암 검사 분야는 검사비 90% 환자부담으로 허용되었습니다. 이러한 보험 제도의 변화는 고형암 환자를 대상으로 액체생검을 적용할 수 있는 시금석이 되었습니다.

액체생검은 세계 선도적인 NGS 전문업체 Illumina(CA, USA)사의 패널과 플랫폼을 기반으로 진단 시장이 개척되었으며, 많은 국내 panel 제조사와 연구소등에서도 전용 패널과 분석툴 개발을 서둘러 출시하였습니다. 검사 단가가 높으며 보다 정밀한 분석을 수행해야 하는 NGS 기반 액체생검은 run마다 검사가 원활하게 진행되는지 판단할 수 있는 과정이 필요합니다. 이에 QC물질 전문기업 LGC Seracare사는 액체생검용 정도관리물질 제품을 출시하였습니다.

LGC Seracare사의 정도관리물질은 국내 panel 제조사의 개발 과정에 reference material로 사용된 바 있습니다.



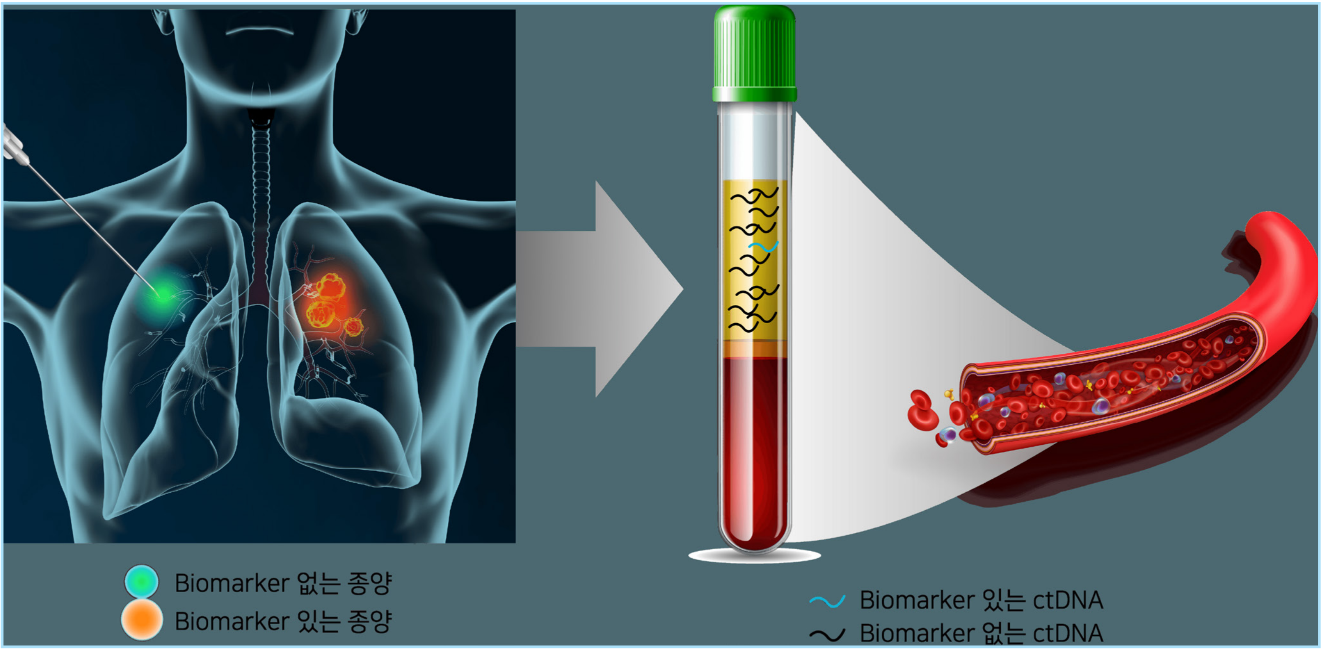


그림1. ctDNA는 미량의 검체에서 target biomarker를 찾을 수 있으며, 조직검사를 보완할 수 있습니다.

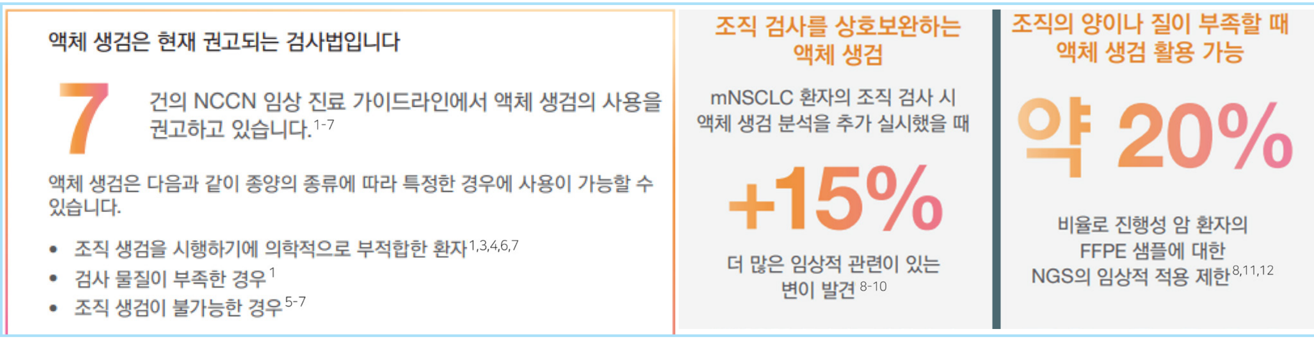


그림2. 액체생검을 권고하는 NCCN 임상 진료 가이드라인.

1. 액체생검은 조직검사의 실패율과 제한점을 보완할 수 있습니다.

암 발생부위에서 누출된 circulating tumor DNA (ctDNA)는 온 몸을 순환하기 때문에, 조직검사 검체 채집 시 발생하는 지엽적 실패를 방지합니다. 종양 내 이질성(Tumor heterogeneity)은 반복적인 조직검사를 강요하는 주된 실패 요인입니다. 표적치료제의 biomarker 발견을 전제하는 동반진단의 검사방법으로 조직검사보다 액체생검이 더 효과적입니다.

NCCN 임상 진료 가이드라인에서는 1) Non-Small Cell Lung Cancer, 2) Breast Cancer, 3) Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers, 4) Gastric Cancer, 5) Prostate Cancer, 6) Pancreatic Adenocarcinoma, 7) Histiocytic Neoplasms 등 7 종에 대하여 액체생검의 사용을 권고하고 있습니다.

2. ctDNA 전용 pan-caner panel은 진단과 biomarker 탐색에 적용할 수 있습니다.

NGS 유전자패널검사의 고형암 분야는, 2019년 개정(고시 제2019-75호)을 통해, 소규모 암종별 panel에서 대규모 pan-cancer panel로 전환되었습니다. Pan-cancer panel의 유전자 수는 ~500개로 증가되었고, 패널사이즈도 DNA와 RNA를 통합 ~2.5 Mb로 확대되었습니다. 그와 함께, 단일염기치환(SNV)와 삽입/결실(Indel) 외에도 Microsatellite instability(MSI)와Tumor mutation burden(TMB) 등 biomarker를 탐색하는 Pan-cancer 패널이 출시되고 있습니다.

Biopsy 검체를 활용한 절편길이분석법(fragment analysis) 기반MSI와 whole exome sequencing(WES) 기반 TMB를 NGS 유전자패널검사를 통해 통합분석 하는 방식은 NGS 유전자패널검사의 고형암 분야에 전환점이 되었습니다. 그러나 침습적인 조직검사에 대한 환자 부담과 종양의 각 부위별 상이한 유전변이로 인한 검사 실패율은 여전히 문제로 남아 있습니다.

ctDNA를 활용한 pan-cancer panel로 MSI와 TMB 등 biomarker를 찾는 액체생검 관련 연구가 활발히 진행되고 있습니다.

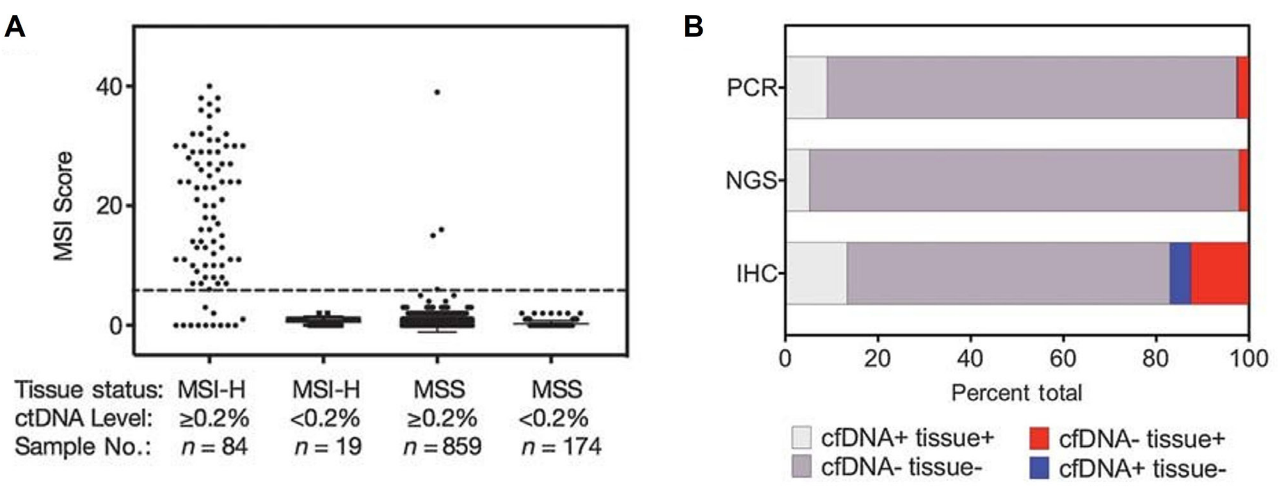


그림3. Concordance of ctDNA MSI status with tissue testing

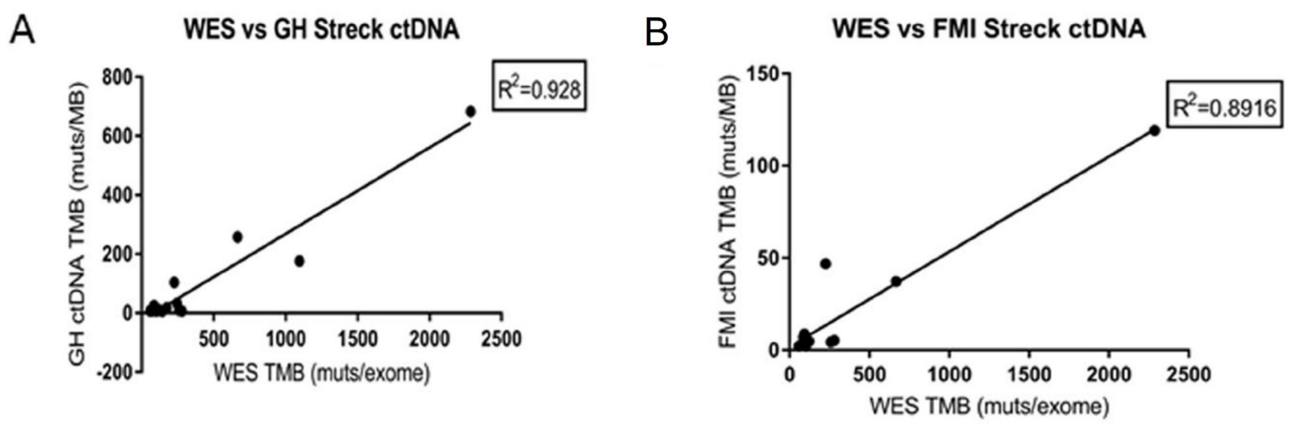


그림4. Comparison of TMB measured by WES (muts/exome) in tissue biopsies and TMB measured from ctDNA (muts/MB), GH: GuardantHealth, FMI: Foundation Medicine.

Product Name	NGS Assay	Av. MSI Sites Detected*	Av. Unstable MSI Sies*	Av. MSI Score*	MSI Call
Seraseq gDNA MSI-High Mix	TSO500	106	81	77.1	High
Seraseq® FFPE MSI-High RM	TSO500	119	90	75.6	High
		105	75	71.4	High

TMB Reference Material	Cell Line	TMB Scores (gDNA)	TMB Scores (FFPE)	TMB Scores (ctDNA)
Seraseq® TMB Score 7	Small cell lung cancer; carcinoma	7.2 ± 0.2	7.2 ± 0.4	5.6 ± 2.1 (0.5% TF) 10.4 ± 1.7 (2% TF)
Seraseq® TMB Score 9	Lung adenocarcinoma (stage 1)	9.5 ± 0.4	7.5 ± 1.3	N/A
Seraseq® TMB Score 13	B-Lymphocyte	12.6 ± 0.02	12.1 ± 0.3	14.1 ± 2.2 (0.5% TF) 20.0 ± 0.9 (2% TF)
Seraseq® TMB Score 20	Non-small cell lung cancer; carcinoma	20.1 ± 0.2	18.6 ± 0.5	18.5 ± 2.7 (0.5% TF) 28.1 ± 1.7 (2% TF)
Seraseq® TMB Score 26	Lung adenocarcinoma (stage 4)	25.8 ± 0.5	22.8 ± 3.6	14.7 ± 2.4 (0.5% TF) 24.4 ± 1.5 (2% TF)

표1. SeraSeq MSI, TMB 관련 제품군

3. 액체생검의 취약점과 ctDNA 정도관리물질의 필요성

조직검사 시 채집된 biopsy 검체의 양적, 질적 문제와 마찬가지로 액체생검의 혈액 검체의 적합성은 진단 및 추적조사의 유효성과 안전성을 평가하는 중요한 척도입니다.

종양의 병기와 발생위치에 따른 요인 외에도 암종 별로 혈액 내 ctDNA 방출량의 변동성이 크고, 혈액 검체 채집양과 적합한 채혈시간, 보존과 추출 방법에 대한 표준화된 방법이 아직 정립되지 않았습니다. 이런 조건에서 환자 ctDNA 샘플을 활용한 연구와 평가 목적의 검사는 어려울 수밖에 없습니다. 특히, 동등성 평가와 성능 평가와 같이 동일한 검체 시료를 사용해야 하는 경우에는 적은 양의 환자 ctDNA를 활용하는 것이 현실적으로 불가능 합니다.

대안으로 patient-like reference material(이하, reference material) 사용을 검토해 볼 수 있습니다. Seraseq ctDNA Complete reference materials는 NGS기반의 ctDNA 검사를 철저하게 검증하고 임상적

AKT1	EGFR	NCOA4-RET
ALK	ERBB2	CD74-ROS1
BRAF	KIT	EML4-ALK
BRCA1	KRAS	
BRCA2	PIK3CA	

표2. 환자검체 유사 reference material 에 포함된 13개의 유전자

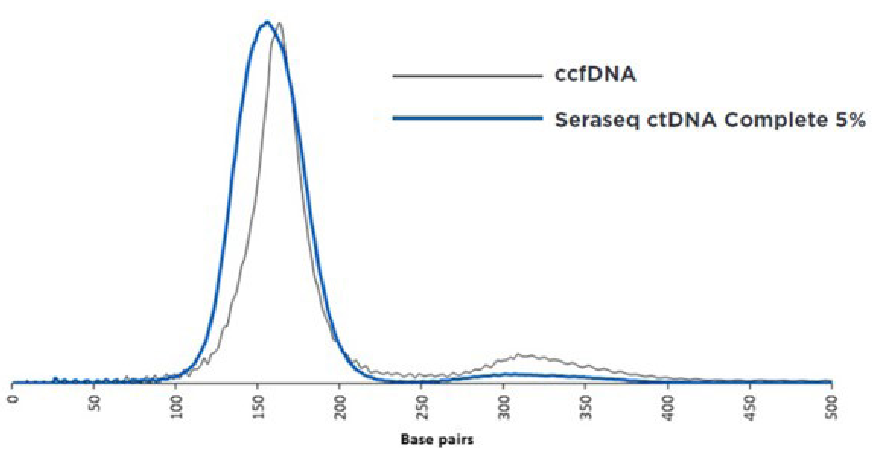


그림5. 환자 검체의 ctDNA 패턴과 SeraSeq ctDNA 정도관리 물질의 패턴 유사성

으로 빠르게 적용할 수 있도록 특별히 고안되었습니다. 이러한 직교적으로 검증된 truth-set 물질은 단일 표준물질에 여러 변이의 유형들을 거의 완벽하게 커버함으로써 검사에 대한 검증 기간을 수주에서 많게는 수개월까지 단축시킬 수 있습니다. 검사의 다양성을 위해 0%부터 0.1%, 0.5%,1% 2.5%, 5%까지 다양한 allele frequency를 제공합니다.

Product	Material No	Conc.	Fill Volume	Total Mass
Seraseq ctDNA MRD Panel Mix (Kit contains 4 vials: 0%, 0.5%, 0.05% & 0.005% turnor fractions)	0710-2146	10 ng/ul	20 ul	200 ng (X4)

BCL2	MYD88	SF3B1	HSP90AA1-BCL6
BRAF	CXCR4	STAT3	CCND1-CDC42BPB
DNMT3A	NOTCH1	STAT5B	BIRC3-MALT1
EZH2	NOTCH2	TP53	MYC-IGH
IDH2	RHOA	NPM1-ALK	TBL1XR1-TP63

표3. Seraseq ctDNA 제품정보

Reference

1. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Version 3.2021: Non-Small Cell Lung Cancer

2. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Version 1.2021: Breast Cancer

3. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Version 1.2021: Esophageal and Esophagogastric Junction Cancers

4. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Version 1.2021: Gastric Cancer

5. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Version 2.2021: Prostate Cancer

6. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Version 2.2021: Pancreatic Adenocarcinoma

7. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines) Version 2.2021: Histiocytic Neoplasms

8. Aggarwal C, Thompson JC, Black TA, et al. Clinical Implications of Plasma-Based Genotyping With the Delivery of Personalized Therapy in Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. JAMA Oncol. 2019;5(2):173-180. doi:10.1001/jamaoncol.2018.4305

9. Leighl NB, Page RD, Raymond VM, et al. Clinical Utility of Comprehensive Cell-free DNA Analysis to Identify Genomic Biomarkers in Patients with Newly Diagnosed Metastatic Non-small Cell Lung Cancer. Clin Cancer Res. 2019;25(15):46914700. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0624

10. Palmero R, Taus A, Viteri S, et al. Biomarker Discovery and Outcomes for Comprehensive Cell-Free Circulating Tumor DNA Versus Standdard-of-Care Tissue Testing in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer. JCO Precision Oncology. 2021; 5:93-102. doi:10.1200/PO.20.00241

11. Sholl LM, Do K, Shivdasani P, et al. Institutional implementation of clinical tumor profiling on an unselected cancer population. JCI Insight. 2016;1(19): e87062. Published 2016 Nov 17. doi: 10.1172/jci.insight.87062

12. Meric-Bernstam F, Brusco L, Shaw K, et al. Feasibility of Large-Scale Genomic Testing to Facilitate Enrollment Onto Genomically Matched Clinical Trials. J Clin Oncol. 2015;33(25):2753-2762. doi:10.1200/JCO.2014.60.4165

Twist Bioscience사의 "Methylation Custom panel"소개

(주)엘앤씨바이오
(Twist Bioscience사 한국 대리점)

Highly Sensitive Methylation Detection Using Enzymatic Methyl-seq and Twist Target Enrichment

Introduction

DNA methylation은 유전자 발현을 조절함으로써 세포성장에 있어서 중요한 역할을 담당한다. 어떤 경우에는, cytosine methylation의 오류로 인해 발암성 유전자가 발현될 수도 있다. 하지만 환자 샘플에서 이러한 잘못된 변화를 확인하는 것은 어려웠었다. 차세대 염기서열 분석법(NGS)이 sodium bisulfite가 처리된 DNA 상의 methylated cytosine을 검출하는데 효과적인 수단임이 입증되기는 하였지만, 이 화학적 변환과정은 DNA 손상을 야기하여 GC bias를 불러오고 complexity도 떨어지기 때문에 민감도가 제한적이 된다[1].

트위스트사(Twist Bioscience사)의 targeted methylation workflow에서는 liquid biopsy를 통한 암 검사와 같은 새로운 솔루션을 포함하여 다양한 환경에서 메틸롬(methylome) 분석을 위해 high complexity와 uniformity를 보이는 라이브러리를 생산하는 전체 솔루션을 소개한다. 이 전체 프로토콜은 enzymatic conversion방법을 Twist custom methylation panel을 이용한 hybrid-capture과정에 적용한 것이다. 이를 기존의 bisulfite conversion방법과 비교하여 설명하고 이 공정이 갖는 장점을 sequencing metrics를 통해 확인하였다.

그림1. Methylation Conversion. Methylation sequencing은 enzymatic 또는 chemical방법으로 unmethylated cytosine을 deamination 시켜 uracil로 변환시키는 반면 methylated cytosine은 그대로 유지시킨다. 증폭 단계에서 uracil은 complementary strand의 adenine과 결합하여 unmethylated cytosine이 thymine으로 치환된다. 변환 이후의 최종 산물은 비대칭형으로서 두 개의 서로 다른 double stranded DNA를 만든다(윗줄). methylated DNA는 동일한 과정을 거쳐 추가 염기서열이 생성된다 (아랫줄)

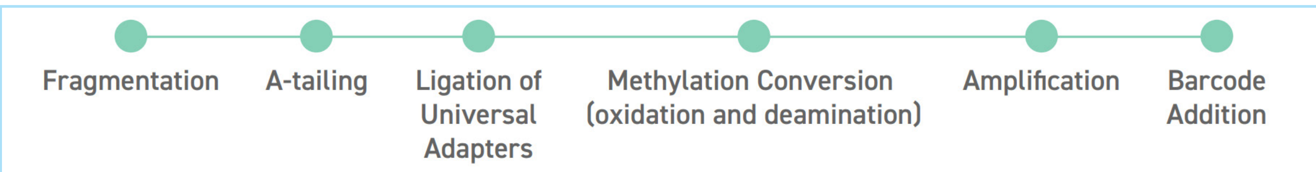
Result

Library Preparation for Methylation Detection

전통적 프로토콜에서는 bisulfite를 처리해 화학적으로 unmethylated cytosine을 uracil로 변환함으로써 methylated cytosine residue를 확인한다. PCR 후, unmethylated cytosine은 thymine으로 염기서열이 읽혀지고, methylated cytosine은 cytosine으로 읽혀진다 (그림 1).

그러나, bisulfite처리는 종종 sample preparation을 어렵게 만들 수 있는 DNA break를 야기하여 결국 methylation 검출까지도 어렵게 한다[2]. Twist Bioscience사는 New England Biolabs사와 협력하여 NEBNext® Enzymatic Methyl-seq (EM- seqTM)을 출시하였다. Sample 손상을 야기하는 chemical conversion 과정 없이도, bisulfite 처리와 동일한 변환 결과를 가져와 훨씬 좋은 최종 결과를 얻게 해준다.

methylation detection을 위한 라이브러리 제작은 다음의 6가지 주요 단계로 구성된다.



Enzymatic method와 bisulfite method은 비슷한 효율로 unmethylated cytosine을 thymine으로 변환시킨다(그림 2). 그러나, enzymatic method로 변환된 library는 GC비율이 높은 부위에서 증가하고 더 균일한 커버리지를 보여준다(그림 3). 이것은 잠재적으로 이러한 부위에서 DNA break가 덜 일어난 결과일 것이다.

Twist Methylation system은 라이브러리 제작과 enzymatic conversion 전에 mechanical shearing을 하기 때문에 fragment size가 다양하게 생겨난다. methylation detection을 위해 이 라이브러리 제작 방법을 사용할 때, 실제 fragment size는 초기 DNA가 얼마나 온전한 상태인가에 따라 결정되지만, Twist Bioscience사는 약 200 ~ 300bp 크기로 DNA를 fragmentation해서 최종 DNA fragment가 350bp ~ 450bp정도가 되는 것을 권장한다. 라이브러리 수율은 초기 DNA의 양과 라이브러리 제작 중에 사용하는 PCR cycle수에 따라 달라진다. Twist는 DNA농도, 200ng, PCR cycle 수를 9회로 시작하기를 권장한다. 이 권장사항은 다음 hybrid capture단계에서 capture할 수 있는 충분한 양의 DNA가 존재할 수 있도록 하기 위함이다. 최종 QC 단계에서는 fragment size를 (평균 peak size, 375bp) 확인한다.

Use of the Control DNAs in the Twist Targeted Methylation Sequencing Workflow

불완전 conversion이 되면, 변환되지 않은 unmethylated cytosine 은 methylation된 것으로 잘못 해석되기 때문에 분석에 있어서 false positive rate을 증가시킨다. 이를 줄이기 위해 methylation level이 알려진 standard DNA를 사용하여 conversion rate을 확인할 수 있다. Twist Targeted methylation sequencing workflow의 일부과정으로서, NEB EM-seq methylation library preparation kit는 CpG methylated pUC19 DNA와 unmethylated Lamda DNA를 optional control을 포함하고 있다. 이 두개의 control 모두 methylation level이 알려져 있기 때문에 sequencing 이후에 이들을 이용하여 conversion rate을 정확하게 판단할 수 있다. Target enrichment panel에 complementary probe가 부족할 수도 있기 때문에, 이 control 들은 hybrid capture에는 사용하지는 않아야 한다. 대신, hybrid capture 후에, sequencing을 위한 sample과 함께 섞는다.

Twist Workflow에서, 이 control의 유용성을 보여주기 위해, Twist NEBNext Enzymatic Methyl-seq Library Preparation Protocol의 appendix A를 참고하여 라이브러리를 제작하였다. 각 control DNA를 48㎕씩 한 튜브에 섞은 후 vacuum concentrator를 이용하여 건조시켰다. 건조시킨 DNA를 50 ㎕의 0.1X TE (pH 8.0) buffer에 녹인 후 라이브러리 제작과정을 진행하였다.

표 1은 measured conversion efficiency vs. expected conversion efficiency과 sequencing 후의 methylation level을 보여준다. EM-seq은 두 control에 대하여 99.5%를 넘는 conversion rate로 예상한 효율을 나타냈다. Unmethylated Lamda DNA와 CpG methylated pUC19 DNA control의 expected CpG methylation level은 각각 0.5%와 95~98%였다. 두 control의 CpG methylation level의 측정수준과 기대수준은 일치하였다. 분석은 methylation caller를 이용하여 계산하였다. 이는 알려진 methylation level의 control DNA는 1)

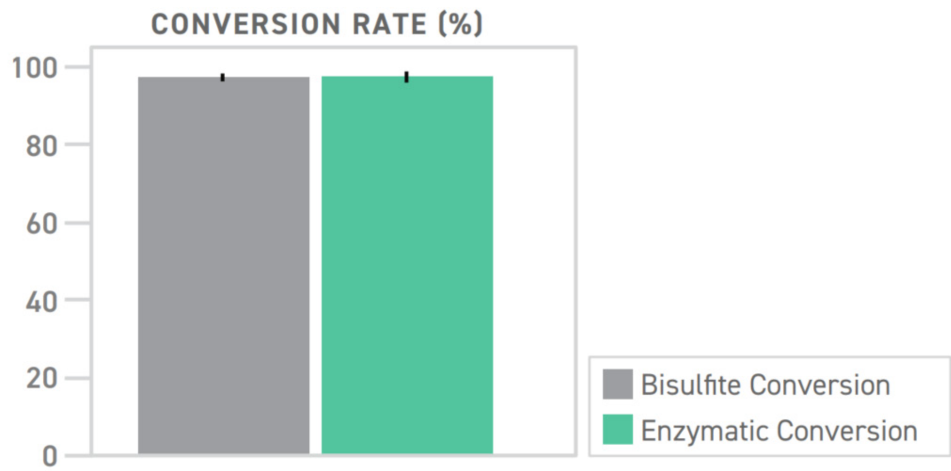


그림2. Conversion Rate Comparison for Bisulfite & Enzymatic Conversion.
두가지의 library 변환 방법 모두 non-CpG site에서 cytosine이 thymine으로 99.9% 이상 변환되었다.

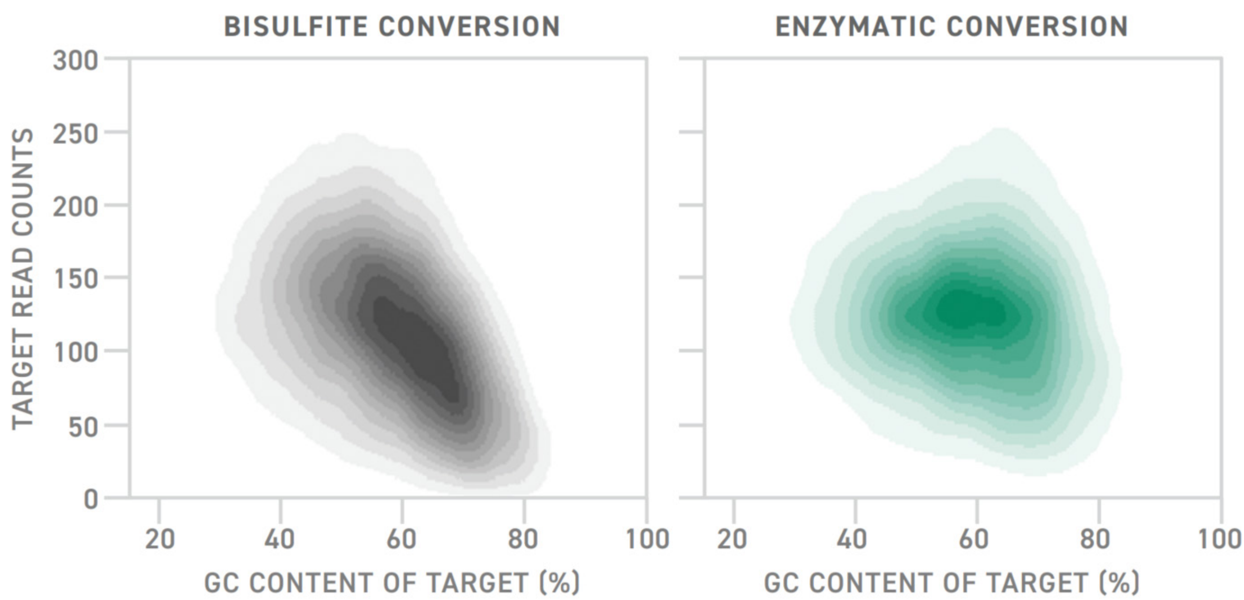


그림3. Coverage by Target GC Content for Bisulfite and Enzymatic Conversion.
두가지의 library 변환 방법은 모두 Twist Fast Hybridization target enrichment 적용가능하다. 그러나 enzymatic conversion방법을 사용해 제작한 library에서 hybrid selection metrics의 개선이 관찰된다. Bisulfite conversion method(gray)를 사용할 때는 high GC target region에서 coverage가 낮고, enzymatic conversion method(green)을 사용했을 때 bias가 낮게 나타난다.

conversion 과정이 완벽하고, 2)분석에 있어서 false positive를 최소화된 것을 확인하는데 사용할 수 있음을 보여준다. Twist는 EM-seq process 중에 enzymatic conversion rate에 대하여 확신이 없는 경우에는 이 control을 사용하도록 권장한다.

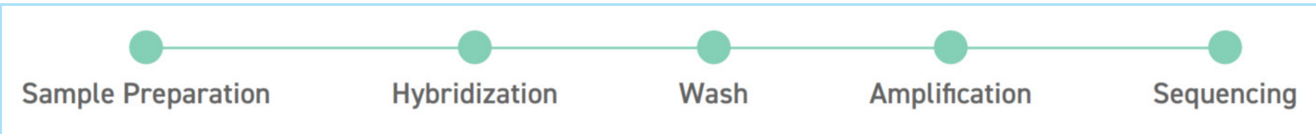
METRIC	UNMETHYLATED LAMBDA DNA	CpG METHYLATED pUC19 DNA
Expected Conversion Effciency	>=99.5%	>=99.5%
Measured Conversion Effciency	99.77%	99.57%
Expected CpG Methylation Level	Up to 0.5%	95-98%
Measured CpG Methylation Level	0.22228%	95.7572%

표 1. Conversion 효율 및 CpG methylation 의 기대치와 측정치 비교

Twist Target Enrichment for Methylation Detection

Twist Targeted Methylation Sequencing Workflow는 고감도의 customized methylation detection을 위해 Twist Fast hybridization Target Enrichment System을 이용한다. 이 시스템은 이전의 workflow보다 더 빠른 hybridization 시간에도 불구하고(이전보다 감소된 hyb시간) sequencing metrics에 영향을 주지 않고 동등 이상의 결과를 확인할 수 있다.

Twist Fast Hybridization Target Enrichment System은 다음의 5단계로 이뤄져 있다.



이 시스템은 최대 8개의 sample을 pooling해 실험을 진행할 수 있고, manual시간과 pipetting횟수도 감소시켰다. Twist Targeted Methylation Sequencing protocol은 다양한 맞춤형 메틸화 패널에 적합한 최고의 관리기준을 적용하기를 권장한다. 그러나, 모든 target capture system에서와 마찬가지로, target size 및 methylation level을 포함한 다양한 요인들이 최종 capture data metrics에 영향을 미칠 수 있다. 이러한 요인들이 시퀀싱 효율에 미치는 영향은 아래에서 논의한다.

Target Region Size

custom target region과 관련된 많은 요인들이 최종적인 targeted sequencing metrics에 영향을 미치기 때문에, 가장 좋은 결과를 얻기 위해서는 최적화가 필요할 수 있다. 예를 들면, 매우 작은 패널(<0.5 Mb) 또는 target region 상에 high GC content을 가진 패널은 패널 설계 상의 작은 변화에도 특히 민감하다. 포괄성과 off-target control 사이에서 어떻게 최적의 균형을 이루는 가는 target 영역의 특징과 패널의 적용 목적에 달려있다. 예를 들어, 패널 설계 과정에서 중간크기의 패널과 적은 수의 샘플을 다루는 연구자는 늘어난 off-target capture의 비율을 맞추기 위해 추가 시퀀싱이 필요할 수 있음에도 불구하고 패널에 대해 일정한

probe수를 유지하는 것을 선호할 수 있다. 반면, 훨씬 작은 패널(이 경우 off-target capture가 다른 패널에 비해 필요한 시퀀싱양이 더 빠르게 증가)을 다루는 연구자들이나, 아주 많은 수의 샘플(이 경우 비용이 증가할 수 있음)을 다루는 연구자들은 비용을 최적화하기 위해 설계조건을 더 엄격하게 하는 것을 선호할 수 있다.

패널 크기와 sequencing metrics 간의 관련성을 평가하기 위해, 3개의 다른 패널을 Twist Targeted Methylation Sequencing Workflow과 함께 사용하였다. 각 패널들은 다양한 크기의 methylated target 영역을 포함한다: 0.5Mb, 3Mb, 50Mb (그림 4). 이 연구에서 사용된 가장 큰 패널은 off-target level이 7% 정도였고, 전체 패널의 off-target level은 10% 미만으로 확인하였다. 모든 target size에 대해 Capture uniformity(fold-80 base penalty)은 그 값이 1.4~1.7으로 우수하였다. 30X coverage 비율은 모든 패널에서 90%를 넘었다. 그러나, 패널 크기에 따른 duplication rate의 증가는 어떤 key metrics를 우선적으로 다뤄야 할지를 결정하는 데 있어서 중요한 고려사항이다.

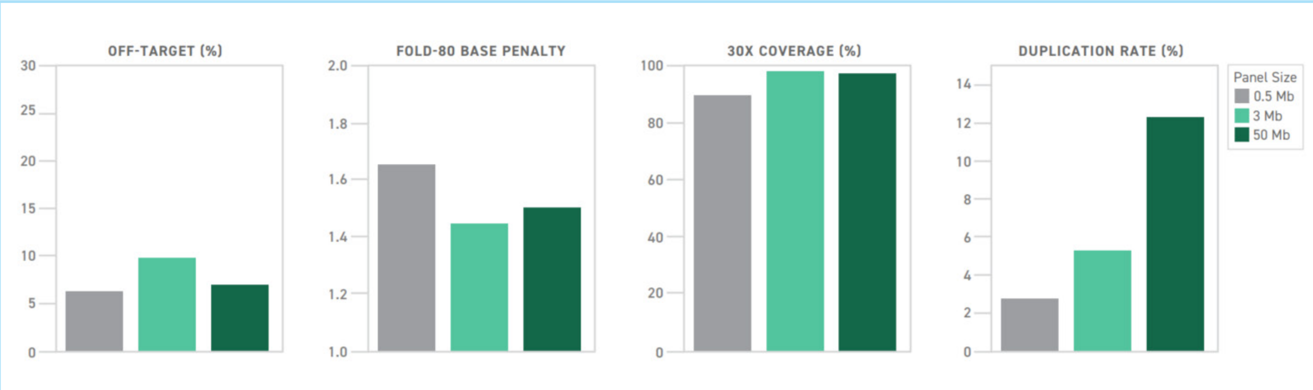


그림4. **Size of Target Region within Custom Panel and its relationship to Picard Metrics.** Twist Targeted Methylation Sequencing Protocol에 따라 및 single-plex reaction으로 실험을 진행하였다. 0.5Mb, 3Mb, 50Mb의 methylation panel에 대한 capture metrics.

Identification of differing Target Region Methylation Level

Methylation level genome에 따라 다양하다. Methylation level 차이를 이용하여 특정 암을 조기에 발견할 수 있기 때문에, methylation detection에 사용하는 프로토콜이 custom panel 디자인에 적합해야 하고, hyper-와 hypo-methylated region을 확인할 수 있어야 한다는 점은 필수사항이다. unmethylated region의 변환은 sequence complexity를 감소시키고 hybrid capture단계에서 downstream문제를 야기할 수 있다. 그러나, 이 문제는 라이브러리 제작 시약, hybrid capture 시약, custom panel 디자인을 적절하게 조화시킴으로써 줄일 수 있고, 이를 통해 디자인된 panel의 probe가 다양한 범위의 AT/GC rate와 methylation level을 가진 부위 전체를 고르게 분포(capture)할 수 있게 할 수 있다. Twist사의 targeted methylation custom panel은 target에 대해 4개의 probe가 디자인되어 있어서 conversion 이후, sense와 anti-sense DNA에 대한 methylated-, unmethylated 상태의 DNA를 모두 capture할 수 있다 (그림 1, 우측 참조).

Twist Targeted Methylation Sequencing Workflow을 통해, 균등한(evenness) coverage를 확인하였다. 이를 위해Enzyme와 bisulfite 처리 방식의 2가지 conversion system을 이용하여 genomic DNA를 conversion하였고, 1.5Mb custom panel로 hybrid capture 실험을 진행하였다. hyper-, hypo-methylation 영역에 대한 target coverage를 확인하였다.

그림 5는 EM-seq conversion 방법을 사용했을 때, target read counts가 hyper- 와 hypo-methylation region 모두에 대해 균등하게 분포되어 있음을 보여준다(녹색). 반면, 많이 사용되고 있는 bisulfite conversion방법(회색)의 결과에서는 target read counts가 상대적으로 균등하지 않았다. 따라서, Twist custom panel 디자인은 Twist Targeted Methylation Sequencing Workflow과 함께 사용했을 때, target methylation level에 관계없이 전체 target DNA들을 효과적으로 capture한다.

Twist Targeted Methylation Sequencing Workflow를 다양한 methylation level을 대상으로 한 결과를 확인하기 위해, 다양한 methylation level을 가진 라이브러리를 제작한 후 1Mb 패널을 이용하여 capture하였다. 이들 라이브러리는 hypo- and hypermethylated control human cell lines(EpiScope® Unmethylated HCT116 DKO gDNA PN# 3521 and EpiScope Methylated HCT116 gDNA PN# 3522, Takara Bio USA)을

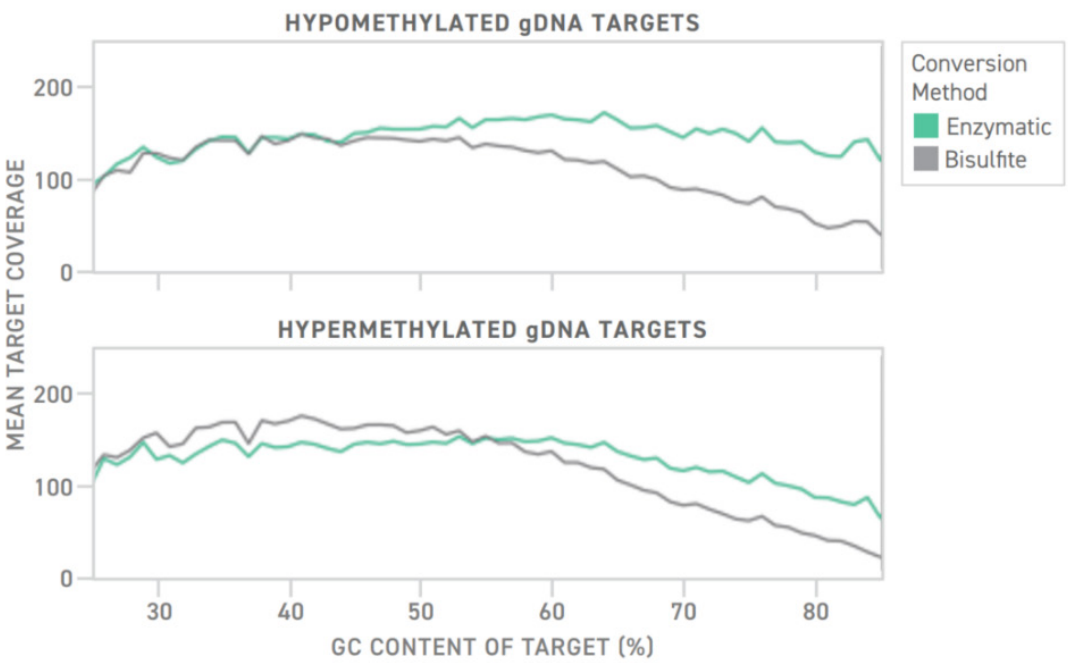


그림5. **Coverage by Target GC Content for Hypo- and Hypermethylated gDNA Libraries Prepared with Enzymatic and Bisulfite Conversion Techniques.** Twist사의 enzymatic 라이브러리 제작 방식을 사용하였을 때, hypo-, 와 hyper-methylated gDNA 모두 1.5Mb에 대한 target coverage 가 모든 GC rate에 걸쳐 더욱 고르게 분포되어 있다.

혼합하여 제작하였고, 이를 통해 0, 25, 50, 75, 100% methylation level을 포함하는 라이브러리를 만들었다. Key capture metrics를 나타낸 그림6은 methylation level과 최종 Picard metrics 사이에 관계가 거의 없음을 보여준다. 이 데이터는 Twist Methylation System이 hypo- and hypermethylated DNA regions에 모두 사용될 수 있으며, 정확한 결과를 확인할 수 있음을 보여준다.

그림6. Picard HsMetrics for gDNA Libraries with Variable Methylation Levels. EM-seq conversion 방법으로 0, 25, 50, 75, 100% methylation rate을 가진 hypo-/hypermethylated cell lines을 혼합하여 라이브러리를 제작하였고, Twist target enrichment library prep 방법에 따라 1MB custom panel을 사용해 capture 하였다. CpG methylation level이 서로 다르지만, 라이브러리 유형에 따라 key hybrid selection metrics는 일정하다.

Conclusion

Twist Bioscience사는 NEB사의 enzymatic conversion과 custom methylation panel 및 최적화된 target enrichment 시약을 포함하는, 모든 과정의 시약과 panel로 구성된 All-in-One kit를 제공하고 있다.

Twist Targeted Methylation Sequencing Workflow은 highly sensitive methylation detection이 가능하고, 이는 시간적 제약을 극복하기 위해서나 hands-on time을 줄이기 위해 필요에 따라 변형할 수 있다. 이 공정을 이용하면, custom panel 디자인의 target size와 methylation level이 최종 Picard metrics에 거의 영향을 미치지 않는다. 그러므로, 이 시스템은 methylation detection에 관심이 있는 다양한 연구자들이 도입해, 연구에 활용하기에 매우 적절하다.

Rererences

1. Vaisvila R, Pommaluri V K C, Sun Z, Langhorst B W, Saleh L, et al. (2019). EM-seq: Detection of DNA Methylation at Single Base Resolution from Picograms of DNA. BioRxiv. https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2019.12.20.884692v1.full.pdf (accessed 10th Feb 2021).

2. Tanaka K & Okamoto A (2007). Degradation of DNA by bisulfite treatment. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 17(7), pages 1912–1915.

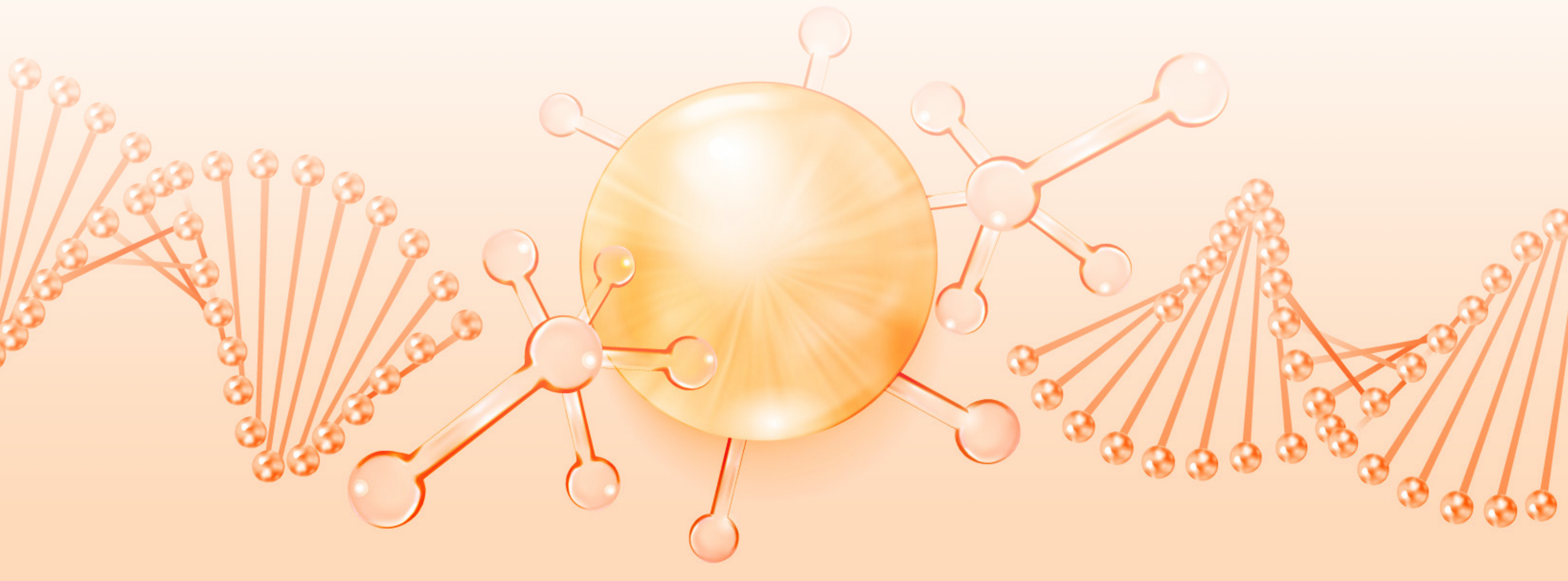
Exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability ACMG 근거 기반 임상 가이드라인

임지숙

서울성모병원

배경

선천적 기형(congenital anomaly, CA), 발달 지연(developmental delay, DD) 및 지적 장애(intellectual disability, ID)는 소아 인구에서 유전자 검사 의뢰가 가장많은 질환 중 하나로, 소아의 신체적, 학습 또는 행동 기능에 영향을 주는 이질적 질환군으로 이루어져 있습니다. Global burden of diseases injuries and risk factors study의 보고에 의하면, 1990년에서 2016년 사이에 유아 사망률은 50% 감소한 것에 비해, 같은 기간 동안 발달 장애의 유병률은 감소하지 않았습니다. 이 연구는 또한 195개 국가에서 5세 미만 어린이의 지적 장애, 간질, 자폐 스펙트럼 장애, 주의력 결핍 과잉 행동 장애, 청력 및 시력 장애의 6가지 발달 장애에 대한 유병률과 장애의 기간을 보고했습니다. 2016년에 지적 장애는 1,250만(신뢰 구간[CI] 1,020만-1,510만) 또는 어린이 10만 명당 1,983건(CI 1,611-2,397/100,000)으로 보고되었습니다. 유럽 선천성 기형 감시(EUROCAT)는 2003년부터 2007년까지 출생 1,000명당 23.9명의 주요 선천성 기형의 유병률을 기록했습니다.



CA/DD/ID에 대한 진단은 환자의 임상 관리(clinical management)의 변경으로 이어질 수 있고, 이는 사망률, 이환율, 진단 과정에서 환자 가족에게 지워지는 부담을 줄이는 데 영향을 미칠 수 있습니다. 현재 CA/DD/ID 환자의 분자 진단 검사는 상당히 다양합니다. 2010년에 ACMG는 CA 및 ID/DD 소아의 유전 진단을 위한 1차 검사로 염색체 마이크로어레이(chromosomal microarray; CMA)를 권장했습니다. 2차 검사를 위한 옵션은 지역/의료 시스템 관행, 보험 상태, 제공자/부모의 선호도를 비롯한 여러 요인에 따라 다릅니다.

2017년 ACMG(American College of Medical Genetics and Genomics)는 차세대 염기서열 분석의 임상 적용이 광범위하게 확대됨에 따라, 1세 미만에 발생한 선천성 기형 및 18세 미만에 시작된 지적 장애가 있는 소아 환자를 대상으로 시행된 엑솜(exome sequencing, ES) 및 게놈 시퀀싱(genome sequencing, GS)의 결과에 대한 체계적인 증거 기반 검토를 시작했습니다.

ACMG 체계적 근거 조사 결과

· 권고사항

1세 이전에 하나 이상의 CA가 있는 환자 및 18세 이전에 발병한 DD/ID가 있는 환자의 경우 ES 및 GS를 1차 또는 2차 검사(임상적 판단 및 CMA 또는 특정 검사 후 임상의와 환자/가족의 의사 결정에 따라)로 권장합니다.

· 정당성 및 결정에 대한 요약

ES/GS는 CA/DD/ID환자의 유전적 병인을 찾기 위한 잘 확립된 유전 진단 방법입니다. ES/GS검사는 확진 또는 진단이 가능하게 함으로써, 이에 따른 환자 관리의 변경 또는 추가 검사나 길고 긴 진단 여정을 끝내는 데 도움을 줍니다. 이것은 환자와 가족에게 더 나은 결과를 제공할 수 있습니다. 다양한 이해관계자(즉, 의료인, 환자, 가족, 검사실)들도 진단을 확립하기 위해 ES/GS를 사용하는 것에 한결같이 찬성합니다.

· 바람직한 효과

임상적 유용성에는 단기적 환자 관리 변경(약물, 절차 또는 치료에 대한 수정) 및 장기적 환자 관리의 변경(전문의에게 의뢰, 감시 또는 생활 방식 변경), 임신 및 출산에 대한 계획, 환자 가족 관리가 포함됩니다.

① 단기적 환자 관리

체계적 근거 조사 결과, 25개 연구에 대한 메타 분

석에서 진단이 되지 않은 환자를 포함한 ES/GS를 받은 모든 환자에 대해 단기적 환자 관리 변경의 비율이 8%(95% CI 6, 11)라고 보고했습니다. Ontario Health Technology Assessment (HTA)에 따르면, ES의 경우 5.9%, GS의 경우 10.4%의 비율을 보고했으며 전체 비율은 6.3%였습니다.

② 장기적 환자 관리

체계적 근거 조사 결과, 19개 연구에 대한 메타 분석에서 ES/GS를 받은 모든 환자에서 장기적 환자 관리 변경의 비율을10%(95% CI 7, 15)로 보고했습니다. Ontario HTA에 따르면, ES의 경우 17.2%, GS의 경우 20.8%로, 전체 비율은 17.5%였습니다.

③ 임신 및 출산 관련 결과

임신 및 출산 관련 결과는 임신, 임신 중절, 보조 생식 기술 사용, 착상 전 유전 진단 사용, 기증 정자/난자 사용 또는 융모막융모생검 또는 양수천자 같은 이전에 계획되지 않았던 추가 산전 검사를 받는 결정으로 정의되었습니다. 체계적 근거 조사 결과, 8건의 연구에 대한 메타 분석에서 임신 및 출산 관련 계획에 영향을 준 비율은9%(95% CI 4, 21)로 보고되었습니다.

④ 환자 가족 관리 결과

환자 가족 관리 결과는 계단식 유전자 검사(cascade genetic testing), 전문의에게 의뢰 또는 이전에 알려지지 않은 질환 진단과 이로 인한 임상 관리의 변화와 같이 환자의 가족 구성원에게 영향을 미치는 것으로 정의되었습니다. 체계적 근거 조사 결과, 19개 연구에 대한 메타 분석에서 4% (95% CI 2, 9)로 분석되었습니다.

· 진단 수율

진단 수율은 ACMG 체계적 근거 조사의 범위를 벗어났지만, Ontario HTA는 진단 수율에 대한 몇 가지 유형의 추정치를 제공했습니다. 가장 높은 품질의 증거는 ES/GS검사와 표준 유전자 검사(CMA, 후보 유전자 검사 또는 대규모 유전자 패널 검사 등)의 진단 수율의 직접적인 비교였습니다. 표준 유전자 검사의 진단 수율 21%와 비교하여 ES/GS의 경우 38%의 진단 수율을 보였습니다. 따라서 위험 비율(Risk ratio, RR)은 ES/GS에 유리하며(RR 1.76 [95% CI 1.20-2.58]) ES(34%)보다 GS(43%)에서 더 높은 수율을 나타냈습니다. 비진단적 결과라고 하더라도 예후와 관련이 있는 유전적 상태(예: seizure, 암 또는 시력 상실의 위험 증가) 또는 기타 임상 관리(예: 마취/수술에 대한 금기)를 감별 및 배제하는 데 유용할 수 있습니다.

· 증거의 확실성

진단은 환자 및 환자의 가족에게 직접적인 임상적 유용성이 있는 것이 분명하지만, 공식적으로 증거의 질은 매우 낮은 평가를 받았습니다. 왜냐하면, 무작위 대조 연구(randomized controlled trials)가 거의 없고, 관찰 연구 및 사례 연구에 대한 의존도가 높아 바이어스(bias)의 위험이 높았기 때문입니다. 진단 수율을 비교하는 근거의 질은 중간(moderate)이었습니다.

체계적 근거 조사 및 HTA가 출판된 이후로 임상적 유용성을 조사한 무작위 대조 시험이 한 건 있었습니다. 바로 2차 Newborn Sequencing in Genomic Medicine and Public Health(NSIGHT2)입니다. NSIGHT2 연구에서 임상의들은 rapid GS (rGS) 결과, 57명(28%)의 영아에서 환자 관리를 변경했다고 보고했습니다. 특히 ultrarapid GS (urGS)($p < 0.0001$) 및 양성 결과($p < 0.00001$)에서 효과는 더 두드러지게 나타났습니다. rGS에 의해 32명(15%) 유아의 임상적 결과(clinical outcome)가 변경되었습니다. 양성 결과는 음성 결과보다 더 자주 임상적 결과에 영향을 미쳤습니다($p < 0.00001$). 로지스틱 회귀 모델에서 rGS가 환자 관리 변경과 관련될 때 rGS가 유용한 것으로 인식될 가능성이 6.7배 증가했습니다(95% CI 1.8-43.3). 보고 결과가 양성이고(95% CI 4.7-22.4) 보고 시간이 더 짧을 때(오즈비 0.92, 95% CI 0.85-0.99)가 환자 관리 변경의 가능성이 10.1배 더 높았습니다. 임상의의 관점에서, rGS결과가 환자 가족에게 혼동이나 고통을 준다고 인지하는 경우는 거의 없었습니다(207명 중 6명[3%]).

· 가치 평가

인터뷰와 질적 및 양적 증거의 검토를 통해 얻은 환자 선호도와 가치평가는 ES/GS를 통한 CA/DD/ID 진단에 대해 동기부여와 더불어 이점을 보여줍니다. 환자와 가족은 또한 유전 상담을 통해 제공되는 지원과 정보를 매우 중요하게 생각합니다.

NSIGHT2 연구에 따르면 대다수의 부모는 중환자실(ICU)에서 진단이 안된 영아에게 1차의, 신속한, 진단적 GS가 유용하다고 느꼈습니다. 이 연구에서 대부분의 부모는 동의에 대한 충분한 정보를 얻었고, 자녀의 결과를 이해했으며, 염기서열분석을 받은 것에 대한 후회나 피해가 없다고 하였습니다.

Lewis et al. 10,000 게놈 프로젝트에 참여하는 희귀질환 아동의 부모를 인터뷰했습니다. 전반적으

로, 부모는 진단 목적으로 검사를 완료하는 것에 대해 긍정적이었습니다. Secondary finding 결과에 대한 우려나 오해가 더 많았습니다.

RaPS(Rapid Pediatric Sequencing) 연구에서 11명의 부모와 인터뷰한 결과 rGS에 대해 대체로 긍정적인 견해를 보였습니다. 그들은 신속한 진단을 얻을 수 있는 기회에서 오는 임상적, 정서적 이점을 언급했습니다. 참고로, 자녀의 질병에 대한 부모의 스트레스가 의사 결정을 복잡하게 만들었지, rGS를 제공하거나 결과를 기다릴 때 예기치 않게 우려가 높아지는 것은 아니었습니다.

· 비용 효율성

HTA 경제 모델은 전반적으로 표준 유전자 검사 후 ES가 추가비용에서 표준 유전자 검사 단독에 비해 진단 수율을 증가시키는 것으로 나타났습니다. 그러나 1차 또는 2차 테스트로서의 ES (예: CMA 또는 표적 테스트 후)를 시행하는 것이, 광범위한 표준 테스트(예: 대형 시퀀싱 패널 및/또는 다중 테스트 접근 방식) 후에 ES를 하거나 또는 표준 테스트만 했을 때보다 더 저렴한 비용으로 더 많은 진단 결과를 얻었습니다. 앞으로도 검사 비용의 감소가 예상됨에 따라, ES/GS의 조기 사용은 DD/ID 환자에 대해 보다 시기 적절한 진단을 가능하게 할 것입니다. 표준 유전자 검사와 비교하여 ES/GS는 진단 수율이 더 높고 진단 평가 초기에 시행할 때 비용 효율적일 수 있습니다.

· 형평성

2016년에 글로벌 질병 부담 연구(Global Burden of Disease Study)에 따르면 6종의 DD를 가진 5세 미만 소아의 총 수는 5,290만 명으로 저소득 및 중간 소득 국가에서 5020만 명(94.9%), 고소득 국가에서 270만 명(5.1%)으로 보고되었습니다. 건강 보험이 있고 사회경제적 배경이 더 높은 환자는 유전자 서비스에 접근하고 검사를 받을 가능성이 더 높습니다. 사회경제적 지위에 기반한 의료 접근성의 불평등을 고려할 때, 임상 경험에 의하면 만약 더 적은 수의 방문으로 진단을 내릴 수 있다면, ES/GS의 사용을 늘렸을 때 유전 질환이 있는 환자의 형평성이 증가할 것입니다.

· 기타 고려 사항

기존 지침/권고사항/입장 설명에 따라 특정 유전자 진단을 강력히 시사하는 임상 소견을 보이는 환자는 먼저 표적 검사(targeted testing)를 받아야 합니다. 여기에는 염색체 이상이 의심되는 환자, 알려진 질환 가족력 또는 Prader-Willi/Angelman 관련 메틸화 이상 또는 취약 X 증후군과 같이 염기서열 분석이 진단적이지 않을 수 있는 질환에 대한 의증 환자가 포함될 수 있습니다.

Rapid 및 ultrarapid (현재 각각 6-15일 및 1-3일로 정의됨) ES/GS의 사용은 조기 진단이 중요하고 즉각적인 변화를 만들 수 있는 상황이 있을 수 있으므로 발전하고 있는 영역이기도 합니다. 비용과 판독의 질은 위험/이득 분석에서 중요한 요소이지만

임상적 유용성이 충족되는 경우 신속한 테스트도 가능해야 합니다. 신속 검사는 급성 관리가 필요한 증상이 있는 환자에서 더 광범위하고 값비싼 진단 정밀 검사의 필요성을 없애고, 적합한 표적 치료가 가능하게 하거나, 환자가 부작용이 있을 수 있는 비효과적인 진단 또는 치료 중재를 받는 것을 막을 수 있습니다.

ID 또는 CA가 없는 자폐증(isolated autism)은 이 권장 사항의 범위를 벗어났지만 ES/GS 연구에 대한 평가가 진행 중입니다.

· 결론

결론적으로, 우리는 체계적 근거 조사를 기반으로 ES/GS를 CA/DD/ID 환자에 대한 1차 또는 2차검사로 고려할 것을 강력히 권장합니다.

*최근 발달지연 및 지적장애와 같은 질환에서 1차 검사로 ES/GS의 권장을 뒷받침하는 메타분석 및 체계적 문헌 고찰 자료들이 소개되고 있어, 아래 참고문헌에 추가하였습니다.

Reference

1. Manickam, K., McClain, M.R., Demmer, L.A. et al. Exome and genome sequencing for pediatric patients ith congenital anomalies or intellectual disability: an evidence-based clinical guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med 23, 2029–2037 (2021).
2. Malinowski, J. et al. Systematic evidence-based review: outcomes from exome and genome sequencing for pediatric patients with congenital anomalies or intellectual disability. Genet. Med. 22, 986–1004 (2020).
3. Srivastava S, et al. Meta-analysis and multidisciplinary consensus statement: exome sequencing is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with neurodevelopmental disorders. Genet. Med. 2019;21:2413–2421.

최신 보험정보

제 목	세부인정사항	고 시
나580 유전성 유전자 검사	제목 : 유전성 유전자 검사 항목별 유전자 종류 분류항목별 세부 검사항목 신설 가. 기본표적증폭 (05) HBA2 Gene 가. 기본표적증폭 (01) 알파지중해빈혈(HBA1, HBA2) 주. 유전자 다종검사	보건복지부 고시 제2021 - 266호 (2021년 11월 1일 부터 시행)
누591 핵산증폭	제목 : 세부 검사항목 신설 누591나(18) A군 연쇄상구균의 급여기준 누591나 핵산증폭-정성그룹2-(18) A군 연쇄상구균[실시간중합효소연쇄반응법]은 만3세~만14세 소아에서 '누584라 A군 연쇄상구균 신속동정검사' 결과 음성임에도 세균성 감염이 강하게 의심되며 다음을 모두 만족하는 경우 요양급여를 인정함. - 다 음 - 가. 체온 > 38°C 나. 기침을 동반하지 않는 인후통 다. 압통을 동반한 전방 경부 림프절 종대 라. 편도 비대 또는 삼출물	보건복지부 고시 제2021 - 291호 (2021년 12월 1일 부터 시행)

P 플래티넘 PLATIUM

한국로슈진단

- 대표제품 의료기기
- 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 있다.

진단검사사업부(Core Lab & Point of care Solutions), 분자진단사업부(Molecular Lab), 조직진단사업부(Pathology Lab), 임상 의사결정 지원 사업부(Clinical Decision Support), 당뇨관리사업부(Diabetes Care)의 5개 사업본부로 구성되어 있으며 로슈진단은 병원 및 검사실의 대용량 분석용 체외진단시스템, 생명과학분야의 연구용 분석기기 및 시약은 물론 병원의 현장 검사용 기기와 혈당측정기 등 환자자가 검사기기에 이르는 광범위한 제품 포트폴리오를 갖추고 있으며 국내는 물론 세계 체외진단(IVD)업계의 선두기업이다.

2019년 클라우드 기반의 임상결정 지원 데이터 플랫폼 네비파이 튜머보드(Navify Tumor Board)를 출시하며 디지털 헬스케어 영역에 본격 진출했다. 특히, 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 있다. 또한 한국로슈진단은 아프리카 어린이 돕기 자선 걷기대회, 사회공헌 협약을 통한 국내 저소득층 어린이 지원, 피학대 아동 지원, 소아당뇨환자 지원 등의 꾸준한 사회공헌 활동을 통해 기업의 사회적 책임을 다하기 위해 노력하고 있다. 에이온휴잇(Aon Hewitt)이 선정한 '한국 최고의 직장(Best Employer in Korea)' 본상을 2015년, 2016년, 2017년 3회 연속 수상했으며, 2019년, 2020년에는 Great Place To Work Institute 주관 '대한민국 일하기 좋은 100대기업'에 선정되었다. 보다 자세한 정보는 홈페이지 www.roche-diagnostics.co.kr에서 확인할 수 있다.

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
- 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: TAt Illumina, our goal is to apply innovative technologies to the analysis of genetic variation and function, making studies possible that were not even imaginable just a few years ago. It is mission critical for us to deliver innovative, flexible, and scalable solutions to meet the needs of our customers. As a global company that places high value on collaborative interactions, rapid delivery of solutions, and providing the highest level of quality, we strive to meet this challenge. Illumina innovative sequencing and array technologies are fueling groundbreaking advancements in life science research, translational and consumer genomics, and molecular diagnostics.

S 실버 SILVER

디엑솜

- 대표제품 체외진단의료기기(NGS)
- 회사소개 저희 디엑솜은 2017년 6월 설립이래 "Everything About Dx" 라는 기본가치를 바탕으로 NGS(Next Generation Sequencing) 분석을 기반으로 한 진단사업을 제공하여 삶의 질을 향상시키는데 기여하고자 합니다.
  우리회사는 혈액으로 암을 진단하는 액체생체검사(Liquid biopsy) 분야 ctDNA(cell-free tumor DNA) 를 이용한 암의 조기진단, 치료후 예후 진단, 항암치료제 효과를 분석하는 검사 방법을 주력으로 연구개발에 매진하고 있습니다.

트위스트바이오사이언스&엘앤씨바이오

- 대표제품 TwistBioscience사: NGS Panel, Genes, Oligo pools, variant libraries, Covid19 control, Twist Biopharma
- 회사소개 저희 ㈜엘앤씨바이오는TwistBioscience사 단독 대리점입니다. Twist사의 독보적인 DNA 합성기술을 바탕으로 한 NGS panel, Genes, Oilgo pools, Variant libraries 서비스 및 항체&단백질 합성 서비스인 Biopharma를 통해 국내 유수의 연구진에게 최신 기술정보와 제품을 제공하고 있습니다.

B 브론즈 BRONZE

녹십자지놈

- 대표제품 HRD/DES/DGS/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 / ONCOaccuPanel/ HLAaccuTest / NGeneAnalySys
- 회사소개 NGS 정밀진단 선도기업 엔젠바이오는 바이오 기술과 IT 기술 결합을 통한 정밀진단 플랫폼 구축으로 국내 외 정밀진단 기술을 선도하는 글로벌 정밀의료 혁신 기업입니다.
  엔젠바이오는 2017년 국내 최초 차세대 염기서열 분석(NGS) 기반 유전성 유방암 및 난소암 정밀진단 제품 상용화를 시작으로 혈액암, 고형암, 희귀유전질환, 조직적합항원 정밀진단 제품 등 다양한 종류의 제품 포트폴리오를 구축하고 있습니다. 또한 엔젠바이오는 임상검사실에서 방대한 유전체 데이터를 정확하고 손쉽게 분석할 수 있도록 생물정보학(BI)과 IT 기반의 기술이 집약된 분석 소프트웨어를 상용화해 제품과 함께 제공하고 있습니다. 특히 엔젠바이오의 NGS 패널 및 분석 소프트웨어는 정확한 설계, 정교한 검증 및 고도화된 기술 등을 통해 임상적 유효성을 확보하였으며, 최상의 정밀의료 서비스를 위해 진단제품과 검사 서비스 모두 엄격한 품질관리시스템을 통해 관리하고 있습니다.

현재 엔젠바이오는 기술 경쟁력을 기반으로 다양한 제품을 국내 다수의 대학종합병원에 공급하고 있으며 전 세계 20여개 대리점을 통해 활발히 수출 성과를 창출하고 있습니다. 또한 지속적인 핵심 기술 상용화 및 확장을 통해 진단영역의 다양한 분야 확대를 추진하고, 항암제 관련된 동반진단(CDx), 질병의 예후와 예측에 필요한 액체 생검, 결핵 및 바이러스 등과 관련된 감염병 진단 분야에서도 가시적인 성과를 창출하며 기술 및 사업 확장을 지속하고 있습니다.
엔젠바이오는 전 세계 고객을 대상으로 예측/예방/맞춤 의료를 실현할 수 있는 정밀진단 솔루션을 선도하는 혁신 기업을 추구하고 있습니다. 보다 자세한 내용은 www.ngenebio.com에서 확인하실 수 있습니다.

B 브론즈 BRONZE

아스트라제네카

- 대표제품 Lynparza, Tagrisso
- 회사소개 한국아스트라제네카는 혁신적인 과학과 차별화된 전문성을 통해 환자들에게 새로운 희망을 주고, 더 나은 일상을 실현하기 위해 최선의 노력을 기울이고 있습니다.
Biomarker 기반 정밀의학 항암제로 새로운 치료를 제공합니다.

한국MSD

- 대표제품 KEYTRUDA
- 회사소개 한국MSD는 글로벌 헬스케어 기업인 MSD(Merck Sharp & Dohme Corp)의 한국법인으로 1994년 설립된 이후 우수 의약품과 전문 의학정보를 제공 해왔습니다. 건강한 세계를 만들고자 노력하는 기업 비전을 실현하며 한국인의 질병치료와 건강증진을 위해 꾸준히 노력하고 있습니다.

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 Real-Time PCR
- 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.

Enrich EFFICIENCY

KAPA HyperCap Fixed Panels increase sequencing efficiency

Access relevant content faster and with greater sequencing efficiency. The KAPA HyperCap Fixed Panels are catalog gene panels for target enrichment research applications which are readily available from stock. Based on Roche's renowned content and probe design expertise, the KAPA HyperCap Fixed Panels offer high sequencing efficiency and answers that matter to your research questions.

KAPA HyperCap Heredity Panel

- Covers 3332 genes strongly associated with hereditary genetics and oncology
- Offers a compact capture target size of less than 10 Mb
- Achieves >98% of target coverage at 30x with 10M high quality (HQ) clusters

KAPA HyperCap Oncology Panel

- Covers 13 genes strongly associated with somatic oncology in a 214 Kb capture target
- Covers additional hotspot variants available in commercial FFPET and cfDNA controls
- Achieves >97.5% of target coverage at 1000x with 50M HQ clusters from 10 ng cfDNA

Benefits of KAPA HyperCap Fixed Panels

Relevant content from Roche's renowned content and design expertise to sequence what matters

Sequencing efficiency by extensive validation and optimized protocols that address challenging input quality

Fast delivery with quick shipping from stock through Roche's global distribution network

Learn more at
sequencing.roche.com

Ordering information for KAPA HyperCap Fixed Panels

Roche cat. no.	Description	Pack size
09462473001	KAPA HyperCap Heredity panel 12 rxn	12 reactions
09462481001	KAPA HyperCap Heredity panel 24 rxn	24 reactions
09462490001	KAPA HyperCap Heredity panel 48 rxn	48 reactions
09462503001	KAPA HyperCap Heredity panel 96 rxn	96 reactions
09462511001	KAPA HyperCap Heredity panel 192 rxn	192 reactions
09462384001	KAPA HyperCap Oncology panel 12 rxn	12 reactions
09462457001	KAPA HyperCap Oncology panel 24 rxn	24 reactions
09462465001	KAPA HyperCap Oncology panel 48 rxn	48 reactions

Published by:

Roche Diagnostics Korea Co., Ltd.
4F Seokyung Bldg. 22, Teheranro 108-gil, Gangnam-gu
Seoul 06174, Korea

www.roche-diagnostics.co.kr

14092021_000008

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

10 min

- 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**

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

ThermoFisher SCIENTIFIC

One sample. One application. A multitude of tools to uncover an answer.

Illumina offers multiple tools to support a sample-to-report WGS workflow.

Prepare library
Illumina DNA PCR-Free Prep
- Fast workflow takes ~90 min
- PCR-free chemistry minimizes coverage bias
- Broad DNA input range: 25-300 ng

Sequence
NovaSeq™ 6000 System
- Simplified workflow reduces hands-on time
- Scalable platform to meet demand
- Proven Illumina SBS* chemistry drives genome and exome analyses worldwide

Analyze, interpret, and report
TruSight™ Software Suite
- Comprehensive rare variant calling powered by the DRAGEN™ Bio-IT Platform
- Intuitive variant annotation and filtering with genome-wide visualization
- Simplified interpretation, curation, and report generation capabilities

*SBS = sequencing by synthesis
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):627–636. doi:10.1007/s00134-019-05552-x.

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

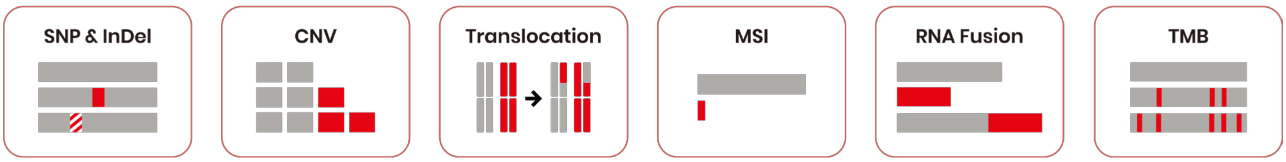
Core Genes	HER2, EGFR, ALK, KRAS, NRAS, BRAF, BRCA1, BRCA2, KIT, PDGFRA, IDH1, IDH2 MYC(C-myc), N-myc(MYCN) and more

- 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



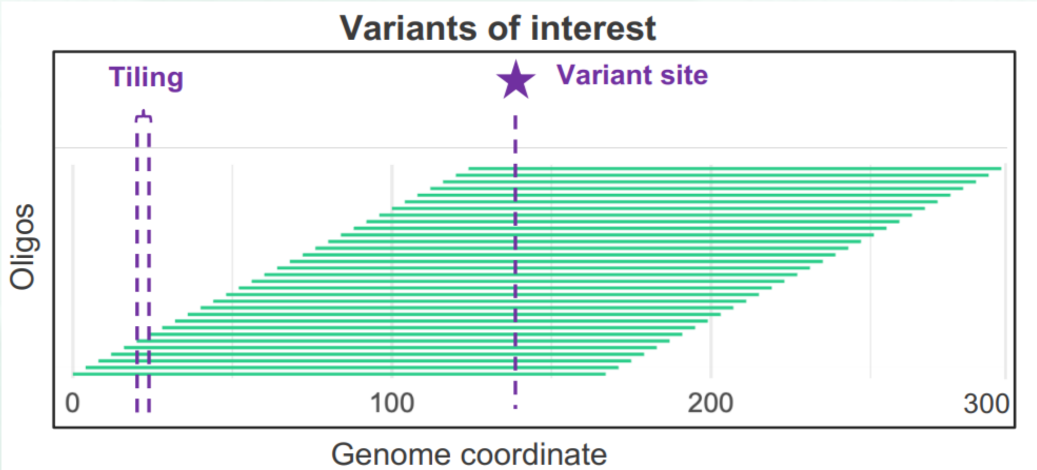
DxLiquid Pan100

DxLiquid TMB500

Twist Bioscience cfDNA Pan-cancer Reference Standard

Accurate VAF:

0% (WT)
0.10%
0.25%
0.5%
1.0%
2.0%
5.0%



- Synthetic Variants : 163 - 171 bp.
- Variants Tile :160 oligos per site).
- Variants: 228 SNVs, 215 indels, 15 SVs.
- Curated/ Clinical Variants: 147
- Background cfDNA: Donor-Derived.
- QC by NGS, ddPCR

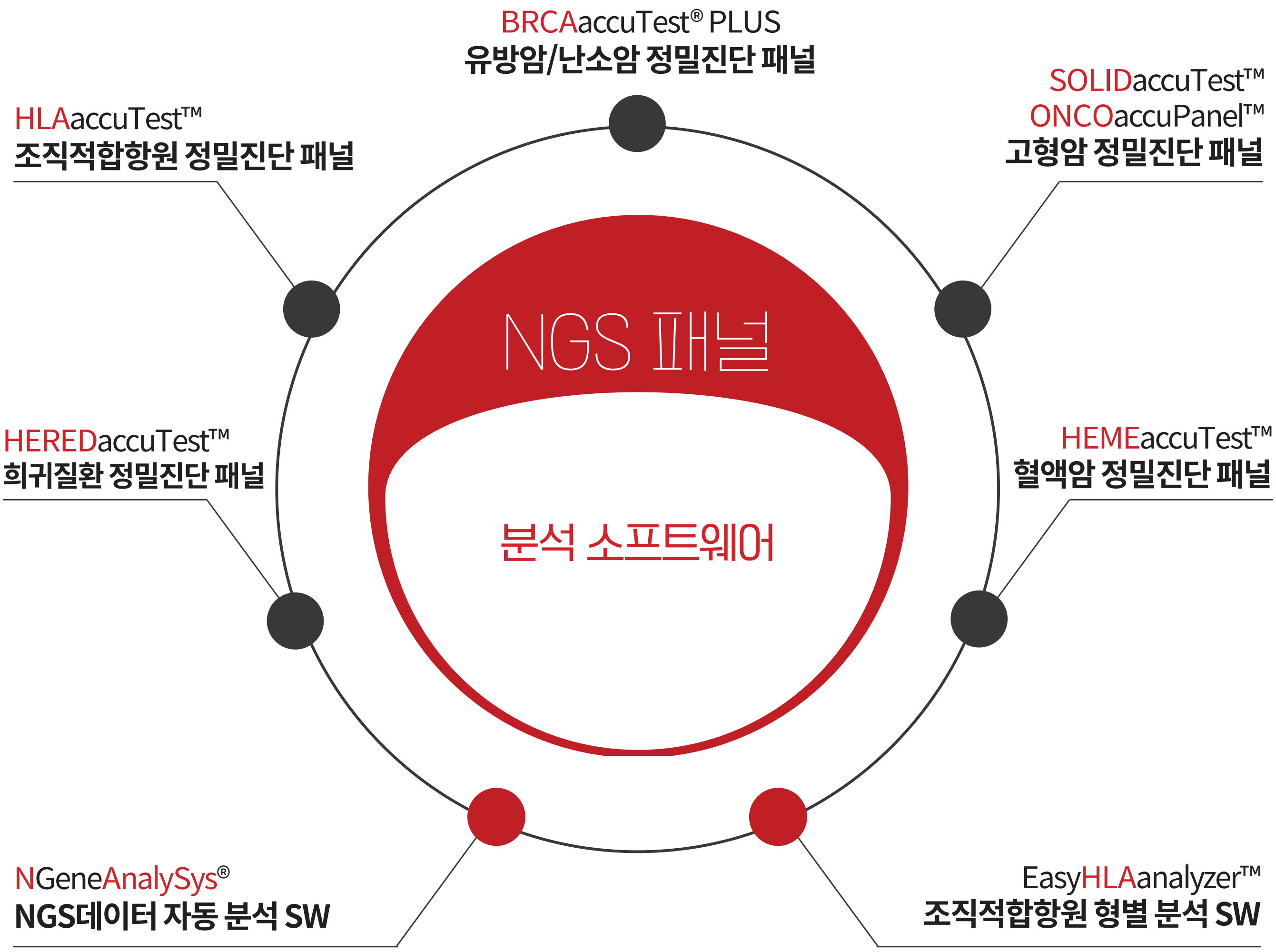
Comprehensive Detection of Cancer Variants

- 458 unique naturally occurring cancer variants
- 132 clinically relevant variants
- Covers 84 different genes involved in cancer

|주|엘앤씨바이오
문의 : ㈜엘앤씨바이오 www.lncbio.com
T. 02. 3472. 0370 / F. 02. 3472. 0376 / E. info@lncbio.com

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

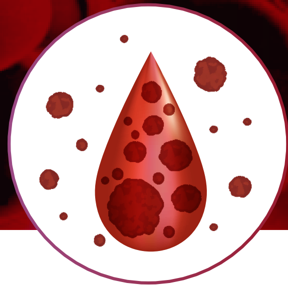
www.ngenebio.com

These products are for research use only

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

Ig/TCR 유전자 재배열 검사

IGH/IGK/TRB/TRG Gene rearrangement test (sequencing)



IGH/IGK/TRB/TRG 유전자 재배열 검사란?

▶ B-cell 혹은 T-cell 수용체 유전자의 재배열 상태를 검사하여 림프구의 클론성 증식 여부를 확인하고, 이를 **미세잔존질환 평가 및 림프구 증식 질환의 진단**에 활용하는 검사입니다.

검사 대상	림프구 증식성 질환 (의심)환자 및 다발성 골수종 (의심)환자

검사 목적

1 미세잔존질환(MRD, Minimal Residual Disease) 추적

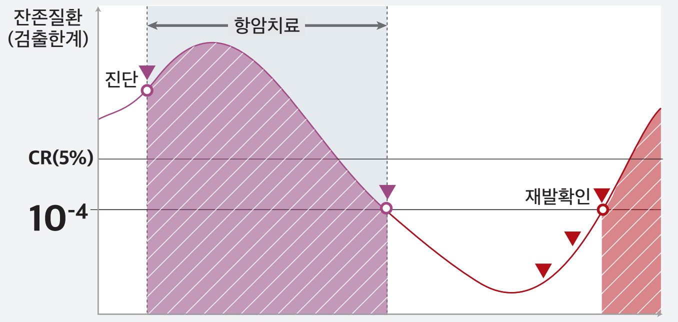
치료 중/후에도 여전히 남아있는 적은 양의 종양세포로서, 질환의 재발에 주된 원인으로 평가됩니다.
재발을 방지하기 위해 정확하고 민감한 MRD 평가가 중요합니다.

① 약제 반응 모니터링 ▼

약제 투약 후 잔존하는 암세포를 확인하여 약제 반응성을 모니터링 할 수 있습니다.

② 재발 추적 ▼

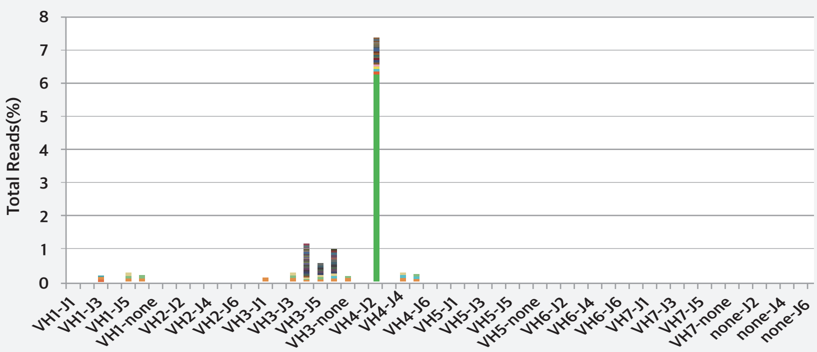
관해 이후 재발 여부를 추적/관찰할 수 있습니다.



[치료 과정에 따른 잔존질환]

2 림프구증식성 질환의 진단

Viral infection과 같은 양성 질환과 림프구 증식성 질환을 감별하여 암을 진단할 수 있습니다.

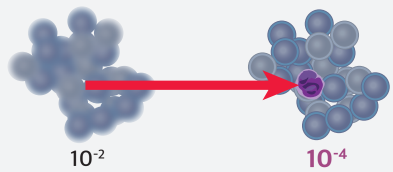


[Sequence Frequency Graph]

검사 방법

NGS (차세대 염기서열 분석, Next-generation sequencing)

1. **NGS 검사 방법**으로 기존 검사인 PCR 기반 검사보다 **높은 민감도**로 이전에 발견하지 못한 **적은 양의 암세포**까지 검출할 수 있습니다.
2. RT-PCR, FISH와 달리 **특정 마커가 없는 환자**도 검사할 수 있습니다.



GC녹십자지놈 GC녹십자랩셀 GC녹십자의료재단

16924 경기도 용인시 기흥구 이현로 30번길 107

고객센터. **Tel.** 031-280-9900 **Fax.** 031-260-9087 **상담톡.** https://gccs.channel.io www.gcgenome.com

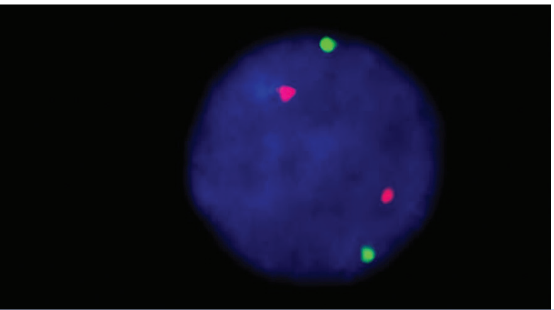
sysmex | Lighting the way with diagnostics

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

Real-Q Direct SARS-CoV-2 Detection Kit

체외 제허 21-50 호

Real-Q Direct SARS-CoV-2 Detection Kit 개요

- 실시간 역전사중합효소연쇄반응으로 SARS-CoV-2 바이러스를 검출하는 체외진단 의료기기. Real-Q 2019-nCoV Detection Kit (체외 제허 20-860호)에 이어 두번째 식약처 제조허가 승인제품임(2021. 01. 20).
- RdRP (RNA dependent RNA Polymerase) 유전자와 E (Envelope) 유전자를 타겟으로 함.
- 추출과정부터 검사 오류를 확인할 수 있도록 Human RNase P(HRP)를 endogenous internal control로 이용하여 검체로부터 바로 RNA 추출 후 검사가능.
- Carry over contamination을 방지하기 위하여 dUTP/UNG (Uracil-N-glycosylase) 시스템을 이용.
- RdRP 유전자는 FAM, E 유전자는 HEX(VIC), HRP는 Cy5 형광물질이 부착된 TaqMan probe를 사용하고 있어 1-tube에서 3개의 서로 다른 파장대에서 검출.

검체

- 상기도 및 하기도 검체
  (비인두 및 구인두 도말, 객담)

형광검출

FAM	HEX / VIC	Cy5
RdRP gene	E gene	Human RNase P

제품 구성

구 성 물	분량(100T)
8-Strips x 13	1T X 100
Positive control (파란 cap ●)	50 µl
Water, sterile, DNase/RNase free	1000 µl

◎ 8-Strips에 PCR reaction mixture, probe & primer mixture, enzyme mixture등 검사에 필요한 모든 component 들이 분주되어 있음.

◎ 추출한 RNA만 5ul 첨가 후 즉시 real time PCR 진행.

Real-Q Direct SARS-CoV-2 Detection Kit 사용방법

- Real-time PCR conditions (CFX96)

Step	Temperature	Time	Cycles	Acquisition mode
1	50 °C	10 min	X 1	
2	95 °C	3 min	X 1	
3	95 °C	1 sec	X 3	
	62 °C	20 sec		
4	95 °C	1 sec	X 40	none
	62 °C	5 sec		FAM, HEX(VIC), Cy5

Running time	
CFX96	50 min
ABI 7500 fast	60 min
ABI 7500	70 min

- BioSewoom Viewer program을 이용한 간편한 결과분석

BioSewoom Inc.
|주| 바이오세움

www.biosewoom.com
서울시 성동구 아차산로 144 2층 (성수동2가, 우영테크노센타) TEL. 02-498-2340 FAX. 02-498-1189

CE GMP

대한진단유전학회
Korean Society for Genetic Diagnostics

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