원저
Lab Med Online
Vol. 13, No. 4: 356-363, October 2023
https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.4.356

BCR::ABL1 정량 검사의 국내 현황 조사(2022)

Current Status of *BCR::ABL1* Quantitative PCR Analysis in Korea (2022)

이자영[1] · 김인숙[2] · 김현영[3] · 신새암[4] · 김미영[5]
Ja Young Lee, M.D.[1], In-Suk Kim, M.D.[2], Hyun-Young Kim, M.D.[3], Saeam Shin, M.D.[4], Miyoung Kim, M.D.[5]

인제대학교 부산백병원 진단검사의학과[1], 양산부산대학교병원 진단검사의학과[2], 삼성서울병원 진단검사의학과[3], 연세대학교 세브란스병원 진단검사의학과[4], 서울아산병원 진단검사의학과[5]
Department of Laboratory Medicine[1], Inje University Busan Paik Hospital, Busan; Department of Laboratory Medicine[2], Pusan National University Yangsan Hospital, Yangsan; Department of Laboratory Medicine and Genetics[3], Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine[4], Yonsei University College of Medicine, Seoul; Department of Laboratory Medicine[5], Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, Seoul, Korea

Background: *BCR::ABL1* real-time quantitative PCR (RQ-PCR) is the optimal test for monitoring patients with chronic myeloid leukemia after treatment; however, standardization among testing institutions is required to assess molecular response. We performed an online survey to investigate the actual status and standardization of the *BCR::ABL1* RQ-PCR test in Korea.
Methods: The survey was provided by e-mail to the laboratory experts in molecular genetic testing at university hospitals, tertiary medical institutions, and specialized testing institutions. Questionnaires covered each institution's *BCR::ABL1* RQ-PCR test (eight questions), reporting format (six questions), verification of the lower limit of detection and quantitation (seven questions), and internal and external quality control (two questions).
Results: Responses were received from 15 institutions. Every institution utilized RQ-PCR kits that were commercially available. All of them used the *ABL1* gene as a reference gene and had a copy number range of at least 10,000, which is necessary for determining a deep molecular response (DMR). The majority of laboratories established their own laboratory detection limits suitable for determining a DMR. The reporting of results and internal and external quality control procedures differed by institution.
Conclusions: The survey confirmed that testing institutions are implementing standardized RQ-PCR methods, but it is necessary to perform detection limit verification and internal and external quality control to improve the precision and sensitivity of the results. Standardization and guidelines are required to enhance the consistency of testing result reports across institutions.

Key Words: *BCR::ABL1*, Real-time PCR, quantitative, Chronic myeloid leukemia, Surveys and questionnaires

서 론

BCR::ABL1 유전자재배열검사는 만성골수백혈병(chronic myeloid leukemia, CML)의 진단 및 치료를 위해 필수적인 검사이다. *BCR::ABL1* 융합 전사체(fusion transcript)를 검출하기 위해 염색체핵형분석, 형광제자리교합, 정성 및 정량 PCR 등을 이용할 수 있는데 이 중 *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사가 CML 환자의 치료 후 추적관찰에 가장 적합한 검사로 널리 이용되고 있다[1]. National Comprehensive Cancer Network 및 European LeukemiaNet에서 제시한 가이드라인에 따르면 CML 환자는 치료 시작 후 3개월마다 *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사를 통해 잔존질환을 모니터링하며 표준화 단위인 International Scale (%IS)로 분자유전학적 반응(molecular response, MR)을 확인해야 한다[2, 3]. *BCR::ABL1* 융합 전사체의 복제수를 참고유전자복제수로 나눠 퍼센트 비율(normalized copy number, NCN)을 계산하고 NCN에 conversion factor (CF)를 곱하여 %IS를 계산한다[4]. International Randomized Study of Interferon and STI571 연구에서 30명의 CML 환자 검체를 이용하여 *BCR::ABL* 융합 전사체의 기준값을 설정하고 기준값에서 3 log 감소를 보이는 경우 주요 분자유전학적 반응(major molecular response, MMR)으로 정의하였으며 이를 0.1%IS 보고 단위로 표준화

Corresponding author: Miyoung Kim, M.D., Ph.D.
https://orcid.org/0000-0002-8903-5044
Department of Laboratory Medicine, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, 88 Olympic-ro 43-gil, Songpa-gu, Seoul 05505, Korea
Tel: +82-2-3010-4498, Fax: +82-2-2045-3081, E-mail: miyoungkim@amc.seoul.kr

Received: May 11, 2023
Revision received: June 22, 2023
Accepted: June 29, 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.

하였다[5, 6]. MMR 이상의 깊은 분자유전학적 반응(deep molecular response, DMR)은 *BCR::ABL1* 융합 전사체가 0.01%IS 이하일 때 MR4로, 0.0032%IS 이하일 때 MR4.5로 판정하며 DMR을 2년 이상 지속적으로 유지할 경우 tyrosine kinase inhibitor 치료 중단을 고려할 수 있다[7, 8]. 표준화된 CML 환자의 잔존질환 모니터링을 위해 결과 보고의 표준화뿐 아니라 정확하고 재현성 있는 *BCR::ABL1* 정량 PCR 결과를 얻을 수 있는 PCR 검사방법의 표준화도 중요하다[6]. *BCR::ABL1* 정량 PCR 과정에 대한 가이드라인은 2011년 영국 혈액학회에서 발표된 바 있다[9]. 검사기관별 검체의 질과 양, 핵산 추출방법, 참고유전자의 종류, 정량 PCR 과정 및 결과보고까지 전 과정이 *BCR::ABL1* 융합 전사체 측정에 영향을 미칠 수 있으며 이에 대한 표준화된 가이드라인 정립이 필요하다.

본 연구에서는 국내 *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사의 검사방법 및 결과보고 현황 파악 및 검사 수행 표준화를 위해 설문조사를 시행하고 응답자의 답변을 평가하였다.

재료 및 방법

설문대상자는 해당 연도 기준 대한진단검사의학회 회원 중 대학병원, 3차 의료기관 및 전문 수탁검사기관 분자유전검사 책임 전문의로 2021년 7월 5일에서 8월 30일까지 65기관에 이메일을 발송하여 온라인 설문조사를 실시하였다. *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사를 직접 시행 중인 검사기관만 설문조사에 응답하도록 하였다.

설문 항목은 기관의 *BCR::ABL1* 정량 PCR검사방법(8문항), 결과 보고(6문항), 최소검출한계 및 최소정량한계 설정(7문항) 및 내·외부 정도관리 방법(2문항)에 대한 평가로 총 23문항으로 이루어졌다. 각 문항별 설문 응답 빈도를 분석하였고 주관식 질문의 경우 별도로 기술하였다.

결 과

설문조사에 응한 15기관의 답변을 분석하였다. 설문에 회신한 기관은 대학병원 및 3차 의료기관 11기관, 전문 수탁검사기관 4기관이었으며, 자세한 설문 내용은 Table 1에 정리하였다.

1. *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사방법

BCR::ABL1 정량 PCR 검사를 위한 검체 보관은 채혈부터 검체 접수까지 4시간 이내로 권장하는 기관이 53.3% (8/15)로 가장 많았으며 24시간 이내 33.3% (5/15), 48시간 이내 13.3% (2/15)순이었다. PCR 검사를 위한 RNA 추출은 QIAamp RNA Blood Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하는 기관이 73.3% (11/15)로 가장 많았으며 RNAqueous™ Total RNA isolation kit (Ambion, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 13.3% (2/15), High Pure RNA isolation kit (Roche Life Sciences, San Francisco, CA, USA) 6.7% (1/15) 순이었으며 trizol을 이용해서 수기로 추출하는 기관도 1기관 있었다. 3기관은 QIAcube (Qiagen, Hilden, Germany) 자동화 추출장비를 사용하고 있었다. 추출한 핵산의 질은 93.3% (14/15) 기관이 spectrophotometry법으로 확인하며 1기관은 4200 TapeStation (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)으로 확인한다고 답하였다. *BCR::ABL1* 정량은 설문에 답한 모든 기관에서 실시간 PCR법을 이용하고 있었으며 *ABL1* 유전자를 참고유전자로 사용하였다. 기관에서 사용 중인 참고유전자의 유전자 복제수 범위는 100,000 이상인 경우 40% (6/15), 50,000–100,000인 경우 20% (3/15), 32,000–50,000인 경우 20% (3/15) 순이었으며 이외에도 10,000–50,000, 10,000–100,000, 32,000–100,000 등 기관별로 다양한 범위를 사용하고 있었다. 모든 기관에서 Ipsogen *BCR::ABL1* Mbcr Is-MMR kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하였으며 정량 결과 보고를 위해 검체당 1회 검사를 시행하는 기관이 86.7% (13/15)였으며 2기관에서만 2회 검사를 시행한다고 답하였다.

2. *BCR::ABL1* 정량 PCR 결과보고

결과 보고서에 *ABL1* 참고유전자의 유전자 복제수(copy number)를 기술하는 기관은 60% (9/15)였다. *BCR::ABL1* 정량 PCR 결과는 설문에 참여한 모든 기관에서 %IS로 보고하고 있었다. %IS, NCN 및 *BCR::ABL1* 융합 전사체의 유전자 복제수를 모두 보고하는 기관이 46.7% (7/15)로 가장 많았으며 %IS만 보고하는 기관이 26.7% (4/15), %IS 및 NCN을 같이 보고하는 기관이 20% (3/15), %IS 및 *BCR::ABL1* 융합 전사체의 유전자 복제수를 같이 보고하는 기관이 1기관이었다. IS 보고형식으로 %IS만 보고하는 기관 73.3% (11/15), %IS 및 MR을 함께 보고하는 기관이 26.7% (4/15)이었다. 모든 기관에서 매 검사마다 IS 보정물질을 이용하여 계산한다고 답하였으며 고정된 CF를 이용하는 기관은 없었다.

3. *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사의 최소검출한계 및 최소정량한계 설정

검사실 자체 최소검출한계(lower limit of detection, LOD) 및 최소정량한계(lower limit of quantification, LOQ) 설정에 대한 설문조사에서 LOD만 설정된 기관 40% (6/15), LOD 및 LOQ가 모두 설정되어 있는 기관 33.3% (5/15), LOQ만 설정된 기관 13.3% (2/15)순이었으며 LOQ 및 LOD가 모두 설정되지 않은 기관도 2기관 있었다. LOD 및 LOQ 값을 NCN으로 설정한 기관 53.8% (7/13), %IS로 설정한 기관 46.2% (6/13)이었으며 기관별 LOD는 0.0069인 기관이 45.5% (5/11)로 가장 많았으나 0.0022, 0.0001, 0.01, 3 copies 등 다양하였다. 기관별 LOQ는 LOD와 동일한 0.0069인 기관이 42.9%

Table 1. Response to the questionnaire about the *BCR::ABL1* quantitative PCR in Korea

Questionnaires & Answer options	Response, % (institution)
1 Select the institution-recommended *BCR::ABL1* quantitative PCR sample storage period (the time between drawing blood and receiving the sample).	
1) Less than 4 h	53.3 (8/15)
2) Less than 24 h	33.3 (5/15)
3) Less than 48 h	13.3 (2/15)
4) Others	
2 What methods are used for RNA extraction?	
2-1 Please describe the product name of RNA extraction kit	
1) QIAamp RNA Blood Mini Kit	73.3 (11/15)
2) RNAqueous™ Total RNA isolation	13.3 (2/15)
3) High Pure RNA isolation	6.7 (1/15)
4) Others (manual extraction using trizol)	6.7 (1/15)
2-2 If an automated RNA extraction system is used, describe the system name	
1) QIAcube	20.0 (3/15)
3 How can the quality of isolated nucleic acids be evaluated?	
1) Spectrophotometry (e.g., NanoDrop)	93.3 (14/15)
2) Microfluidic analysis (e.g., Bioanalyzer)	0.0 (0/15)
3) Capillary gel electrophoresis	0.0 (0/15)
4) Fluorescent dye detection (e.g., RiboGreen)	0.0 (0/15)
5) Others (4200 TapeStation)	6.7 (1/15)
4 How do you determine the concentration of *BCR::ABL1*?	
1) Real-time PCR	100.0 (15/15)
2) Digital droplet PCR	0.0 (0/15)
3) Others	0.0 (0/15)
5 What reference gene is used for real-time PCR?	
1) *ABL1* gene	100.0 (15/15)
2) *GUSB* gene	0.0 (0/15)
3) *BCR* gene	0.0 (0/15)
4) Others	0.0 (0/15)
6 How many average copies of the reference gene are detected by quantitative *BCR::ABL1* PCR?	
1) 100,000 or more	40.0 (6/15)
2) 50,000–100,000	20.0 (3/15)
3) 32,000–50,000	20.0 (3/15)
4) 10,000–32,000	0.0 (0/15)
5) Less than 10,000	0.0 (0/15)
6) Others (10,000–50,000/10,000–100,000/32,000–100,000)	20.0 (3/15)
7 Please provide the name of the product used for *BCR::ABL1* quantitative PCR.	
1) Ipsogen *BCR::ABL1* Mbcr Is-MMR kit	100.0 (15/15)
8 To report quantitative results, how many tests are performed and reported for each sample?	
1) One test	86.7 (13/15)
2) Two tests	13.3 (2/15)
3) Three tests	0.0 (0/15)
4) Others	0.0 (0/15)
9 Do you describe the copy number of the reference gene in the *BCR::ABL1* quantitative PCR report?	
1) Yes	60.0 (9/15)
2) No	40.0 (6/15)
10 Do you include the copy number of the *BCR::ABL1* fusion transcript in the quantitative PCR report?	
1) Yes	53.3 (8/15)
2) No	46.7 (7/15)

(*Continued to the next page*)

https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.4.356

Table 1. Continued

Questionnaires & Answer options	Response, % (institution)
11 Do you describe the normalized copy number in the *BCR::ABL1* quantitative PCR report (copy number of the *BCR::ABL1* fusion transcript or copy number of the reference gene)?	
1) Yes	66.7 (10/15)
2) No	33.3 (5/15)
12 Do you include the international scale (IS) in the quantitative PCR report for *BCR::ABL1*?	
1) Yes	100.0 (15/15)
2) No	0.0 (0/15)
13 What format is used to describe the IS in the *BCR::ABL1* quantitative PCR report?	
1) Report only %IS	73.3 (11/15)
2) Report %IS and molecular response	26.7 (4/15)
3) Report only molecular response	0.0 (0/15)
4) Others	0.0 (0/15)
14 How do you determine the IS?	
1) Calculate the results of each test using the IS calibrator (e.g., Normalized copy number IS-calibrator value / IS-normalized copy number of the IS calibrator)	100.0 (15/15)
2) Calculate using a fixed conversion factor (e.g., number of normalized copies multiplied by conversion factor)	0.0 (0/15)
3) Others	0.0 (0/15)
15 Are the lower limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) established for *BCR::ABL1* quantitative PCR?	
1) Both LOD and LOQ are set	33.3 (5/15)
2) Only LOD is set	40.0 (6/15)
3) Only LOQ is set	13.3 (2/15)
4) Neither set	13.3 (2/15)
16 The LOD and LOQ of *BCR::ABL1* quantitative PCR were established for which of the following values?	
1) NCN	53.8 (7/13)
2) %IS	46.2 (6/13)
3) Others	0.0 (0/13)
17 Please describe the LOD for *BCR::ABL1* quantitative PCR established by your institution.	
1) 0.0069	45.5 (5/11)
2) 0.0022	18.2 (2/11)
3) 0.0001	18.2 (2/11)
4) 0.01	9.1 (1/11)
5) Three copies	9.1 (1/11)
18 Please describe the LOQ for *BCR::ABL1* quantitative PCR established by your institution.	
1) 0.0069	42.9 (3/7)
2) 0.0032	14.3 (1/7)
3) 0.0017	14.3 (1/7)
4) 0.01	14.3 (1/7)
19 If the *BCR::ABL1* quantitative PCR result is below the LOD or a value is detected, do you perform a retest?	
1) No, we do not test again	83.3 (10/12)
2) Yes, the retest is performed once	8.3 (1/12)
3) Yes, the retest is performed twice	0.0 (0/12)
4) Others (the necessity of a retest is determined by the first or second visit of the patient, previous test results, and related test results)	8.3 (1/12)
20 How do you report the *BCR::ABL1* quantitative PCR result if they are below the LOD but a value is detected? (If the LOD is not specified and only the LOQ is specified, the value is considered to be smaller than that of the LOQ)	
1) Report the value as is with a comment indicating that it is less than the LOD or LOQ.	38.5 (5/13)
2) Report a positive result below the LOD or LOQ	23.1 (3/13)
3) Indicate that the result is negative	23.1 (3/13)
4) Provide the value as is	7.7 (1/13)
5) Others (report the value is formed as %IS with a comment indicating that it is less than the analytical measurement range)	7.7 (1/13)

(*Continued to the next page*)

Table 1. Continued

Questionnaires & Answer options	Response, % (institution)
21 How do you report the *BCR::ABL1* quantitative PCR result if they are below the LOQ and above the LOD?	
1) Report the positive result below the LOQ	50.0 (2/4)
2) Report the value as is with a comment indicating that it is less than the LOD	25.0 (1/4)
3) Provide the value as is	25.0 (1/4)
22 Are you performing internal quality control procedures for *BCR::ABL1* quantitative PCR ? If yes, please describe in detail how to implement	
1) Yes (e.g., use positive and negative samples for each test)	100.0 (15/15)
Use positive, weakly positive, and negative samples for each test	40.0 (6/15)
Use positive and negative samples for each test	26.7 (4/15)
Use positive samples of two levels for each test	6.7 (1/15)
Use a positive sample for each test	6.7 (1/15)
Use a laboratory-created low-positive sample (0.1–0.001%IS) for each test	6.7 (1/15)
Use the supplied control for each test	6.7 (1/15)
Use the IS calibrator for each test	6.7 (1/15)
2) No	0.0 (0/15)
23 Are you performing external quality control procedures for *BCR::ABL1* quantitative PCR?	
1) Participate in the external quality control program (please describe all participating programs)	73.3 (11/15)
The College of American Pathologists survey	72.7 (8/11)
Molecular program of the Korean Association of External Quality Assessment Service	45.5 (5/11)
Korean institute of genetic testing evaluation	27.3 (3/11)
2) Comparison with other laboratories	27.3 (3/15)
3) Others (interobserver comparison)	6.7 (1/15)

(3/7)이었으며 이외에 0.0032, 0.0017, 0.01로 답하였다. 정량 PCR 결과가 LOD 미만이나 값이 나올 경우 재검하지 않는 기관이 83.3% (10/12)로 다수를 차지하였으며 1기관은 1회 재검, 1기관은 환자의 초진 혹은 재진 여부, 이전 검사 결과 및 연관 검사 결과 리뷰 등을 통해 재검 여부를 결정한다고 답하였다. 정량 PCR 결과가 LOD 혹은 LOQ 미만이나 값이 나올 경우 값을 그대로 보고하고 LOD 혹은 LOQ 미만이라는 코멘트를 추가하는 기관이 38.5% (5/13)로 가장 많았으며, 양성이나 LOD 혹은 LOQ 미만으로 보고하는 기관 23.1% (3/13), 음성으로 보고하는 기관 23.1% (3/13)이었으며 값을 그대로 보고하거나 %IS로 보고하고 분석범위 미만으로 보고하는 기관도 각각 1기관이 있었다. 정량 PCR 결과가 LOQ 미만, LOD 이상의 값일 경우 보고방법에 대한 설문에 4기관만 답하였는데 양성이나 LOQ 미만으로 보고하는 기관이 50% (2/4), 값을 그대로 보고하고 LOQ 미만이라는 코멘트를 추가하거나 값을 그대로 보고하는 기관이 각각 1기관 있었다.

4. *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사의 내/외부 정도관리

설문에 답한 모든 기관이 내부정도관리를 시행하고 있었으며 주관식으로 설문한 정도관리방법은 다양하였다. 매 검사 시 양성, 약양성 및 음성 검체를 이용하여 내부정도관리를 시행하는 기관이 40% (6/15)로 가장 많았으며 양성 및 음성 검체를 이용하는 기관 26.7% (4/15)였다. 1개 혹은 2개의 양성 물질을 이용하거나 검사실에서 제작한 약양성 물질(IS 0.1–.0.001%), 키트 내 대조군 혹은 IS 보정물질을 이용하여 내부정도관리를 시행하는 기관도 1기관씩 있었다.

모든 기관이 외부정도관리를 시행하고 있다고 답하였으며 외부정도관리 프로그램에 참여하는 기관이 73.3% (11/15)였다. *BCR::ABL1* 정량 PCR 외부정도관리를 시행하는 기관 72.7% (8/11)로 모두 College of American pathologists (CAP) survey에 참여하고 있었다. 나머지 3기관은 국내 *BCR::ABL1* 정성 PCR 외부정도관리 프로그램에만 참여하고 있었다. 3기관은 검사실 간 비교검사를 시행하고 있었으며 검사자 간 비교검사를 시행한다고 답한 기관도 1기관 있었다.

고 찰

BCR::ABL1 정량 PCR 검사는 실시간 정량 PCR 장비, 시약, PCR 검사방법, 참고 유전자의 종류 및 결과 보고 단위 등에 따라 결과 보고값의 차이가 있으며 검사기관 간 차이를 줄이기 위한 표준화 가이드라인 제정 및 표준 물질 개발이 지속적으로 이루어져 왔다[10].

정량 분석을 위한 *BCR::ABL1* 융합 전사체의 변성을 최소화하기 위해 채혈 후 72시간 이내에 검체를 처리하여야 하며 민감도 높은 잔존 질환 분석을 위해 6시간 이내 검체 처리를 추천하고 있다[9]. 본 설문조사에서 채혈 후 4시간 이내 검체 접수하도록 하는 기

https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.4.356

관이 50%를 차지하였고 대부분의 검사실에서 채혈 후 24시간 이내 검체를 접수하도록 하고 있었으나 일부 수탁검사기관들에서는 48시간 이내 검체를 접수하도록 권장하고 있었다. RNA 추출방법은 DNase 처리방식이 포함된 추출 프로토콜에 따라야 하며 상품화된 키트 및 trizol을 이용한 수기법이나 자동화된 RNA 추출장비를 이용할 수 있다. Trizol 추출법을 사용할 경우 더 순도 높은 RNA량이 산출되고, 광학 밀도(optical density, OD) 측정 시 좀 더 신뢰성 높은 결과를 얻을 수 있다[9]. 본 설문조사에서는 trizol을 사용하는 1기관을 제외한 모든 기관이 상품화된 RNA 추출 키트를 사용하고 있었다. 추출된 핵산의 질은 RNA 추출과정에서 남은 DNA양 확인을 위해 매번 반드시 OD를 측정해야 하며 cDNA 합성을 위해 필요한 RNA 최소양은 2 μg이다[9]. 본 설문조사에서도 4200 TapeStation (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)을 이용하는 1기관을 제외한 모든 기관에서 spectrophotometry법으로 추출된 핵산 질을 확인하고 있다고 답하였다. *BCR::ABL1* 정량 모니터링을 위해 설문에 참여한 모든 기관에서 실시간 정량 PCR 검사를 시행하며 참고유전자는 *ABL1* 유전자를 사용하고 있었다. 참고유전자의 경우 Europe against cancer program에서는 *ABL1, GUSB* 및 *B2M* 유전자, CML expert group에서는 *ABL1, GUS* 및 *BCR* 유전자 사용을 권장하고 있다[6, 11]. 참고유전자마다 *BCR::ABL1* 정량 PCR에서 검출되는 유전자 복제수 차이가 있어 주의가 필요하며 전세계 대부분 검사기관에서 *ABL1* 유전자를 가장 많이 사용하고 있다[4].

BCR::ABL1 융합 전사체 검출 유무와 상관없이 참고유전자의 최소 복제수가 MR 판단 시 중요하며 MR 단계에 따라 참고유전자의 최소 복제수가 정해져 있다[12]. *ABL1*의 경우 복제수가 10,000 이상일 때 신뢰성 있는 결과를 제공할 수 있다[9]. DMR 판정을 위해 MR4-MR4.5 단계에 요구되는 참고유전자의 최소 유전자복제수 검출 여부를 반드시 확인하여야 한다[12]. 본 설문조사에 참여한 기관들에서 사용중인 *ABL1* 유전자의 복제수 범위는 다양하였으나 모든 검사기관에서 MR4 진단에 요구되는 *ABL1* 참고유전자 복제수인 10,000 이상으로 답변하였으며 MR5 진단에 요구되는 100,000 이상 참고유전자의 복제수 범위를 가지는 경우도 6기관 있었다.

BCR::ABL1 정량 PCR 검사의 정확성을 높이기 위해 cDNA단계가 아닌 RNA 단계부터 2–3회 반복 검사하는 것을 추천하며 낮은 값을 보이는 양성 검체의 경우는 반복검사 시행을 통해 한 번이라도 *BCR::ABL1* 융합 전사체 복제수가 검출되면 양성으로 보고해야 한다[9, 13, 14]. 설문조사에서 2회 반복검사를 시행하는 곳은 2기관뿐이었다.

Digital PCR 검사가 실시간 정량 PCR보다 낮은 값을 좀 더 정확하게 검출하여 MR5 이상의 MR 판정에 더 유용하게 사용할 수 있다[15, 16]. 그러나 설문조사 시행 시 digital PCR 방법을 사용하고 있다고 답한 기관은 없었다. *BCR::ABL1* 정량 digital PCR 검사용 상품화된 시약이 소개되고 있으나 기존의 정량 PCR 검사법과 비교 평가가 아직 부족하며 digital PCR 결과의 IS 보고단위 표준화가 필요하다[16, 17] .

%IS는 참고 유전자 및 분석 장비에 따라 값의 차이를 보여 보정 및 CF가 필요하며 검사기관에서는 측정된 *BCR::ABL1* 융합 전사체 값을 %IS로 보고하기 위해 표준물질을 이용하여 검사실 특이 CF를 설정하거나 WHO international genetic reference panel에 의해 보정된 상품화된 시약을 사용하여야 한다[18, 19]. 본 설문조사에서 모든 기관이 사용중인 *BCR::ABL1* 정량 키트의 경우 %IS 계산을 위해 매 검사마다 상품화된 IS 보정물질을 검체와 함께 사용하고 있기 때문에 CF 검증이 불필요하다. 그러나 시약회사에서 제공하는 CF를 사용하는 경우 표준물질을 이용하여 검사실 자체 CF 설정이 필요하며 검사실 자체 설정된 CF는 주기적인 검증을 통한 안정성을 확인해야 한다[12, 20]. 검사일마다 내부정도관리물질과 함께 CF 모니터링을 시행하고 검사장비가 바뀌거나 검사방법이 변하는 등 결과측정에 영향을 줄 수 있는 변화가 생길 경우 CF 재검증을 시행하여야 하며 변화가 없더라도 1년마다 검사실 자체 CF 검증이 추천된다[20].

BCR::ABL1 정량 PCR 검사의 LOD 및 LOQ는 DMR 판정 및 무치료 관해 예측을 위해 MR4 이상 %IS 값을 가지는 것이 바람직하다[21]. 검사기관의 LOD 및 LOQ가 0.032%IS일 경우 MR3.5 판정만 가능하며 그보다 낮은 *BCR::ABL1* 융합 전사체를 가진 검체의 경우 정확한 복제수 값이 검출되지 않아 DMR 판정이 불가능하다. 본 설문조사에서 대부분의 기관이 LOD 혹은 LOQ를 설정하고 있었으며 DMR 판정이 가능한 MR4 이상의 값을 가지고 있었다. 그러나 LOD 및 LOQ 값이 설정되어 있지 않거나 이론적 LOD값인 3 copies로 표기한 기관들이 있어 CLSI 가이드라인 EP17-A2에 따른 검사실 자체 LOD 혹은 LOQ값 설정이 반드시 필요하겠다[22]. *BCR-ABL* 정량 PCR 결과가 LOD 미만이나 측정값이 나올 경우 반복 검사를 시행하도록 권장하고 있으나[12] 본 연구에서 대부분의 기관은 재검을 시행하지 않고 있었다. *BCR::ABL1* 정량 PCR 결과값이 검출되지 않을 경우 '음성'으로 결과를 보고하기보다는 LOD와 함께 '검출되지 않음(undetected)'으로 보고한다. 또한 본 설문조사에서처럼 LOD 혹은 LOQ 미만의 값이 검출되거나 LOD 미만이면서 LOQ 이상의 값이 나올 경우 값을 그대로 보고하고 LOD 혹은 LOQ 미만이라는 코멘트를 추가할 수 있다[10]. 본 연구에서 결과 보고방식에 대한 질문에 대부분의 기관이 LOD를 설정하고 있었으나 LOQ는 일부 기관에서만 설정해두고 있었다. LOD 혹은 LOQ보다 낮은 값이 나올 경우 보고하는 양식에 대한 질문에 검사기관들은 다양한 답을 하여 결과보고방식에 대한 표준화가 필요하겠다.

BCR::ABL1 정량 PCR 검사의 내부정도관리를 위해 음성 및 양

성 검체를 사용하고 검사의 민감도 확인을 위해 LOD에 가까운 값을 가지는 양성 검체를 사용해야 하는데 양성 검체의 %IS는 0.1%보다 0.01%를 권장한다. 검사기관은 적어도 2개 이상의 표준물질을 이용하여 내부정도관리를 시행하여야 하며 표준물질은 혼합세포주 및 상품화된 정도관리물질을 사용할 수 있다[10]. 정도관리를 위해 검사한 표준물질 측정 값을 Westgard multi-rule을 적용하여 표준편차 3배 범위를 벗어나지 않게 관리할 것을 추천하고 있다[10, 13]. 본 연구에서 대부분의 기관은 2가지 이상의 검체를 이용하고 있었으나 약양성 검체를 사용하지 않거나 양성 검체만 이용하여 내부정도관리를 하는 일부 기관들이 있었다. 설문조사 시 *BCR::ABL1* 정량 PCR 외부정도관리 프로그램에 참여하는 기관은 53.3%였다. 외부정도관리 프로그램에 참가하지 않는 경우 검사실 간 비교를 시행할 수 있으며 검사실 간 비교를 하는 기관은 20%였다. 검사실 간 비교가 불가능한 경우 병원 내에서 시행하는 *BCR::ABL1* 정성 검사와 비교하거나 의무기록을 검토하여 임상적 타당성을 검증하는 방법 등을 시행할 수 있다. 하지만 4기관은 정량이 아닌 *BCR::ABL1* 정성 PCR 검사 외부정도관리 및 검사자 간 비교를 시행하고 있었고 이 경우 적절한 외부정도관리가 시행되고 있다고 보기 어렵다. 국내 외부정도관리 프로그램을 담당하고 있는 유전자검사평가원 및 대한임상정도관리협회에서 *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사항목 추가에 대한 논의가 필요할 것으로 생각된다.

본 설문조사 시행 시 질문의 응답률을 높이기 위해 예시를 제시한 것이 도움이 되었으나 일부 주관식 답변을 요구하는 설문의 경우 객관식 문항에 비해 응답률이 떨어지는 한계가 있었다. 또한 각 기관에서 사용중인 정량 PCR 검사 장비 및 spectrophotometer 장비의 종류, cDNA 합성에 필요한 RNA 농도의 최솟값 등에 대한 검사실 간 일치도를 확인할 수 있는 설문을 일부 시행하지 못한 한계점이 있다.

이번 설문조사를 통해 국내 검사기관의 *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사 현황을 파악하고 그 차이를 확인하였다. *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사는 CML 환자의 치료반응평가, 재발 및 기능적 완치 예측을 위해 중요하다. 설문조사를 통해 국내 검사기관들이 표준화된 검사방법을 시행하고 있는 것을 확인하였다. 하지만 *BCR::ABL1* 정량 PCR검사 결과의 정확성 및 민감도를 높일 수 있는 LOD 및 LOQ 검증과 적절한 내/외부정도관리 시행을 위한 개선이 필요하다. 또한 검사기관 간 검사결과보고의 일치도를 높이기 위해 결과보고방식 표준화 및 가이드라인 정립이 필요할 것으로 생각한다.

요 약

배경: *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사는 만성골수백혈병 환자의 치료 후 추적 관찰에 가장 적합한 검사이며 정확한 분자유전학적 반응 판정을 위해 검사기관 간 표준화가 필요하다. 본 연구에서는 국내 *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사의 현황 파악 및 표준화를 위한 온라인 설문조사를 시행하였다.

방법: 대학병원, 3차 의료기관 및 전문 수탁검사기관 분자유전검사 책임전문의에게 전자 메일을 통한 설문을 시행하였다. 설문 문항은 *BCR::ABL1* 정량 PCR 검사방법(8문항), 결과보고(6문항), 최소검출한계 및 최소정량한계 설정(7문항) 및 내·외부 정도관리 방법(2문항)에 대한 질문을 포함하였다.

결과: 15개 기관의 회신을 받았다. 설문조사 결과 모든 기관에서 상품화된 키트를 이용한 실시간 PCR법으로 시행하고 있었다. 모든 기관에서 *ABL1* 유전자를 참고유전자로 이용하고 깊은 분자유전학적 반응 판정에 요구되는 10,000 이상의 *ABL1* 유전자 복제수 범위를 가지고 있었다. 대부분의 기관이 깊은 분자유전학적 반응 판정에 적합한 검사실 자체 검출 한계를 설정하고 있었다. 검사기관별 결과보고방식 및 내부 및 외부정도관리 방법이 다양하였다.

결론: 설문조사를 통해 국내 검사기관들이 표준화된 검사방법을 시행하고 있는 것을 확인하였으나 결과의 정확성 및 민감도를 높일 수 있는 검출한계 검증 및 적절한 내부 및 외부정도관리 시행이 필요하겠다. 검사기관 간 검사결과보고의 일치도를 높이기 위한 표준화 및 가이드라인 정립이 필요하다.

이해관계

저자들은 본 연구와 관련하여 어떠한 이해관계도 없음을 밝힙니다.

감사의 글

본 연구는 대한진단유전학회 분자혈액분과 지원으로 이루어졌습니다.
설문에 참여해 주신 15기관의 선생님들께 감사의 인사를 드립니다.

REFERENCES

1. Zhen C and Wang YL. Molecular monitoring of chronic myeloid leukemia: international standardization of *BCR-ABL1* quantitation. J Mol Diagn 2013;15:556-64.
2. Deininger MW, Shah NP, Altman JK, Berman E, Bhatia R, Bhatnagar B, et al. Chronic Myeloid Leukemia, Version 2.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. J Natl Compr Canc Netw 2020;18:1385-415.
3. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. Leukemia 2020;34:966-84.

https://doi.org/10.47429/lmo.2023.13.4.356

4. Cross NC. Standardisation of molecular monitoring for chronic myeloid leukaemia. Best Pract Res Clin Haematol 2009;22:355-65.
5. Hughes TP, Kaeda J, Branford S, Rudzki Z, Hochhaus A, Hensley ML, et al. Frequency of major molecular responses to imatinib or interferon alfa plus cytarabine in newly diagnosed chronic myeloid leukemia. N Engl J Med 2003;349:1423-32.
6. Hughes T, Deininger M, Hochhaus A, Branford S, Radich J, Kaeda J, et al. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting *BCR-ABL* transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. Blood 2006;108:28-37.
7. Hehlmann R, Müller MC, Lauseker M, Hanfstein B, Fabarius A, Schreiber A, et al. Deep molecular response is reached by the majority of patients treated with imatinib, predicts survival, and is achieved more quickly by optimized high-dose imatinib: results from the randomized CML-study IV. J Clin Oncol 2014;32:415-23.
8. Saussele S, Richter J, Guilhot J, Gruber FX, Hjorth-Hansen H, Almeida A, et al. Discontinuation of tyrosine kinase inhibitor therapy in chronic myeloid leukaemia (EURO-SKI): a prespecified interim analysis of a prospective, multicentre, non-randomised, trial. Lancet Oncol 2018;19:747-57.
9. Foroni L, Wilson G, Gerrard G, Mason J, Grimwade D, White HE, et al. Guidelines for the measurement of *BCR-ABL1* transcripts in chronic myeloid leukaemia. Br J Haematol 2011;153:179-90.
10. White HE, Salmon M, Albano F, Andersen CSA, Balabanov S, Balatzenko G, et al. Standardization of molecular monitoring of CML: results and recommendations from the European treatment and outcome study. Leukemia 2022;36:1834-42.
11. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. Leukemia 2003;17:2474-86.
12. Cross NC, White HE, Colomer D, Ehrencrona H, Foroni L, Gottardi E, et al. Laboratory recommendations for scoring deep molecular responses following treatment for chronic myeloid leukemia. Leukemia 2015;29:999-1003.
13. Branford S and Hughes T. Diagnosis and monitoring of chronic myeloid leukemia by qualitative and quantitative RT-PCR. Methods Mol Med 2006;125:69-92.
14. Jennings LJ, Smith FA, Halling KC, Persons DL, Kamel-Reid S, Molecular Oncology Resource Committee of the College of American Pathologist. Design and analytic validation of *BCR-ABL1* quantitative reverse transcription polymerase chain reaction assay for monitoring minimal residual disease. Arch Pathol Lab Med 2012;136:33-40.
15. Jennings LJ, George D, Czech J, Yu M, Joseph L. Detection and quantification of *BCR-ABL1* fusion transcripts by droplet digital PCR. J Mol Diagn 2014;16:174-9.
16. Kockerols CCB, Valk PJM, Levin MD, Pallisgaard N, Cornelissen JJ, Westerweel PE. Digital PCR for *BCR-ABL1* quantification in CML: current applications in clinical practice. Hemasphere 2020;4:e496.
17. Chung HJ, Hur M, Yoon S, Hwang K, Lim HS, Kim H, et al. Performance evaluation of the QXDx *BCR-ABL* %IS droplet digital PCR assay. Ann Lab Med 2020;40:72-5.
18. Branford S, Fletcher L, Cross NC, Müller MC, Hochhaus A, Kim DW, et al. Desirable performance characteristics for *BCR-ABL* measurement on an international reporting scale to allow consistent interpretation of individual patient response and comparison of response rates between clinical trials. Blood 2008;112:3330-8.
19. White HE, Matejtschuk P, Rigsby P, Gabert J, Lin F, Lynn Wang Y, et al. Establishment of the first World Health Organization International Genetic Reference Panel for quantitation of *BCR-ABL* mRNA. Blood 2010;116:e111-7.
20. Ruiz MS, Sánchez MB, Vera Contreras YM, Agrielo E, Alonso M, Altuna ME, et al. Programme for Harmonization to the International Scale in Latin America for *BCR-ABL1* quantification in CML patients: findings and recommendations. Clin Chem Lab Med 2020;58:2025-35.
21. Arora R and Press RD. Measurement of *BCR-ABL1* transcripts on the International Scale in the United States: current status and best practices. Leuk Lymphoma 2017;58:8-16.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Evaluation of detection capability for clinical laboratory measurement procedures; approved guideline. Second edition. CLSI document EP17-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.