종설
Lab Med Online
Vol. 13, No. 3: 141-153, July 2023
https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.3.141

진단유전학 LMO

선천성 이상의 염색체마이크로어레이 검사 지침(I): 일반 및 산전검사 지침

Practical Guidelines for Chromosomal Microarray Analysis for Constitutional Abnormalities: Part I, General and Prenatal

설창안[1,2*] · 하정숙[3*] · 원동주[4*] · 김인숙[5]
Chang Ahn Seol, M.D.[1,2*], Jung-Sook Ha, M.D.[3*], Dong-Joo Won, M.D.[4*], In-Suk Kim, M.D.[5]

GC지놈[1], GC녹십자의료재단[2], 계명의대 동산병원 진단검사의학과[3], 연세의대 세브란스병원 진단검사의학과[4], 부산의대 양산부산대학교병원 진단검사의학과[5]
GC Genome[1], Yongin; GC Labs[2], Yongin; Department of Laboratory Medicine[3], Keimyung University School of Medicine, Daegu; Department of Laboratory Medicine[4], Yonsei University College of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine[5], Pusan National University Yangsan Hospital, Pusan National University School of Medicine, Yangsan, Korea

Chromosomal microarray (CMA) testing can enhance the quality of clinical care for congenital abnormalities, including prenatal diagnosis. Laboratories require a comprehensive understanding of the strengths, weaknesses, and purposes of CMA testing. They should also have appropriate plans, guidelines, and documented records for platform validation and quality control at all stages of testing. Performing prenatal CMA testing necessitates understanding the features of prenatal specimens, devising a verification process, reporting results, and providing genetic counseling. This guideline aims to establish standard test protocols for conducting CMA tests, ensuring accurate results, and aiding in diagnosing and treating patients.

Key Words: Congenital abnormalities, DNA copy number variations, Microarray analysis, Prenatal diagnosis

서 론

염색체 이상은 인간 유전 질환에서 중요한 이상으로, 염색체의 수적 및 구조 이상을 포함한다. 세포배양 후 분열중기세포의 G-banding 염색체를 분석하는 고식적인 염색체 검사는 현재도 표준 검사법으로 활용되고 있다. 고식적인 핵형분석법(G-banded karyotyping)의 550 밴드 수준의 해상도는 밴드 당 유전체의 크기가 5–6 Mb 정도로, 미세결실 및 중복 등을 확인하기 어려우며, 염색된 밴드 패턴을 육안으로 분석하는 주관적인 평가를 기반으로 하여 실험실 간 차이를 보이는 경향이 있었다. 다른 검사법으로 형광제자리교잡(fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 검사법이 도입되었고, 이는 해상도를 향상시켰지만 FISH 소식자(probe)가 표적으로 하는 영역 검출에만 국한되는 한계가 있었다. 그 후 염색체마이크로어레이(chromosomal microarray, CMA) 검사법이 도입되면서 전체 유전체(genome)에 대한 복제수변화(copy number change)를 보다 정확하고 포괄적으로 검사할 수 있게 되었고, 따라서 기존 핵형분석법에 비해 진단율을 높일 수 있게 되었다[1, 2].

우리나라에서는 2019년 8월부터 CMA 검사가 건강보험 선별급여가 적용되어[3], 발달장애, 정신지체, 자폐증, 다발성 선천성기형 질환 진단을 위한 검사 의뢰가 활발히 이루어지고 있을 뿐 아니라, 비급여검사가 가능한 산전 진단 CMA 역시 임상검사로서의 활용도가 높아지고 있다. 이에 점차 CMA 검사의 이해, 보고 및 결과 해석의 필요성이 대두되었다. 2010년 International Standard Cytogenetic Array (ISCA) 컨소시엄의 합의안[4]과 미국의학유전학회(American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)의 권고안

Corresponding author: In-Suk Kim, M.D., Ph.D.
https://orcid.org/0000-0002-7243-9173
Department of Laboratory Medicine, Pusan National University Yangsan Hospital, 20 Geumo-ro, Mulgeum-eup, Yangsan 50612, Korea
Tel: +82-55-360-2168, Fax: +82-55-360-1880, E-mail: iskim0710@gmail.com

*These authors contributed equally to this work.

Received: April 12, 2023
Revision received: May 4, 2023
Accepted: May 8, 2023

This article is available from https://www.labmedonline.org
© 2023, Laboratory Medicine Online
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

[5]을 필두로 하여 선천성 복제수변이(copy number variant)를 검출하기 위한 CMA의 실행 권고 및 지침[6, 7], CMA의 디자인 및 성능 예측 권고[8], 해석 및 보고 지침[9], 신빙도조사(proficiency testing)에 대한 지침[10]이 마련되었다. 2019년에는 ACMG와 Clinical Genome Recourse (ClinGen)는 검사실 간 복제수변이의 해석 및 보고의 일관성을 더욱 향상시키기 위해 2011년에 발표된 가이드라인[9]을 업데이트하여 출생 전후 선천성 복제수변이의 해석 및 보고에 대한 가이드라인을 2020년에 발표하였다[11]. 2021년에는 ACMG에서 발표한 선천성 및 종양성 질환의 진단을 위한 CMA의 통합적인 가이드라인을 개정 발표하였다[12]. 이러한 외국의 검사 지침 제작에도 국내에는 검사 도입이 늦은 관계로 적합한 지침이 수립되지 못하였는데, 최근 2021년 대한유전학회에서 "출생 후 염색체마이크로어레이 검사에 대한 임상진료지침"이 발간되어 임상진료에서의 CMA 적용에 관한 진료 지침을 제시하였다[13]. 그러나 검사의 수행, 관리, 해석 및 결과 보고 등 전반적인 검사과정에 초점을 맞춘 검사지침에 대한 요구는 여전히 남아 있는 상황으로 이에 임상 검사로 활용되고 있는 산전 진단을 포함한 선천성 이상의 CMA 검사지침을 제작하게 되었다.

본 임상검사지침의 개발은 기존의 ACMG 지침 및 권고안[5-12, 14], 캐나다의학유전학회(Canadian College of Medical Geneticists, CCMG) 권고안[15, 16]과 미국산부인과학회(American College of Obstetricians and Gynecologists, ACOG) 및 산모의학회(Society for Maternal-Fetal Medicine, SMFM)의 의견서[17], Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) [18] 등의 관련 지침 및 2021년 대한의학유전학회 권고안[13] 등을 참고하여 국내 실정에 맞게 수용 개작(adaptation)하는 방법을 사용하였다. 즉 해외 지침, 국내 지침, 관련 문헌 검토 후 지침안의 초안을 작성한 후, 지침안에 대한 내부 검토 및 수정, 지침안에 대한 진단유전학회 임상지침위원회 검토 및 수정 합의 순으로 진행되었다.

본 임상검사지침은 선천성 CMA 검사를 수행하는 검사실을 대상으로 작성하였고, part I과 part II로 구성되어 있다. 이번에 다루어질 part I의 일반 및 산전검사 지침에서는 검사법의 이해, 선택, 검증, 정도관리 등 기본적으로 따라야 할 부분과 산전 CMA 검사 수행에 있어 특별히 고려해야 할 부분 및 기본적인 용어정리(Supplement 1)를 포함하고 있다. 연이어 보고될 part II의 보고 및 해석 지침에서는 복제수변이의 변이해석 및 결과 해석, 결과지 작성에 대한 내용을 중점으로 구성할 예정이다. 이를 통하여 국내 CMA 검사의 표준 검사 지침을 마련하고, 검사의 오류를 줄이고, 보다 정확한 검사 및 해석을 제공함으로써 환자의 진단과 치료에 도움이 되고자 한다.

선천성 이상의 염색체마이크로어레이 일반검사지침

1. 염색체마이크로어레이 플랫폼의 종류

1) 어레이비교게놈교잡법(Array comparative genomic hybridization)

어레이비교게놈교잡법(Array comparative genomic hybridization, 어레이 CGH)은 레이블이 표지된 환자와 정상대조군의 DNA를 동량으로 직접 경쟁시켜 복제수변화를 검출하는 원리이다. 박테리아인공염색체(bacterial artificial chromosome, BAC)로 생산된 다양한 FISH 소식자를 슬라이드 위에 심어 환자와 대조군 검체를 같이 교잡시킨 BAC 어레이가 어레이 CGH의 시초가 되었다. 그러나, 양질의 BAC 소식자의 대량 생산이 쉽지 않고, 높은 비용과 낮은 노동 효율성 때문에 폭넓게 사용되지는 못하였다.

올리고뉴클레오티드(oligonucleotide)를 이용한 어레이 CGH법은 BAC 소식자 대신 50–75 bp 정도의 올리고뉴클레오티드 소식자를 이용한다. 해당 방법은 소식자 디자인이 용이하고 목적에 따라 소식자 배치를 쉽게 변경할 수 있어 수 kb 정도까지 높은 해상도로 복제수변화를 볼 수 있다. 대량 생산과 표준화가 비교적 쉽기 때문에 많은 상용화 키트가 현재 개발되어 있으며, 여기에는 Agilent사의 칩들이 대표적이다.

복제수변화를 나타내는 데이터는 소식자 강도의 $\log_2$ 비율(ratio)로 표시되며, 기대되는 정규화 값은 "0"(일반적으로 2 복제수를 의미함)이고, 상대적 복제수 증가는 큰 강도의 신호($\log_2 > 0$), 상대적 복제수 감소는 더 적은 강도($\log_2 < 0$)로 표시된다.

2) Single-nucleotide polymorphism 어레이

Single-nucleotide polymorphism (SNP) 어레이는 SNP 유전형을 분석하기 위해 고안된 어레이로, 해당 부위의 유전형 정보를 얻으면서 형광 강도 정보를 함께 분석해 복제수 정보를 유추한다. SNP 어레이는 대조 DNA와 직접 경쟁하는 방식이 아니라 레이블이 표지된 환자 DNA의 형광 강도를 인실리코(in silico) 표준물질 데이터와 비교하여 복제수를 결정하므로 대조 DNA가 필요 없는 장점이 있다. 또한 유전형 정보를 함께 분석하여 복제수뿐 아니라 이형접합소실(loss of heterozygosity)을 함께 검출할 수 있다는 것이 큰 장점이다. 대표적으로 Affymetrix사, Illumina사의 칩들이 이에 속한다.

복제수변화 데이터는 어레이 CGH와 마찬가지로 소식자 강도의 $\log_2$ 비율로 표시되며, 해당 부위 SNP 유전형의 동형접합, 이형접합 여부가 임의의 유전형 기호(AA, BB, AB)로 표시된다.

https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.3.141

2. 염색체마이크로어레이 해상도와 플랫폼의 선택

CMA 임상 검사를 시행할 경우 CMA 검사의 원리 및 다양한 플랫폼의 장, 단점을 이해한 후, 검사의 목적에 적합한 디자인과 해상도를 가진 CMA 플랫폼을 선택해야 하는데, CMA 해상도는 소식자의 크기, 분포, 밀도에 따라 달라질 수 있다. 2010년 ISCA 컨소시엄의 합의안 및 ACMG의 권고에서는 지적장애 또는 선천성 기형이 있는 환자의 진단 목적에서는 최소한 400 kb 이상의 복제수변이를 검출할 수 있는 CMA를 사용해야 하고, 소식자가 유전체 전체에 걸쳐 일정하게 분포하고 표적 부위에 대한 소식자 밀도가 충분하도록 디자인된 플랫폼을 사용할 것을 권고하였다[4, 8]. 2019년 개정된 유럽 권고안에서는 지적장애/발달지연, 선천성 기형 환자의 진단 목적의 CMA 해상도는 최소한 200-400 kb로 권고하고 있으며, 소식자의 크기를 고려하여 BAC 어레이 플랫폼보다는 올리고뉴클레오티드 어레이나 SNP 어레이를 추천하였다[19]. 현재 국내 보건복지부 CMA 급여고시 기준에서는 검사장비 및 DNA chip 해상도를 400 kb 이상으로 지정하고 있다. 플랫폼 선택 시 해상도가 높은 게 항상 좋지는 않은데, 해상도가 높을수록 불확실한 임상적 중요성을 갖는 복제수변이(variants of unknown significance, VUS)의 검출률이 높아지기 때문에 결과 해석을 어렵게 할 수 있다.

검사실은 시행하고 있는 CMA 플랫폼의 소식자의 개수와 평균적 분포 간격에 의한 이론적 해상도에 대해 명확히 문서화하여 이용자에게 공개해야 한다.

3 염색체마이크로어레이 장점

CMA 검사는 충분한 품질과 양의 DNA 추출이 가능하다면 모든 검체 사용이 가능하므로 배양이 힘든 검체나 보관된 검체도 가능한 장점이 있고, 고식적인 핵형분석에서 검출되지 않는 미세중복 및 미세결실 등 불균형재배열 검출이 가능하며, 고식적인 핵형분석으로 검출된 이상의 특성(절단점, 불균형이상염색체의 기원, 포함된 유전자)을 더 자세히 정의 가능하다. 핵형분석의 주관적인 육안 검사보다 객관적인 데이터를 분석하여 이상을 찾아내고, 관심 영역에 소식자를 집중시켜 검출률을 높일 수 있으며, 데이터를 게놈 브라우저 및 데이터베이스와 인터페이스가 가능하다는 장점이 있다. SNP 소식자 기반 어레이의 경우, 선천성 및 후천성 이형접합소실을 추가로 검출 가능한 장점이 있다.

4. 염색체마이크로어레이 제한 사항

CMA는 장점뿐 아니라 다음과 같은 단점도 가지고 있다. 먼저, 균형 염색체 재배열, 역위(inversion)와 같이 복제수변화가 없는 이상, 낮은 수준(<20%)의 섞임증(mosaicism), 불균형 재배열이 발생하게 된 기전(예, tandem duplication vs. 삽입(insertion) vs. 마커염색체) 확인이 불가하여 고식적인 핵형분석 또는 FISH 검사와 상호보완적 적용이 필요하다. 네배수체(tetraploidy)와 같은 다배수(polyploidy) 이상을 확인하기 어려우나, SNP 어레이의 경우, 다배수성이 검출 가능할 수 있다. 또한, 어레이 칩에 포함되지 않은 유전체 영역이나 플랫폼 검출 수준 이하의 복제수변화의 경우, 검출의 어려움이 있다.

5. 선천성 염색체마이크로어레이 검사의 목적

염색체 이상에는 수적 이상(염색체이수성, 저두배수성, 과두배수성, 다배수 등)과 구조 이상(결실, 중복, 삼중, 증폭, 전좌, 역위, 삽입, 마커 염색체 등)이 포함되며, 양적으로 균형(balanced) 이상과 불균형(unbalanced) 이상으로 나눌 수 있다. CMA는 고식적인 핵형분석 및 FISH 등 기존 방법들에서 놓칠 수 있는 미세결실, 미세중복, 끝분절밑(subtelomeric) 이상 등의 양적 불균형 이상의 검출을 위해 설계된 검사법이다. 또한, SNP 어레이의 경우는 이형접합소실 영역을 검출하여, 단친이염색체성(uniparental disomy, UPD) 질환 진단에 적용될 수 있다.

6. 선천성 염색체마이크로어레이 검사 적응증

1) 출생 후 선천성 이상 검출

- 정신지체(mental retardation/intellectual disability), 발달장애(developmental disorders), 자폐(autism) 및 다발성 선천성 기형(multiple congenital malformations) 환자에서 유전이상을 검출하기 위한 목적으로 권유된다. 주기형*(major malformation) 1개 이상을 포함한 2개 이상의 기형이 있을 경우 다발성 선천성 기형으로 간주하나, 주기형이 확인되지 않을 경우 소기형*(minor malformation)이 3개 이상 있는 경우에도 다발성 선천성 기형으로 간주할 수 있다.

*주기형: 기형으로 인한 수술적 치료가 필요하다고 판단되는 수준의 기형 상태

*소기형: 기형은 있으나 수술적 치료를 하지 않더라도 일상생활에 지장을 초래하지 않는 수준의 기형 상태

- 위 적응증 항목들은 CMA 검사의 급여기준고시 제2019-166호(행위) [3]와 발달 지연, 지적 장애, 자폐증 및/또는 다발성 선천적 기형 환자의 1차 검사로 이용하자고 제시한 ISCA 컨소시움 합의안[4]과 ACMG 지침[5]을 근거로 하였다.
- 다발성 선천성 기형의 범주에 만족하지 않은 단독심장기형을 가진 경우, 신경발달장애의 위험도를 확인하는 데 도움이 된다[20].

2) 가족 검사 및 염색체 이상의 발생기전 분석

- VUS의 해석을 위해서 가족 검사[11]가 필요하다. 임상적 중요성을 갖는 복제수변이가 발견된 경우라도, *de novo*인지 가족

성(familial)인지 확인하기 위해 가족 검사가 필요하다[5, 9, 11, 21-24].

- 고식적인 염색체 검사에서 마커염색체를 포함하여 불균형 염색체 이상이 관찰되어, 불균형된 부분(기원, 크기, 포함된 유전자)을 규명하기 위한 목적으로도 CMA 검사가 필요하다[5, 9, 11]. 뿐 아니라, 고식적인 염색체 검사에서 균형재배열이 확인되고 신체적 및 인지적 장애가 있는 경우 절단점에 미세결실이나 중복의 가능성을 확인하기 위해 CMA가 필요하다. 염색체 검사에서 균형이상이 확인된 신체 및 인지 장애가 있는 환자에게 CMA를 실시한 경우, 약 20%에서 염색체 불균형이 확인되었다[25].

3) 산전 진단

산전 초음파 검사로 한 개 이상의 주요 태아 구조 이상이 관찰되어 침습적 태아 진단을 받는 환자의 1차 검사[17]로 CMA가 유용하고, 자궁 내 태아 사망 또는 사산의 평가를 위한 세포유전학적 분석이 필요할 때[17], 핵형분석으로 검출이 안되나 CMA로 검출이 되는 유전적 이상들을 산전에 검출하고자 할 때, 또는 비침습적 산전검사(noninvasive prenatal test, NIPT)에서 보고되는 작은 복제수변화에 대한 후속 검사[14]로 CMA가 유용하다. 자세한 내용은 아래 산전 염색체마이크로어레이 검사 지침을 참조한다.

7. 염색체마이크로어레이 성능평가

1) 정의

- 검정(verification). 객관적인 증거 제공을 통해 지정된 요구 사항이 충족되었음을 확인하는 과정으로, 환자 검사에 사용되기 전에 검사의 성능을 확인하기 위해 한차례 실시한다. 검정은 장비, 소프트웨어 및 관련 데이터가 제조업체의 설명 및 사양에 따라 정확한지 확인하기 위한 품질 보증(quality assurance) 과정이다. 체외진단용 의료기기 인허가를 받은 제품으로 검사를 시작할 때는 검정과정이 필요하다(Table 1).
- 검증(validation). 객관적인 증거 제공을 통해 특정 의도된 사용 또는 응용에 대한 요건이 충족되었음을 확인하는 과정이다. 즉, 테스트 검체로부터 생성된 데이터가 검증 완료된 방법과 비교했을 때 정확하고 재현 가능한 올바른 결과를 제공하는 지를 평가하는 과정이다. 검사실에서 자체적으로 개발한 검사나 승인된 검사법을 수정해서 사용할 경우 검증과정이 필요하다(Table 1).
- 새로운 플랫폼. 새 플랫폼이란 타제조사의 어레이 플랫폼 혹은 같은 제조사라도 새로운 검사방법이 적용되었거나 새로운 유형의 어레이 검사를 말한다. 각각의 플랫폼은 독립적으로 검증 혹은 검정되어야 한다.
- 새 버전(new version). 새 버전이란 어레이 성능 향상을 위해 최소한의 변화를 준 상태로, 전체 소식자 coverage의 10% 이내 변경이면서 제거된 소식자가 5% 이내인 경우를 말하며, 검증과정을 간소화할 수 있다. 기존 플랫폼에 대한 이러한 유형의 변경은 드문 경우이며 대부분의 플랫폼 변경에는 완전한 검증(full validation)이 필요하다.

2) 체외진단용 의료기기 인허가를 받은 신규 CMA 플랫폼의 검정

승인을 받은 플랫폼을 사용하고, 제조사가 권장하는 방법대로 검사하는 경우는 검정을 통해 성능을 평가한다. 검정은 정확도(accuracy), 정밀도(precision) 및 보고가능범위(reportable range of results)를 평가한다. 검정 시작 시 검정 기준 통과/실패 기준(pass/fail criteria)을 확립하여 검정을 시행 완료하여야 하며, 그 결과를 기록에 보관해야 한다.

- 정확도. 정확도 평가는 이미 알고 있는 비정상 CNV를 가진 검

Table 1. Indication and performance evaluation for verification and validation

	Verification	Validation
Indication	- Korean Food and Drug Administration (KFDA)-cleared/approved tests, the approved protocol and intended use	- Laboratory development testing - Modified use of KFDA-approved medical equipment for *in vitro* diagnosis - Additional sample types on an established platform
Performance evaluation	- Accuracy testing (15 abnormal samples that represent abnormalities that the array is designed to detect) - Precision testing (establishment by running a minimum of two abnormal samples, ech run multiple times in separate experiments) - Reportable ranges	- Accuracy testing (30 previously characterized abnormal samples that the array is designed to detect)* - Precision testing (establishment by running a minimum of two abnormal samples, each run multiple times in separate experiments) - Reportable ranges - Sensitivity - Specificity - The allelic differentiation potential of SNP detecting platform - Determining percentage of cells with abnormality: mosaicism and clonality

*Accuracy tests in cases where it is difficult to obtain 30 abnormal samples such as amniotic fluid and chorionic villous samples can be a good method of sample exchanges in a blind, split-sample comparison with a laboratory. Exchange of validated data sets (e.g., array files) between laboratories is recommended for additional experience in data analysis.

https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.3.141

체를 검사하여 예상 결과가 검출되는지 확인하는 과정을 말한다. 검정 과정에서는 최소 15건의 검체가 권장된다. 비정상 CNV가 예상되는 영역과 나머지 유전체 영역 결과를 모두 비교하여 예상 결과와 예상하지 못한 결과를 문서화해야 한다. 예상하지 못한 소견의 발견 시 다중결찰의존소식자증폭(multiplex ligation dependent probe amplification, MLPA), 정량적 중합효소연쇄 반응(quantitative PCR, qPCR), FISH 또는 다른 CMA 플랫폼과 같은 대체 검사법으로 규명할 수 있다.

- 정밀도. 동일한 결과에 대한 반복 테스트의 재현성을 측정한다. 플랫폼의 정밀도는 각각 별도의 실험에서 최소 두 개의 비정상적인 검체를 최소 2회 반복 실험함으로 측정될 수 있고, 반복 검사의 일치성을 문서화해야 한다. 두 측정 간에 차이가 발생했을 때는 보고가능범위, 기능적 해상도 및 절단점 주변의 잠재적 변동성뿐 아니라, 해당 차이가 발생한 잠재적 원인을 고려해서 해석하고 기술하여야 한다. 분절 중복(segmental duplication) 및 개별 소식자의 성능 등으로 인해 절단점 주변의 일부 변동성은 발생할 수 있으며, 임상적 의의가 변경되지 않는 절단점 변동성은 크게 염려할 필요가 없다.
- 보고가능범위. 제조사의 권고에 따른 보고가능범위(복제수변화 식별 기준과 보고 기준)에 따라 복제수 이상을 검출해낼 수 있는지 평가한다.

3) 체외진단용 의료기기 미허가 신규 CMA 플랫폼의 검증

i. 신규 CMA 테스트의 검증

체외진단용 의료기기 미허가된 제품의 신규검사, 승인된 검사를 수정해서 사용하는 경우, 혹은 검체 유형을 변경해서 사용하는 경우 완전한 검증이 필요하다. 새로운 CMA 테스트의 검증에는 CMA 플랫폼 및 소프트웨어의 성능뿐 아니라, 기술적 데이터 분석 및 해석까지 포함되어야 한다.

검증 수행은 정확도, 정밀도, 보고가능범위, 분석민감도(sensitivity) 및 분석특이도(specificity)가 포함된다. 검증을 시작할 때 검증 프로토콜에 대한 통과/실패 기준을 설정해야 한다. 규정된 허용기준을 충족하지 못하고, 반복하거나 재평가해도 문제가 해결되지 않는 경우 해당 검사가 임상검사에 적합한지 여부를 고려해야 한다.

- 정확도. 잘 알려진 비정상 검체 최소 30례 이상에 대해 검사가 권고되고, 가능하다면 상염색체 및 성염색체 이상을 포함하여 이 플랫폼이 검출할 수 있다고 설계된 이상을 포함하도록 한다. 또한 다양한 크기의 이상, 중복과 결실의 조합, 다양한 유전체 영역 및 보고 가능한 기술적 한계의 복제수 중복 및 결실을 포함하도록 한다. 처음 분석은 예상되는 이상에 대한 정보가 없는 맹검상태로 모든 데이터 분석 방식으로 진행하고, 이후 비정상 복제수변이가 예상되는 영역과 나머지 유전체 영역 결과를 비교하는 방식이 권유된다 분석 후 불일치 결과 및 한계를 포함하여 여러 검체 유형에 대한 모든 검증 데이터를 문서화해야 한다.

타 검사실과 맹검 및 분할 검체 교환을 통한 검체 비교는 검증을 위한 좋은 검체 제공 방법이 될 수 있고, 데이터 분석에 대한 추가 경험을 위해 검사실 간의 검증된 데이터 파일 교환이 권장된다. 기존의 염색체 검사, FISH 또는 다른 검증된 CMA 검사로 얻은 결과와 비교하여 검증할 수도 있다. 예상된 결과와 예상하지 못한 결과가 모두 평가되어야 하기 때문에 30개 검체의 신중한 선택이 중요하며 예상하지 못한 소견을 발견했을 때 인과관계를 확인하기 위해, MLPA, qPCR, FISH 또는 다른 CMA 플랫폼과 같은 대체 기술의 사용이 포함될 수 있다.

- 정밀도. 플랫폼의 정밀도는 각각 별도의 실험에서 최소 두 개의 비정상적인 검체를 최소 2회 이상 반복함으로써 평가한다. 반복 실행의 일치성을 문서화해야 하며, 두 측정 간에 차이가 발생했을 때는 보고 가능 범위, 기능적 해상도 및 절단점 주변의 잠재적 변동성뿐 아니라, 해당 차이가 발생한 잠재적 원인을 고려해서 해석하고 기술하여야 한다.
- 보고가능범위. 복제수변화를 식별하는 기준과 이를 보고하는 기준이 포함된다. 검사실은 제조사의 권고를 고려하여 복제수변이라고 정의하기에 적합한 플랫폼의 매개변수(연속소식자의 수, $\log_2$ ratio, SNP 대립유전자 비율, QC metrics 등)를 규명해야 한다. 기능적 해상도는 소식자 밀도와 복제수변이를 식별하는 데 필요한 소식자 수의 조합이므로 보고가능범위는 플랫폼의 기능적 해상도보다 커야 한다. 보고가능범위는 검증 평가 전에 결정되어야 하고, 검사실이 보고가능범위를 변경한 경우 검증데이터는 새로운 보고가능범위로 재평가해야 한다. 일반적인 임상진단 목적의 CMA는 400 kb 이상의 복제수변이를 검출할 수 있는 해상도를 지녀야 하며, 표적부위에서는 20–50 kb의 복제수변이를 검출하고, backbone 부위에서는 100–250 kb의 복제수변이를 검출할 수 있어야 한다[4, 8].
- 분석민감도와 분석특이도. 검증과정에서 진양성, 진음성, 위양성, 위음성 결과의 수로 결정한다. 그러나, 전장유전체분석에서는 모든 진양성과 진음성을 알아내지 못하므로 대표적인 변이에 대해서만 평가함으로써 동일한 조건의 나머지 영역에 대한 성능을 추정한다. 민감도는 예상되는 결과에 대한 검출된 결과 비율로 평가하고, 특이도는 검출된 결과에서 양성 결과 비율인 양성예측률로 평가한다. 특이도를 향상시키기 위해 만약 특정 소식자가 반복적으로 검출하는 위양성이 있다면, 검출되더라도 향후 보고에서 이를 제외해야 한다.

ii. 이전에 확립된 플랫폼의 새 버전 검증

새 버전이란 어레이 성능향상을 위해 최소한의 변화를 준 상태로, 전체 소식자 coverage의 10% 이내 변경이면서 제거된 소식자가 5% 이내인 경우를 말하며, 최소 5개의 비정상적인 검체로 검증되어야 하고, 이전 버전에서 알려진 비정상 검체가 비교를 위해 포함되도록 한다. 될 수 있으면, 업그레이드 버전의 새로운 콘텐츠 영역에 포함된 복제수변화가 있는 비정상적인 검체를 포함하도록 한다.

iii. 확립된 플랫폼에서 변경된 검체 유형 검증

검사실에서 사용하는 CMA 플랫폼은 여러 검체 유형을 분석할 수 있는데, 초기 검증은 예상되는 용도에 가장 일반적인 검체로 시행한다. 예를 들어, 목적 용도가 선천성 이상일 경우, 검체 유형은 말초 혈액에서 추출한 DNA를 사용하고, 의도된 용도가 산전 진찰인 경우, 양수 또는 융모막에서 추출된 DNA를 사용한다. 만일 검체 종류가 추가되는 경우 검체 유형마다 각각 따로 성능평가가 이루어져야 하고, DNA 추출 검증을 포함하여, 데이터 품질에 대한 평가로 어레이 QC metrix가 설정된 허용 범위 내에 있는지 확인해야한다.

iv. SNP 검출 플랫폼의 대립유전자 분화 가능성 검증(Validation of the allelic differentiation potential of SNP-detecting platforms)

출생 후 선천성 CMA에서 동형접합구역의 검출은 그 자체로 진단적이지 않지만 단친이염색체와 같은 추가 검사가 필요할 수 있는 문제를 식별하는데 도움을 줄 수 있으므로, SNP 소식자의 성능 평가가 검증에 포함되어야 한다. 검증 시 최소 5개의 검체는 복제수변화 외에 예상되는 동형접합구역 또는 복제수변화 없는 이형접합소실구역(CN-LOH)이 포함되도록 하고, 평가 시 검출 여부 및 크기와 절단점, 그리고 유전체에서의 비율 등이 기록되어야 한다. 해당 검체들은 검사실 간 비교가 권장된다.

v. 섞임증(Mosaicism)

검사실은 섞임증에 대한 광범위한 검증 평가를 수행하여 다양한 복제수변화 상황에서 섞임증 범위와 검출 한계를 검증할 필요가 있다. 섞임증 검출한계를 결정하는 방법에는 동일한 개체(가능한 경우)의 정상 세포와 비정상 세포의 혼합물에 대한 희석 시리즈 연구, 알려진 비정상 세포 비율을 가진 검체를 타 검사실에서 얻어 수행하는 방법 및 다른 정량적 방법 결과와 비교하는 방법이 있다. 미배양 신선 검체의 FISH 검사와 CMA 검사와의 섞임증 결과 비교는 신뢰할 수 있는 검사법이다. 전통적인 염색체핵형분석 역시 섞임증에 대한 정보를 제공하지만 섞임증 수준을 정확하게 반영하지는 못할 수 있다.

CMA 분석 도구는 주로 섞임증이 없는 검체를 위해 설계되었으며, 따라서 섞임증은 표준 소프트웨어 알고리즘에 의해 안정적으로 감지되지 않을 수 있다. 검사실은 소프트웨어 한계와 섞임증 이상 검출을 위한 데이터의 수동 및 육안 검사 필요성을 인식해야 하고, 소프트웨어/육안으로 검출된 섞임증은 다른 방법(예: FISH, qPCR, 반복 CMA 검사)에 의해 검증되어야 한다. 섞임증의 세포 분율(%)은 소프트웨어 지표(Log_2 ratio, B-유전형 빈도, 유전형 차이 등)로 유추될 수 있고, 검사실은 섞임증 검출에서 이러한 지표들의 특성을 잘 이해하고 있어야한다.

vi. 배수성의 결정

배수성은 CMA로 감지할 수 있지만 이해하고 해석하기 어려울 수 있는데, SNP 소식자의 대립유전자 상태(Log_2 ratio, B-유전형 빈도, 유전형 차이)는 배수성 수준을 결정하는 데 도움이 될 수 있다. 검증과정에는 다양한 배수성의 분석 및 파악을 하기 위해 다양한 수준의 배수성을 가진 검체가 포함되어야 한다. FISH 및 핵형분석 결과와의 상관관계는 배수체 수준과 이배체 기준선을 재조정할 잠재적 필요성을 결정하는 데 도움이 될 수 있다.

vii. 키메라증(Chimerism)

키메라증은 유전자형의 혼합물로 선천성 이상 검체(예: 산전검체의 모체세포 오염) 또는 암 검체(예: 골수 이식 후 공여자와 수혜자 세포 혼합)에서 발생할 수 있으며 임상 검체가 부주의하게 혼합된 경우에도 검출될 수 있다. 키메라증에서 생성되는 특정 패턴을 인식하는 것이 중요한데, 두 검체가 함께 혼합되면 SNP 대립유전자 트랙이 점점 더 복잡해진다. STR 검사는 혼합된 세포의 개별 기여도를 추정하는 데 도움이 될 수 있다. 키메라증이 있으면 낮은 수준의 비정상세포를 감지하는 능력과 데이터 해석에 영향을 받게 되므로, 보고서에는 키메라증으로 인한 분석의 제한점을 기술해야한다.

8. 표준 DNA (reference DNA)

어레이 CGH는 검체 DNA와 표준 DNA를 직접적으로 경쟁하여 비교하는 방식이므로 적절한 표준 DNA를 선택하는 것이 매우 중요하다. 사용하는 플랫폼에 따라 표준 DNA 종류가 다르고 사용방식이 다를 수 있다. 단일개인 또는 다수(pooling)로부터 유래된 DNA일 수 있고, 환자 검체와 성별이 일치 혹은 불일치할 수 있으며, 검사실 자체 제작 혹은 제조사에서 제작된 DNA일 수 있다. 그러므로, 검사실은 사용하는 플랫폼의 표준 DNA에 대한 특성을 파악하고 있어야 하며, 새로운 reference DNA로 변경시에는 기존의 것과 비교하여 검증을 하고, 그 결과를 기록하고 보관해야 한다. 표준 DNA의 Lot 번호 변경이 있는 경우, 구 Lot 와 새 Lot의 표준 DNA 검사 QC metrix가 허용범위 내에 들어가는지 확인하여

https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.3.141

정확성과 재현성을 검정하여야 한다. SNP 어레이는 이미 구축된 표준 DNA 파일 혹은 in silico 표준 DNA library를 검체 결과와 비교하는 방식으로 표준 DNA 파일을 사용하는 근거와 정책을 문서화하여야 한다.

9. 소프트웨어(Software)

1) 소프트웨어 검증

소프트웨어는 CMA 결과의 시각화 및 해석의 중요한 부분으로, 검사법 초기 셋팅 과정에서 최적상태로 결정된 소프트웨어 조건과 지표(소식자 크기나 갯수의 임계값, $\log_2$ ratio 임계값, 수학적 알고리즘)들은 검증과정 중에도 일정하게 사용되어야 한다. 이런 지표들은 검체 종류에 따라 다를 수 있다. 소프트웨어 검증시 다양한 종류의 복제수변화, CN-LOH, ROH 검출 및 여러 수준의 섞임증 조건에서 이상들을 검출하는 능력을 검증하고 문서화해야 한다. 또한, 가능하다면, 현재 어레이 해상도 하에서 주어진 셋팅 조건에 따라 CN-LOH와 ROH의 끝점(endpoint)을 정확하게 정의하는 능력을 결정해야 한다. 검사장비, 소프트웨어, 분석규칙에 변화가 있을 때마다 그 검출한계가 검증되어야 하는데, 검출한계를 정의하는데 도움이 되는 복제수변화를 가진 검체로 소프트웨어를 검증해야 한다.

소프트웨어 셋팅이 변경된 경우에는 검증에 쓰였던 데이터 일부로 재분석을 시행하여 분석능에 변화를 초래하는지 확인하여야 한다(셋팅변경의 예시: 새 주석 파일, in silico 표준 DNA 세트 변화, 이상 검출 알고리즘 변경 등).

같은 제조사 제품으로 업그레이드된 새 버전 소프트웨어는 각각 다른 유형의 이상을 대표하는 최소 5개의 검체로 검증해야 하고, 이전 버전에서 검출된 알고 있는 이상이 반드시 포함되어야 한다. 만약 새 버전에서 새로운 다른 이상이 검출된다면 변이의 생물학적 의미를 결정해야만 한다. 새 버전에서 추가된 새 기능은 평가되어야 하는데, 새 기능을 검사할 수 있는 이상이 있는 검체로 실시한다.

2) 소프트웨어 한계의 이해

소프트웨어의 한계로 데이터의 육안 검토(visual inspection)와 manual call이 필요한 경우가 있는데, 보합력이 낮은(poor performing) 소식자로 인해 나누어진 call의 병합(combine calls), 정상 복제수 구역이 포함된 call의 분리(separate calls), 정확하게 정의되지 않은 절단점의 재고(revise breakpoints)와 같은 경우 유용할 수 있으며, 소프트웨어에서는 검출이 안된 낮은 수준의 섞임증 이상을 육안으로 판단하여 call로 추가할 수 있다. CMA 분석 소프트웨어는 기본적으로 이배체 상태를 가정하여 분석하므로(normalization algorithm) 배수체 이상 검출을 어렵게 할 수 있다. 이 때 SNP 대립유전자 상태를 검토함으로써 배수체 이상 검출에 도움이 될 수 있다.

10. 질관리

1) 검체 종류

일반적으로 CMA는 세포 배양이 필요 없어, 보관된 조직이나 배양할 수 없는 세포 및 조직도 검사 가능하므로, 말초 혈액, 제대혈, 피부 섬유아세포, 고정세포 등 신체의 모든 유핵 세포 중에서 임상검사 목적에 부합하는 검체를 적절하게 선택한다. 산후 진단은 혈액, 타액 또는 구강상피세포, 산전 진단은 양수 또는 융모, 혈액암은 혈액 또는 골수, 고형 종양은 포르마린 고정 후 파라핀 포매된 조직 또는 신선한 조직을 주로 선택한다. 말초혈액은 추후 FISH나 염색체 확인검사를 위해 두 개의 검체를 채집할 수도 있다[2].

2) 검체 식별

각 CMA마다 검체 식별번호, subarray 위치, 검체 성별, 표준 DNA 성별 정보가 추적 가능하고, 검사과정 전반에 걸쳐 각 단계마다 검체식별이 가능하도록 시스템을 갖추어야 한다. 서류와 검체 간의 불일치가 있을 경우 검사 시작 전 이유를 찾아 해결해야 한다.

3) 검체 조건

검사실은 각각의 검체 채취에 대한 요구사항(검체 최소 요구량, 검체상태, 검체 용기 등)을 정립하고, 필요한 DNA 최소량과 DNA 품질의 하한 기준을 확립해야 한다. 기준을 충족시키지 못하는 검체는 거부하는 기준을 가지고 검체 재채취를 요구할 수 있으며, 산전검체와 같이 재채취가 가능하지 않은 경우엔 DNA 재추출, 정제 방법을 써볼 수 있고, 이 과정에 대해 보고서에 자세히 기술하여 임상의와 환자가 검사과정에 한계가 있었음을 알 수 있도록 해야 한다.

4) DNA 추출, 측정, 절단, 증폭(DNA extraction, measurement, fragmentation, amplification)

CMA 검사는 환자 검체에서 고품질의 핵산을 추출해 내는 것이 중요하다. 체외진단의료기기 인허가 제품의 시약 키트를 사용하는 경우에는 제조사의 지침대로 핵산을 추출해야 한다. 조제 시약을 사용하거나 자체 개발한 방법을 사용하는 경우에는 추출한 핵산의 양과 순도를 검증할 수 있는 방법이 마련되어 있어야 하고, 이에 따라 검증한 기록이 있어야 한다. DNA 추출, DNA 정량, DNA 증폭, 적절한 절단(fragmentation)과 형광 라벨링이 체계적으로 이루어져야 한다. 최적의 DNA 처리 과정을 위해 각 과정마다 문서화된 프로토콜과 질관리프로그램이 마련되어야 한다.

보다 나은 결과를 위해 검체량을 늘리거나 전장유전체증폭과 같은 방법을 쓰게 되는 경우 이 방법들에 대한 전문지식이 있어야

하고 결과지에 가능한 오류를 기술하여야 한다.

5) 장비 교정, 유지보수, 품질관리 및 질관리지표

검사장비 및 플랫폼은 사용 시 보정, 정기유지관리, 모니터링되어야 한다. 검사 매 단계마다 질지표가 설정되고 질지표별로 표준 컷오프 값과 허용 범위가 설정되어야 한다. 검사 결과를 보고하기 전에 질관리지표(quality control metrix) 값이 허용범위에 드는 것을 확인해야 하고, 허용범위에서 벗어난 경우에 대한 적절한 추적 절차에 대한 정책이 세워져 있고 문서화해야 한다(Table 2).

6) 주석(Annotation) 및 데이터베이스

데이터 분석의 가장 중요한 부분의 하나는 공개 혹은 비공개 주석 프로그램과 데이터베이스에 대한 접근성과 사용여부이다. 주석 프로그램은 정기적으로 업데이트 해야 하고, 제조사는 이러한 주석 프로그램의 업데이트 방법을 제공해야 한다. 모든 보고가능한 call에 포함된 유전체 구성과 정보는 UCSC와 같은 독립적인 데이터베이스 소스로 확인가능해야 하고, 분석과정 동안 사용된 데이터베이스 소스에 대한 문서화가 추천된다.

7) 새 Lot 번호 마이크로어레이/시약의 검정

새 Lot 번호의 마이크로어레이와 시약은 이전 Lot 번호의 어레이/시약에 비교하여 동일한 분석능을 가지고 있음을 검정하여야 한다. 새 번호의 슬라이드는 이전 Lot 번호의 슬라이드로 검사한 비정상 환자검체로 검사하여 동일 분석능을 검정하여야 하고, 새 번호의 시약은 새 번호와 구 번호 시약으로 시행한 두 run 사이에 질지표가 정해진 기준에 충족 여부에 따라 검정한다.

8) 특정 복제수변이 확인

적절한 기술적 수행, 분석적 검증 후 시행된 검사에서는 검출된 복제수변이를 추가로 더 확인할 필요는 없다. 이를 위해 검사실은 보고가능한 이상을 결정하는 적절한 기준(소식자 수, 게놈 크기, 그 외 QC metrix)을 확립하고 있어야 한다. 복제수변이를 검토할 때 고려해야 할 것은, 데이터 간의 적절한 $\log_2$ ratio 차이, call 내부나 인접 call 간에서 연속소식자의 균일성(uniformity), 절단점에서 복제수변이 전환의 명확성(sharpness), SNP 대립유전자 데이터와의 일치, least processed $\log_2$ ratio 데이터(weighted vs not weighted), call specific quality score 등이다. 기준에 부합하지 않는 변이라도 차후 분석을 위해 표식 가능하고, 환자의 임상양상과 연관성을 보거나, 필요하다면 독립적인 다른 방법으로 확인할 수 있다.

11. 질보증(Quality assurance)

1) 검사실 시설, 인력, 장비 기준

염색체마이크로어레이 검사를 시행하기 위해서는 최소한 급여기준고시(제2019-166호(행위))에 따른 검사실 시설, 인력, 장비의 기

Table 2. Quality control metrics (A CytoScan™ Dx example)

	Quality control metrix	Method	Acceptable limit
Wet bench process	DNA yield after extraction	Fluorometer, sphectrophotometer	≥ 50 ng/μL or total ≥ 250 ng
	DNA yield after PCR	Fluorometer, sphectrophotometer	≥ 3 μg/μL
	DNA purity	Optical density ratio, A260/A280	1.7-2.1
	DNA size after PCR	Gel electrophoresis (2%)	150-2,000 bp
	DNA size after fragmentation	Gel electrophoresis (4%)	25-125 bp
Bioinformatic process	Median absolute pairwise difference (MAPD)	Software	≤ 0.25
	SNP QC	Software	≥ 12
	Waviness SD	Software	≤ 0.12

Table 3. Facility, personnel, and equipment criteria according to the Reimbursement Standard Notice

Facility: Healthcare institutions that meet all of the following conditions:
a) Genetic testing institutions reported in accordance with Article 49 of the "Act on Bioethics and Safety"
b) Institutions that have received "Genetic Testing Accuracy Evaluation" three times or more in accordance with Article 48 of the "Enforcement Rules of the Act on Bioethics and Safety"
c) Institutions that meet all the conditions of (1)-(3) in the "Genetic Testing Accuracy Evaluation" of b) as of the date of healthcare coverage implementation:
(1) A-grade operation of the testing laboratory
(2) Results of on-site inspection in evaluation categories 1 and 3 are A-grade
(3) Scores of evaluation categories 1 and 3 in external proficiency testing are both average 90 points or higher
Personnel: Requires at least one full-time laboratory medicine or pathology specialists with more than five years of experience after obtaining specialist qualification, and at least one full-time clinical laboratory technicians.
Equipment: The resolution of testing equipment and Biochips (DNA Chips) should be 400 kb or higher.

https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.3.141

준을 만족하여야 한다[3]. 해당 급여 고시 내용은 Table 3과 같다.

2) 정도관리프로그램

i. 외부정도관리: 각 검사실에서 실시하는 검사를 검체 종류마다 적절한 외부기관(한국유전자검사평가원, 진단검사의학재단 등)에서 실시하는 외부정도관리 프로그램에 참여해야 한다. 추가로 외부 다른 기관과 실시하는 교환 맹검검사(정상, 비정상 DNA 포함)를 실시하는 프로그램을 마련할 수도 있다.

ii. 내부정도관리: 내부 검사실 질보증프로그램과 질향상(quality improvement) 프로그램의 일환으로 정상, 비정상 검체에 대해 실시하는 내부정도관리 프로그램을 마련해야 한다. 다른 CMA 검사장비 간의 결과를 비교하는 평행비교검사나 고식적인 염색체 검사, FISH 검사결과와 비교하는 것도 내부정도관리로 적절하다.

iii. 검사실 인증: 검사실은 한국유전자검사평가원 인증과 진단검사의학재단 우수검사실 인증이 있어야 한다. 내부, 외부 정도관리프로그램에 참여하고 수행한 기록은 문서화하고 인증심사원에게 제시할 수 있어야한다. 내, 외부 정도관리 수행과정에서 원하는 결과를 얻지 못한 경우는 모두 문서로 기록하고, 부적합(unacceptable) 사유에 대한 조사와 해결과정이 있어야 하며, 필요한 경우 적절한 교정이 이루어져야 한다.

3) 결과보고시간(Turnaround time, TAT)

검사실 정책으로 검사 우선순위와 TAT가 정해져 있어야 한다. TAT는 환자 진료 결정에 도움이 되게 적절한 수준이어야 하고, 의뢰된 검사의 90%가 검체 수집 후 21일 내에 최종 결과보고서가 완성되는 것이 권유된다[12].

4) 문제발생의 문서화

검체 수집에서 최종결과보고서의 완성까지 검사의 모든 과정에서 생길 수 있는 문제점들을 추적하는 방법이 마련되어야 한다. 질지표 데이터는 검사 전과정을 한눈에 감독할 수 있는 정보를 제공해줄 수 있다. 검체나 프로세스의 변화 과정을 지속적으로 모니터링하면 어떤 패턴이나 트렌드를 인지하고 즉각적으로 해결할 수 있게 한다.

12. 문서 및 데이터 보관

검사실은 검사 수행 후 검체와 검사 수행 관련 파일 및 데이터를 어떤 형식으로 얼마 동안 보관할 것인지 검사실 정책에 명시하여야 한다. 한국유전자검사평가원[26]과 진단검사의학재단[27]에서는 의뢰된 검체 또는 배양검체는 최종 보고일까지 보관하고, 이미지 스캔 원본은 최종 보고 후 최소 2주일, 일차 검사결과를 재생산할 수 있고 개선된 분석 파이프라인을 적용하여 재분석할 수 있는 데이터 파일은 2년간 보관하도록 권고한다.

산전 염색체마이크로어레이 검사지침

1. 산전 염색체마이크로어레이 검사의 필요성 및 임상적 유용성

현재 국내에는 산전 진단(prenatal diagnosis)을 위해 CMA 보험급여는 가능하지 않으나, 선천성 질환 관련 복제수변이 검출에 CMA의 임상적 유용성이 잘 알려지고, 기존의 핵형분석 검사의 한계를 보완할 수 있어 점차 검사의뢰가 증가하고 있다.

CMA 검사는 NIPT로 시행되는 핵형분석, FISH 등 타 산전검사에 비해서 객관적이고 정확한 정보를 많이 얻을 수 있어서(Table 4), 산전 핵형분석에서 정상 핵형이면서 초음파에서 이상이 관찰되는 경우의 6%, 초음파도 정상인 경우의 1–2%에서 추가로 CMA에서 임상적으로 의미 있는 결실, 중복 등을 검출할 수 있는 것으로 보고되고 있다[28].

그러나, 산전 진단이라는 특수성을 감안할 때 산전 CMA 검사는 출생 후 검사에 비해 고려해야 할 사항들이 있는데, 예를 들어 산전검체에 대한 검증(validation), 모체세포 오염(maternal cell contamination, MCC), VUS 보고 시 주의할 점, 이차적 소견 등을 고려한 포괄적 유전상담의 필요성 등이다.

Table 4. Abnormality detection by methodology in prenatal diagnosis

	NIPT	Karyotyping	FISH	CMA
Aneuploidy	+	+	+	+
Balanced rearrangement	-	+	+	-
CNV > 10 Mb	Not available	+	+	+
CNV < 5-10 Mb	Not available	+/-	+	+
Mosaicism	Not available	> 20%	> 5%	> 20%
Marker (unidentifiable) chromosomes	Not available	+	+	+
Target region	limited	Whole genome	limited	Whole genome

Abbreviations: CMA, chromosomal microarray; CNV, copy number variant; FISH, fluorescence in situ hybridization; NIPT, noninvasive prenatal test.

2. 산전 염색체마이크로어레이 검사의 적응증

1) 산전 초음파에서 한 개 이상의 주요 구조적 이상(심장기형, 뇌기형, 구순 구개열 등)이 태아에서 관찰되어 침습적 산전검사 대상인 경우 CMA 검사가 권장된다[17]. 만일, 산전 초음파에서 구조적 이상이 관찰되지 않은 상태에서 침습적 산전검사를 시행하는 경우는 태아 핵형분석 또는 산전 CMA 중 하나가 권장된다.
2) 태아의 자궁 내 사망 또는 사산의 경우 확인 검사로 CMA 검사가 권장된다[17]. CMA 검사는 검체의 세포배양이 필요 없어 핵형분석보다 결과 도출 가능성이 높고 잠재적 복제수변이 검출까지 가능하기 때문이다.
3) 핵형분석으로 검출이 안되나 CMA로 검출이 되는 유전적 이상들을 산전에 검출하고자 할 때 시행할 수 있다[17]. 이러한 유전적 이상들은 산모의 나이 증가와 연관성이 없으므로 연령에 상관없이 산전검사를 받는 모든 여성에서 CMA 검사가 고려될 수 있다.
4) NIPT에서 이상소견이나 핵형분석에서 정상 핵형이 나오는 경우, 또는 NIPT에서 작은 복제수변이 의심 소견이 나온 경우 확인 검사로 산전 CMA가 권장된다[14] (Table 5).

3. 산전 염색체마이크로어레이 플랫폼의 선택

산전 CMA는 현재 국내에서는 연구용(research use only, RUO) 플랫폼으로 사용 가능하며 대표적으로 ThermoFisher Scientific 사의 CytoScan HD Suite (2011년), CytoScan 750K Suite (2012년), CytoScan Optima Suite (2015년) 등이 있다. 캐나다산부인과학회(Society of Obstetricians and Gynaecologists of Canada, SOGC)와 캐나다의학유전학회 공동 가이드라인에서는 산전 CMA의 해상도는 출생 후 CMA 플랫폼과 비슷하여야 함을 제시하고 있지만[16] 산전 CMA의 경우 해상도가 높을수록 VUS 결과가 많아질 가능성이 있으며 검사가격도 상승하기 때문에 플랫폼 선정에 있어 해상도와 가격을 고려해야 한다.

4. 산전검체에 대한 검증과 예비배양(back-up culture)

산전검체의 검증은 CMA 플랫폼이 출생 후 선천성 복제수변이 검출에 사용되었다고 하더라도, 검사를 시행할 모든 종류의 산전검체 유형에 따라 각각의 검증이 필요하다(part II 참고). 산전검체로 배양된 양수, 배양되지 않은 양수 및 융모막 검체 등이 이용될 수 있다. 산전 CMA를 검사실에 새로 도입하려면, 최소 30개의 비정상 복제수변이가 확인된 산전검체에 대한 정확성 검증이 필요하나, 비정상 산전검체를 얻기가 어려울 수 있기 때문에 이전에 정상으로 분류된 검체가 포함될 수도 있다.

CMA 검사 시행 시 배양되지 않은 양수 또는 융모막 검체에서 추출한 DNA의 분석은 배양된 양수 또는 배양된 융모막 검체의 DNA보다 우선적으로 권장된다. 배양하지 않은 양수 및 융모막 검체의 CMA 분석은 대부분의 경우 1주일 이내에 결과를 확인할 수 있고 culture artifact의 가능성을 피할 수 있기 때문이다[29, 30]. 그러나, 배양하지 않은 검체는 모체세포 오염이 발생할 수 있어 융모막 검체의 경우 DNA 추출 전에 산모의 탈락막을 수기로 제거해야 한다. Confined placental mosaicism (CPM)은 배양하지 않은 융모막 검체를 검사할 때 검사결과에 영향을 줄 가능성이 있으나, 실제로 CMA 분석에서는 0.07%의 낮은 빈도의 CPM만이 보고되었다[31].

CMA 분석을 받는 모든 산전검체에 대한 예비배양을 확립하고 유지할 필요가 있다. 이는 (1) CMA 검사의 실패의 가능성, (2) 섞임증의 정도 평가, (3) 복제수변이와 연관된 구조적 이상을 추가적으로 핵형분석 또는 FISH를 이용해 확인할 수도 있기 때문이다.

5. 질관리 지표(QC metrics) 확인

출생 후 CMA 검사와 마찬가지로 DNA 추출 과정과 연관된 질관리 지표 및 검사 전반적 과정 질관리 지표의 검토가 검증 계획에 포함되어야 하며 생물정보학적 분석 과정과 연관된 질관리 지표도 검토되어야 한다(Table 2). 특히 융모막 검체 등 검체의 전처리 과정에 따른 질관리 지표의 변화가 없는지 검토가 필요하다.

일반적으로 질관리 지표가 제조사의 기준을 통과 못하면 재검을 고려할 수 있지만 산전 CMA의 경우 DNA를 재추출 하기에는 검체가 부족할 수 있으며 검체 재채취가 어려울 수 있다. 질관리 지

Table 5. Prenatal diagnostic testing algorithm following positive NIPT results

NIPT result	Recommended test	Sample type	Result	Recommended further test
Trisomy 13, 18, 21; SCA; other aneuploidy; triploidy	Karyotyping	CVS	Normal or abnormal c/w NIPT	No further test/Consider CMA
			Mosaicism	Follow-up amniocentesis with mosaicism study
		AF	Normal or abnormal c/w NIPT or mosaic c/w NIPT	No further test/Consider CMA
Small CNV	CMA	CVS or AF	Negative or abnormal c/w NIPS	No further test
			Abnormal not c/w NIPS	Consider further test following abnormal finding

Abbreviations: AF, amniotic fluid; CMA, chromosomal microarray; CNV, copy number variant; CVS, chorionic villus sampling; NIPT, noninvasive prenatal test; SCA, sex chromosome aneuploidy.

https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.3.141

표가 기준을 통과 못했다 하더라도 판독이 가능한 수준이라면 제한점을 기술하고 검사 결과 보고가 가능할 수 있다. 한편, 질관리 지표가 기준을 통과하였더라도 노이즈(noise)가 심하여 위양성 복제수변이가 많은 경우 판독이 불가능할 수 있는데 이런 경우에 DNA 재추출 및 재검이 고려될 수 있다.

6. 모체세포 오염과 섞임증

산전검체는 모체세포 오염에 대해 평가하는 것이 권장된다. MCC는 모체의 혈액을 포함하는 미배양 양수 검체, 모체의 탈락막이 적절하게 세척되지 않은 융모막에 존재할 수 있고, 배양 검체라도 광범위한 계대 배양 과정 중 모체세포 확장에 의해 존재할 수 있다. 일반적으로 양수 검체의 경우 MCC 빈도가 0.5%, 융모막 검체의 경우 1–2% 정도로 알려져 있다[32, 33].

MCC는 복제수변이의 감지 및 해석에 영향을 미칠 수 있는데, 낮은 수준의 섞임증은 상당한 수준의 MCC로 인해 놓칠 가능성이 있다. MCC는 STR (short tandem repeats) 분석 및 SNP 기반 CMA 플랫폼을 포함한 다양한 방법으로 검출할 수 있는데, 남성 태아의 경우 성염색체 플롯의 변화는 MCC를 암시할 수 있다. 각 검사실은 특정 CMA 플랫폼에 허용되는 MCC 수준을 식별하기 위해 MCC 검출 방법을 검증해야 한다. ACMG에서는 산전 CMA에서 이러한 MCC 여부에 대한 확인 검사를 권장하고 있다. 그러나 산전 CMA에서 MCC 확인을 위해서 STR 검사와 같은 추가 검사가 필요한지에 대해서는 CMA 플랫폼의 특성, 추가 검사의 비용, 효율성 등을 고려하여 결정할 필요가 있다. CMA에 의해 감지된 섞임증 현상은 그 존재와 수준을 확인하기 위해 조사해야 하며 culture artifact (가상 모자이크 현상), 진성 섞임증 또는 CPM을 나타낼 수 있다. 관련된 염색체와 이상 유형에 따라 섞임증 상태를 확인하거나 배제하기 위해 다른 검체를 사용한 추가 검사나 FISH 분석이 도움이 될 수 있다.

요 약

염색체마이크로어레이 검사의 활용으로 산전진단을 포함한 선천성 이상에서 임상 진료의 질이 향상될 수 있다. 검사실은 염색체마이크로어레이 검사의 장단점과 목적을 잘 이해해야 하고, 검사의 도입, 변경, 수행 과정에서 플랫폼 검증 및 검사 모든 과정의 질관리에 대한 적절한 계획과 지침 및 문서화된 기록을 가지고 있어야 한다. 산전 CMA 검사는 산전검체의 특성을 이해하고, 거기에 부합하는 검증과정, 결과보고, 포괄적 유전상담에 대한 계획이 필요하다. 본 지침은 국내 CMA 검사 수행의 표준 검사 지침을 마련하고, 검사의 오류를 줄여 정확한 검사 및 해석을 제공함으로써 환자의 진단과 치료에 도움이 되고자 한다.

이해관계

저자들은 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

감사의 글

대한진단유전학회의 임상지침/권고안 개발사업 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Gardner RJM, Sutherland GR, et al. eds. Chromosome abnormalities and genetic counseling. 4th ed. Oxford, England: Oxford University Press, 2011.
2. Zneimer SM. Cytogenetic abnormalities: Chromosomal, FISH and microarray-based clinical reporting and interpretation of result. 1st ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2014.
3. Ministry of Health and Welfare. Partial amendment of details on the application criteria and methods of medical care benefits. Notification no. 2019 – 166, Jul. 29, 2019. https://www.mohw.go.kr/react/modules/viewHtmlConv.jsp?BOARD_ID=5900&CONT_SEQ=350329&FILE_SEQ=269612 (Updated on Jul 2019).
4. Miller DT, Adam MP, Aradhya S, Biesecker LG, Brothman AR, Carter NP, et al. Consensus statement: chromosomal microarray is a first-tier clinical diagnostic test for individuals with developmental disabilities or congenital anomalies. Am J Hum Genet 2010;86:749-64.
5. Manning M and Hudgins L. Array-based technology and recommendations for utilization in medical genetics practice for detection of chromosomal abnormalities. Genet Med 2010;12:742-5.
6. Cooley LD, Lebo M, Li MM, Slovak ML, Wolff DJ. American College of Medical Genetics and Genomics technical standards and guidelines: microarray analysis for chromosome abnormalities in neoplastic disorders. Genet Med 2013;15:484-94.
7. South ST, Lee C, Lamb AN, Higgins AW, Kearney HM. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. Genet Med 2013;15:901-9.
8. Kearney HM, South ST, Wolff DJ, Lamb A, Hamosh A, Rao KW. American College of Medical Genetics recommendations for the design and performance expectations for clinical genomic copy number microarrays intended for use in the postnatal setting for detection of constitutional abnormalities. Genet Med 2011;13:676-9.

9. Kearney HM, Thorland EC, Brown KK, Quintero-Rivera F, South ST. American College of Medical Genetics standards and guidelines for interpretation and reporting of postnatal constitutional copy number variants. Genet Med 2011;13:680-5.
10. Brothman AR, Dolan MM, Goodman BK, Park JP, Persons DL, Saxe DF, et al. College of American Pathologists/American College of Medical Genetics proficiency testing for constitutional cytogenomic microarray analysis. Genet Med 2011;13:765-9.
11. Riggs ER, Andersen EF, Cherry AM, Kantarci S, Kearney H, Patel A, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen). Genet Med 2020;22:245-57.
12. Shao L, Akkari Y, Cooley LD, Miller DT, Seifert BA, Wolff DJ, et al. Chromosomal microarray analysis, including constitutional and neoplastic disease applications, 2021 revision: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med 2021;23:1818-29.
13. Korean Society of Medical Genetics and Genomics. Guidelines for clinical practice of postnatal chromosomal microarray analysis. 2021. (https://www.guideline.or.kr/guide/view.php?number=1125&cate=A)
14. Cherry AM, Akkari YM, Barr KM, Kearney HM, Rose NC, South ST, et al. Diagnostic cytogenetic testing following positive noninvasive prenatal screening results: a clinical laboratory practice resource of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). Genet Med 2017;19:845-50.
15. Canadian College of Mmedical Geneticists Cytogenetics Committee. CCMG Guidelines for Genomic Microarray Testing. https://www.ccmg-ccgm.org/wp-content/uploads/2022/04/CCMG_Guidelines_for_Genomic_Microarray_Testing_FINAL.pdf (Updated on Jan 2016).
16. Armour CM, Dougan SD, Brock JA, Chari R, Chodirker BN, DeBie I, et al. Practice guideline: joint CCMG-SOGC recommendations for the use of chromosomal microarray analysis for prenatal diagnosis and assessment of fetal loss in Canada. J Med Genet 2018;55:215-21.
17. Committee on Genetics and the Society for Maternal-Fetal Medicine. Committee Opinion No.682: Microarrays and Next-Generation Sequencing Technology: The Use of Advanced Genetic Diagnostic Tools in Obstetrics and Gynecology. Obstet Gynecol 2016;128:e262-8.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Genomic copy number microarrays for constitutional genetic and oncology applications. 1st ed. CLSI guideline MM21. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
19. Silva M, de Leeuw N, Mann K, Schuring-Blom H, Morgan S, Giardino D, et al. European guidelines for constitutional cytogenomic analysis. Eur J Hum Genet 2019;27:1-16.
20. Gill K, Sasaki J, Jayakar P, Sosa L, Welch E. Chromosomal microarray detects genetic risks of neurodevelopmental disorders in newborns with congenital heart disease. Cardiol Young 2021;31:1275-82.
21. Cho SY, Ki CS, Jang JH, Sohn YB, Park SW, Kim SH, et al. Familial Xp22.33-Xp22.12 deletion delineated by chromosomal microarray analysis causes proportionate short stature. Am J Med Genet A 2012;158A:1462-6.
22. Masri A, Gimelli S, Hamamy H, Sloan-Béna F. Microarray delineation of familial chromosomal imbalance with deletion 5q35 and duplication 10q25 in a child showing multiple anomalies and dysmorphism. Am J Med Genet A 2014;164A:1254-61.
23. Kohannim O, Peredo J, Dipple KM, Quintero-Rivera F. Clinical findings associated with a *de novo* partial trisomy 10p11.22p15.3 and monosomy 7p22.3 detected by chromosomal microarray analysis. Case Rep Genet 2011;2011:131768.
24. Pinto IP, Minasi LB, da Cruz AS, de Melo AV, da Cruz e Cunha DM, Pereira RR, et al. A non-syndromic intellectual disability associated with a *de novo* microdeletion at 7q and 18p, microduplication at Xp, and 18q partial trisomy detected using chromosomal microarray analysis approach. Mol Cytogenet 2014;7:44.
25. Sismani C, Kitsiou-Tzeli S, Ioannides M, Christodoulou C, Anastasiadou V, Stylianidou G, et al. Cryptic genomic imbalances in patients with *de novo* or familial apparently balanced translocations and abnormal phenotype. Mol Cytogenet 2008;1:15.
26. Korean Institute of Genetic Testing Evaluation. Korean Institute of Genetic Testing Evaluation inspection checklist for cytogenetic tests. In: Korean Institute of Genetic Testing Evaluation, 2022.
27. The Korean Society for Laboratory Medicine/Laboratory Medicine Foundation. Good laboratory inspection checklist: cytogenetic tests. In:The Korean Society for Laboratory Medicine/Laboratory Medicine Foundation, 2022.
28. Wapner RJ, Martin CL, Levy B, Ballif BC, Eng CM, Zachary JM, et al. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. N Engl J Med 2012;367:2175-84.
29. Dugoff L, Norton ME, Kuller JA. The use of chromosomal microarray for prenatal diagnosis. Am J Obstet Gynecol 2016;215:B2-9.
30. Group of consensus of the use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. Consensus of the use of chromosomal microarray analysis in prenatal diagnosis. Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi 2014;49:570-2.

https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.3.141

31. Gu S, Jernegan M, Van den Veyver IB, Peacock S, Smith J, Breman A. Chromosomal microarray analysis on uncultured chorionic villus sampling can be complicated by confined placental mosaicism for aneuploidy and microdeletions. Prenat Diagn 2018;38:858-65.
32. Hsu LY, Kaffe S, Jenkins EC, Alonso L, Benn PA, David K, et al. Proposed guidelines for diagnosis of chromosome mosaicism in amniocytes based on data derived from chromosome mosaicism and pseudomosaicism studies. Prenat Diagn 1992;12:555-73.
33. Schreck RR, Falik-Borenstein Z, Hirata G. Chromosomal mosaicism in chorionic villus sampling. Clin Perinatol 1990;17:867-88.