



한국에서 탠덤 질량분석기를 이용한 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사: 일 개 전문 수탁기관의 경험

Neonatal Screening Tests for Inherited Metabolic Disorders using Tandem Mass Spectrometry: Experience of a Clinical Laboratory in Korea

조성은¹ · 박은정¹ · 서동희^{1,2} · 이인범² · 이현주¹ · 조대연² · 오정민¹

Sung Eun Cho, M.D.¹, Eun Jung Park, B.S.¹, Dong Hee Seo, M.D.^{1,2}, In Bum Lee, M.S.², Hyun Ju Lee, M.T.¹, Dae-Yeon Cho, Ph.D.², Jung Min Oh, M.T.¹

랩지노믹스 임상검사센터¹, 랩지노믹스 의학연구소²

LabGenomics Clinical Laboratories¹, Seongnam; LabGenomics Clinical Research Institute², Seongnam, Korea

Background: The purpose of this study is to investigate the positive rates of screening tests for inherited metabolic disorders, set cutoff values, and report the actual status of internal quality controls in LabGenomics Clinical Laboratories by using LC-MS/MS system.

Methods: We use Agilent 1260 Infinity HPLC System (Agilent Technologies, USA) for liquid chromatography, and API 2000 (AB Sciex, Canada) for MS/MS system. We set up screening tests for 55 diseases, which include metabolic disorders of 25 amino acids, 16 organic acids, and 14 fatty acids.

Results: We determined the analyte cutoff values as 99.9 or 0.1 percentiles in 15,000 newborn samples. The total number of samples tested from January 2012 to September 2014 was 119,948; of these, 6,681 were repeated. Of the repeated samples, 713 were presumed to be positive in the screening tests. Repeat screening with newly obtained dried blood spot specimens was recommended for these 713 samples and 600 specimens were obtained. Thus, the recall rate was 0.5% (600/119,948) for all samples and 84.2% (600/713) for the samples presumed to be positive in the screening tests. About 70 samples, that is, 0.06% of the total samples and 11.7% of the "reobtained" samples, again tested positive; we recommended confirmatory tests for these samples.

Conclusions: We have presented data on the status of neonatal screening tests for inherited metabolic disorders using LC-MS/MS, including positive rates and recall rates of screening tests, set up cutoff values and reported the actual status of internal quality controls in a clinical laboratory in Korea.

Key Words: Neonatal screening, Inherited metabolic disorders, Tandem mass spectrometry

서론

선천성 대사이상질환 신생아 선별검사는 증상이 나타나지 않는 신생아 시기에 유전성 대사질환을 조기에 발견함으로써 영유아

Corresponding author: Sung Eun Cho

LabGenomics Clinical Laboratories, B-6F, 700 Daewangpangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam 13488, Korea
Tel: +82-31-628-0729, Fax: +82-31-628-0741, E-mail: secho0824@gmail.com

Received: October 22, 2014

Revision received: April 3, 2015

Accepted: April 9, 2015

This article is available from <http://www.labmedonline.org>

© 2015, Laboratory Medicine Online

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

건강 증진을 도모하고 장애 발생을 예방하기 위한 목적으로 현재 국내에서 태어나는 대부분의 신생아를 대상으로 실시하고 있으며, 검사의 임상적 유용성이 증가되고 있다. 특히, 선천성 대사이상 검사사업은 전국에서 태어나는 모든 신생아를 대상으로 페닐케톤뇨증, 갑상선기능저하증, 단풍당뇨증, 호모시스틴뇨증, 갈락토스혈증 및 선천성부신과형성증 등 6개 질환에 대하여 정부 지원으로 시행하는 검사사업이다[1]. 본 전문 수탁기관에서는 이러한 정부사업에 참여하는 한편, 2012년부터 탠덤 질량분석기(tandem mass spectrometry, MS/MS)를 사용하여 정부 지원 6종에 해당되는 페닐케톤뇨증, 단풍당뇨증, 호모시스틴뇨증을 포함한 총 55종의 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사를 시행하고 있다.

하지만, 건조 혈액여지를 이용하고, 탠덤 질량분석기를 사용한 신생아 선별검사를 실시하는 기관마다 검사 방법이 다양하고, 검사 도입 및 운용 과정이 복잡하며[1], 조산이나 저체중 출생아, 또

는 이환 신생아들의 신체 상태와 이들이 받는 치료 또는 다양한 의료 환경 등이 결과에 영향을 미칠 수 있어서 결과 해석에 주의를 필요로 하는 등[2] 검사 기관에서 고려해야 할 사항들이 많다.

이에 본 연구에서는 본 전문 수탁기관에서 시행해 온 탠덤 질량 분석기를 이용한 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사의 양성 결과 빈도와 소환율, 각각의 질환에 대한 분석 기준치 설정 및 정도 관리 방법 등의 검사 현황을 소개하고자 한다.

대상 및 방법

1. 대상 검체

2012년 1월부터 2014년 9월까지 전국 산부인과 병·의원에서 의뢰된 119,948건의 신생아 건조 혈액여지를 이용하였다. 채혈 시기는 평균 출생 후 4일(출생 후 48시간부터 7일 이내)을 권장하였다. 발 뒤꿈치에 란셋을 사용하여 채취하고, 혈액을 직접 여과지에 묻혀 실온에서 3시간 이상 건조하였다. 이때 아킬레스건을 다치지 않게 하기 위해 중앙 부분을 피하여 채취하도록 하였다. 전체 의뢰건 중 23건은 채혈지 상태가 불량하여 검사에 부적합하여 재검체를 요구하여 검사를 진행하였다. 부적합한 채혈지의 경우는 1) 검체가 희석된 경우, 2) 검체량이 부족하여 앞면의 혈액량이 적어 뒷면까지 충분히 흡수가 안 된 경우, 3) 혈액이 응고되어 채혈지에 혈액이 고르게 흡수되지 않은 경우, 4) 모세관 등 다른 기구를 이용하여 2차로 채혈지에 혈액을 묻힘에 따라 채혈지에 고르게 묻혀지지 않고 뒷면까지 흡수가 안 된 경우였다.

2. 시약 및 기구

내부표준물질(internal standards)로는 12 deuterium-labeled amino acid internal standards (NSK-A) (Cambridge Isotopes Laboratories, MA, USA)와 12 deuterium-labeled acylcarnitine internal standards (NSK-B) (Cambridge Isotope Laboratories, MA, USA)를 사용하였다. Methanol (J.T.Baker, PA, USA), acetonitrile (J.T.Baker, PA, USA), formic acid (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)는 모두 HPLC 등급을 사용하였으며, Round-bottomed 96-well microtiter plates (greiner bio-one, Kremsmunster, Austria)를 사용하였다.

3. 장비

Agilent 1260 Infinity HPLC System (Agilent Technologies, CA, USA)과 AB Sciex Autosampler (AB Sciex, UA, USA)를 이용하여 용매 이동과 MS/MS 시스템으로의 검체 주입을 실시하였고, ~70 $\mu\text{L}/\text{min}$ 의 유속을 유지하였다. MS/MS 시스템으로는 API 2000 (AB Sciex, MA, USA)을 이용하였다.

4. 분석 조건 및 방법

건조 혈액여지로부터 3 mm를 천공하며, 천공된 여지는 96 well microtiter plate의 각 well에 옮겨 놓고, deuterium labeled amino acid internal standards와 deuterium labeled acylcarnitine internal standards를 함유한 메탄올 추출액 100 μL 를 첨가하여 1시간 동안 교반하여 상층액을 running plate에 옮겨 넣어 LC-MS/MS에 장착하였다. 20 μL 의 검체를 autosampler system을 이용, ESI-MS/MS turbo electrospray ion source로 주입하였다. 이동상으로는 0.01% formic acid를 추가한 80% acetonitrile 용액을 이용하였다.

LC-MS/MS는 한 검체당 총 15분 동안 32 cycle을 운영하였다. Positive ion mode로 설정하였으며, m/z 46의 Neutral loss scan mode는 대부분의 아미노산인 proline, histidine, alanine, leucine, glutamic acid, tyrosine, valine, phenylalanine의 분석에 이용하였고, 아미노산 중 methionine, arginine, citrulline, glycine, ornithine, lysine과 모든 아실카르니틴에 대해서는 multiple reaction monitoring (MRM) scan mode를 이용하였다. Declustering potential은 15 V, collision energy는 20 eV로 설정하였다. Target/Internal Standards의 mass (m/z)는 Table 1에 표기하였다.

본 기관에서 선별 대상으로 하는 신생아 선천성 대사이상질환은 55종이고, 이 중 아미노산 질환이 25종, 유기산 질환이 16종, 지방산 대사질환이 14종이었다. 분석 후 MS/MS 데이터는 chemview program (AB Sciex, MA, USA)을 이용하여 농도값으로 전환하였고, 기준치와 비교하여 결과를 보고하였다.

5. Cutoff values 설정 방법

본 기관에서 기준치는 CLSI NBS 04-A (formerly I/LA 32-A) 지침 [3]에 따라 설정하였다. 설정 초기에는 검체 수 3,000검체를 측정하여 99.5 percentile을 기준으로 설정하였고, 결과가 축적됨에 따라 추후에 각 검사실마다의 상황에 따라 양성률 및 회수율 등을 기반으로 재설정해야 하므로, 본 기관에서 기준치는 outlier를 제외한, 15,000 검체 결과를 재분석하여 농도가 감소하는 질환인 C0의 낮은 기준치로는 0.1 percentile을, 그 외 항목은 99.9 percentile을 기준으로 재설정하였다. 본 기준치는 경고 기준치로서 이보다 농도가 높을 경우(C0인 경우 낮은 기준치보다 낮을 경우), 선별 재검검사(repeat screening)를 시행해야 하는 기준이다. 기준치 설정의 적정성을 평가하기 위하여 타 전문 수탁기관의 기준치[4], 국외 기관의 기준치[5] 및 CDC에서 제공한 기준치[6]와도 비교하였고, Health Resources and Services Administration (HRSA) Region 4 MS/MS project의 기준치[7-9]와도 비교하였다. 초기 설정 후 주기적 검증을 위하여 6개월마다 15,000건에 대하여 기준치를 0.1과 99.9 percentile을 기준으로 재설정하며 추적 관찰하였다.

Table 1. Target/internal standard mass (m/z) of parent ions of amino acids and acylcarnitines

	Mass (m/z) of the Target/ Internal Standard
Amino acids	
Phenylalanine	166/172
Leucine+Isoleucine	132/135
Methionine	150/153
Tyrosine	182/188
Valine	118/126
Arginine	175/180
Citrulline	176/178
Alanine	90/94
Glutamic acid	148/151
Glycine	76/78
Ornithine	133/135
Histidine	156/153
Lysine	147/178
Proline	116/135
Acylcarnitines	
Free carnitine (C0)	162/171
Acetylcarnitine (C2)	204/207
Propionylcarnitine (C3)	218/221
Iso-/Butyrylcarnitine (C4)	232/235
Isovaleryl/2-CH ₃ Butyrylcarnitine (C5)	246/255
3-OH-Isovalerylcarnitine (C5OH)	262/255
Glutaryl carnitine (3-OH-C10) (C5DC)	276/291
Hexanoylcarnitine (C6)	260/255
Octanoylcarnitine (C8)	288/291
Decanoylcarnitine (C10)	316/291
Dodecanoylcarnitine (C12)	344/381
Tetradecanoylcarnitine (C14)	372/381
Hexadecanoylcarnitine (C16)	400/403
3-OH-Hexadecanoylcarnitine (C16OH)	416/403
Octadecanoylcarnitine (C18)	428/403
Malonylcarnitine (C3DC)+3-OH-Butyrylcarnitine (C4OH)	248/255
Tiglylcarnitine (C5:1)	244/255
Decenoylcarnitine (C10:1)	314/291
Decadienoylcarnitine (C10:2)	312/291
Tetradecenoylcarnitine (C14:1)	370/381
3-OH-Tetradecenoylcarnitine (C14OH)	388/381
Octadecenoylcarnitine (C18:1)	426/403
3-OH-Octadecenoylcarnitine (C18OH)	444/403
3-OH-Octadecenoylcarnitine (C18:10H)	442/403

6. 내부정도관리

검체 전처리와 분석이 적절히 시행되었는지 확인하기 위하여 정도관리물질의 내부 표준물질(internal standard) 측정 시 최대 이온값(maximum ions)이 1E6 CPS 이상인지 확인하였고, Neutral loss scan에서 deuterium-labeled valine (Val-d8, 126.2 Da), deuterium-labeled leucine (Leu-d3, 135.4 Da), deuterium-labeled phe-

nylalanine (Phe-d6, 172.2 Da)의 이온 강도(intensity)가 2.5E5 CPS 이상인지 또는 예상되는 평균값의 50% 이상인지 확인하였다. 검사 중 MS/MS가 정상적으로 작동되고 있는지는 첫 검체의 Total ion chromatogram (TIC)을 관찰하여 peak의 모양과 시작 및 종료 시간이 적절한지, 이온 강도는 적절한지 관찰하였다.

내부정도관리를 위한 내부정도관리물질로서는 CDC NSQAP 외 부정도관리 참여 시 공급받는 혈액여지와 Chromesystem (Chromesystems Instruments & Chemicals GmbH, Grafelfing, Germany)으로부터 구입한 정도관리물질을 함께 사용하였다. 정도관리물질은 총 24종이며, Leucine+Isoleucine, Methionine, Phenylalanine, Tyrosine, Valine, Arginine, Citrulline, Alanine 항목에 대한 아미노산 정도관리물질과, C0, C2, C3, C4, C5, C5OH, C5DC, C6, C8, C10, C12, C14, C16, C16OH, C18, C3DC+C4OH (약어 풀이는 Table 1을 참조하기 바람) 항목에 대한 아실카르니틴 정도관리물질을 사용하였다. 정도관리물질의 허용범위는 20회 측정값의 평균 ±3 SD로 설정하여 사용하였다. 한 plate에는 blank, 아미노산 정도관리물질 저농도, 중간 농도, 고농도 등 3개 농도와 blank, 아실카르니틴 정도관리물질 저농도, 중간 농도, 고농도 등 3개 농도의 정도관리물질을 각각 1회씩 포함시켜서 수검자 검체와 동일한 방법으로 측정하고, 내부정도관리 결과가 허용범위 내에 있음을 확인한 후에 수검자의 결과를 보고하였다. 내부정도관리상 정도관리물질농도 허용범위를 벗어나는 경우가 불규칙하게 5번 이하인 경우까지는 수용하고, 허용범위를 벗어나는 경우가 6번 이상이거나, 한 종목에서 세 농도가 모두 허용범위를 벗어나는 경우 거부하기로 설정하였다.

정도관리 추적은 Levey-Jennings plot을 관찰, 검토하고 매달 정도관리 통계로서 평균과 표준편차를 산출하여, 변이계수가 20% 이하를 유지하는지 확인하였고, 매달간 평균 이동을 관찰하였다.

이는 CLSI NBS 04-A [3]를 따른 것이다.

결 과

본 기관과 타 기관들의 기준치는 Table 2와 Table 3에 함께 표기하였다. 결과가 측정됨에 따라 추후에 각 검사실마다의 상황에 따라 양성률 및 소환율 등을 기반으로 자체적으로 재설정하고 이를 주기적으로 점검해야 하므로, 본 기관에서는 기준치는 outlier를 제외한, 15,000검체 결과를 재분석하여 농도가 감소하는 질환인 C0의 낮은 기준치로는 0.1 percentile을, 그 외 항목은 99.9 percentile을 기준으로 재설정한 것이며, 이는 CLSI 지침과 비교하였을 때 기준치 설정을 위한 데이터로 충분하였다.

기준치 설정의 적정성을 평가하기 위하여 문헌이나 타 기관에서 제시한 기준치나 CDC에서 제시하는 기준치 등과 비교하는 과정이 필요하므로, 본 기관의 경우 타 전문 수탁기관의 기준치[4], 국

Table 2. Cutoff values for amino acids (μmol/L) extracted from blood spots of newborns

Amino acids	Cutoff values of our laboratory*	Yoon et al. ^{†,‡}	CDC cutoff values [§]	Zytковicz et al.	R4 99 percentile of normal population [¶]
Phenylalanine	99	164**	150	139	97
Leucine+Isoleucine	236	402 ^{††}	300	373 ^{¶¶}	
Methionine	60	87 ^{††}	75	67	44
Tyrosine	270	358 ^{§§}	400	442 ^{§§}	207
Valine	211	438	300		212
Arginine	40	37	70	132 ^{§§}	32
Citrulline	40	75 ^{§§}	55	100 ^{***}	28
Alanine	694				507
Glutamic acid	850				551
Glycine	1,000	752			767
Ornithine	300	182		300 ^{†††}	
Histidine	252				
Lysine	850				
Proline	354				

*99.9 percentile of newborns (n = 15,000); †4 S.D. above the mean; ‡Reference [4], The authors used PE Sciex micro-LC series 200, PE Sciex micro-Pump, and a Model PE Sciex autosampler in 79,719 Korean newborns; §Reference [6]; ¶Reference [5], The authors used a series 1100 Hewlett Packard HPLC pump, a Model 215 Gilson autosampler and Micromass Quattro LC triple-quadrupole tandem mass spectrometer in more than 160,000 newborns in the USA, especially in Massachusetts, Maine, New Hampshire, Vermont, and Rhode Island; ¶Reference [7], cumulative percentiles for amino acids in neonatal dried blood spots analyzed by tandem mass spectrometry by the participants of the Region 4 Stork collaborative project (as of December 1, 2010); **10 S.D. above the mean; ††7 S.D. above the mean; ††8 S.D. above the mean; §§9 S.D. above the mean; |||6 S.D. above the mean; ¶¶5 S.D. above the mean; ***13 S.D. above the mean; †††11 S.D. above the mean.

의 기관의 기준치[5], CDC에서 제공한 기준치[6], Health Resources and Services Administration (HRSA) Region 4 MS/MS project의 기준치[7-9]와 비교하였는데(Tables 2, 3), 본 기관의 높은 기준치가 타 기관 기준치와 비슷하거나 낮은 경향을 보였고, 특히 CDC에서 제시하는 높은 기준치보다는 본 기관의 높은 기준치가 대부분의 항목에서 낮았다. Yoon 등[4]의 보고를 보면 주로 계산된 평균값으로부터 SD (4X-10X)를 더하여 높은 기준치를 설정하였는데, 소환율로 비교해 보면, 본 기관의 소환율은 전체 선별검사 건수 대비 0.5% (600/119,948)이고, Song 등[10]의 보고에서는 0.4%이며, 국내 타 전문 수탁기관은 0.3% [11]이므로, 본 기관의 경우 전체 시행 검사 건수 대비 소환율이 적정한 수준으로 유지되고 있으므로, 이로써 본 기관의 기준치 설정이 적정하다고 평가하였다.

HRSA에서 제시한 정상군의 99 percentile과 질병 범위의 가장 낮은 5 percentile은 모두 102개 참가기관들의 누적(cumulative) percentile이므로, 경우에 따라서는 정상군의 99 percentile보다 질병 범위의 가장 낮은 5 percentile이 더 낮은 경우도 있어서 본 기관의 기준치와의 단순 비교는 어렵지만, 대부분의 항목에서 99 누적 percentile보다는 본 기관의 99.9 percentile이 높고, 질병 범위의 5

Table 3. Cutoff values for acylcarnitines (μmol/L) extracted from blood spots of newborns

Acylcarnitines	Cutoff values of our laboratory*	Yoon et al. ^{†,‡}	CDC cutoff values [§]	Zytковicz et al.	R4 99 percentile of normal population [¶]
C0	<8.20**, >60.00	64.80 (High)	<8.60 (Low)		59.00 (High)
C2	49.56				52.00
C3	7.18	7.20 ^{††}	6.00	8.00 ^{††}	4.74
C4	0.70	1.47 ^{††}	1.30	1.90 ^{¶¶}	0.75
C5	0.47	1.20 ^{§§}	0.70	1.20 ^{§§}	0.39
C5OH	0.60	0.38	0.90	0.80 ^{†††}	0.45 (U)
C5DC	0.30	0.22	0.35	0.21 ^{††}	0.25 (U)
C6	0.15	0.56	0.45		0.18
C8	0.50	0.52	0.45	0.50 ^{§§}	0.21
C10	0.40	0.57 ^{¶¶}	0.45		0.26
C12	0.51	0.32			0.41
C14	0.61	1.05 ^{¶¶}	0.80		0.50
C16	5.57	8.47 ^{***}	7.50	12.00 ^{†††}	6.00
C16OH	0.15	0.08	0.15	0.10 ^{†††}	0.08
C18	2.00	1.66	2.50		1.70
C3DC+C4OH	0.57		0.45		0.33
C5:1	0.20	0.38	0.25	0.08 ^{***}	
C10:1	0.22	0.23	0.30		0.18
C10:2	0.12		0.15		0.08
C14:1	0.40	0.21	0.60	0.90 ^{†††}	0.37
C14OH	0.14				
C18:1	1.81	2.10	3.50		2.50
C18OH	0.08	0.05	0.10		0.06
C18:10H	0.18	0.07			0.07

For abbreviations of analytes, see Table 1.

*99.9 percentile of newborns (n = 15,000); †4 S.D. above the mean; ‡Reference [4], The authors used PE Sciex micro-LC series 200, PE Sciex micro-Pump, and a Model PE Sciex autosampler in 79,719 Korean newborns; §Reference [6]; ¶Reference [5], The authors used 1100 Hewlett Packard HPLC pump, a Model 215 Gilson autosampler, and Micromass Quattro LC triple-quadrupole tandem mass spectrometer in more than 160,000 newborns in the USA, especially in Massachusetts, Maine, New Hampshire, Vermont, and Rhode Island; ¶Reference [7], acylcarnitine cumulative percentiles in neonatal dried blood spots analyzed by tandem mass spectrometry by the participants of the Region 4 Stork collaborative project (as of December 1, 2010); **0.1 percentile of newborns (n = 15,000); ††8 S.D. above the mean; ††17 S.D. above the mean; §§11 S.D. above the mean; |||15 S.D. above the mean; ¶¶10 S.D. above the mean; ***6 S.D. above the mean; †††12 S.D. above the mean; †††7 S.D. above the mean.

Abbreviation: U, underivatized.

누적 percentile보다는 본 기관이 낮은 경향을 보여 본 기관 기준치 설정이 적정하다고 평가하였다.

본 기관에서 내부정도관리를 위해 매일 확인하는 TIC 소견은 모두 적합하였고, 항상 내부정도관리가 적합함을 확인한 후에 수검자 결과를 보고하였다. 다만, Arginine 내부정도관리물질이 세 농도 모두 허용범위에서 벗어나서 거부되어 재검을 실시한 경우가 1예 있었다. 매달 산출하는 정도관리 통계상 변이계수가 20%를 벗어난 경우는 없었다.

Table 4. Positive cases of neonatal screening tests for inherited metabolic disorders that require confirmatory tests

Increased analytes		Suspected disorders or false positive cases	Number of cases	Range of concentrations (median) (μmol/L)
Amino acid disorders	Phenylalanine	R/O Phenylketonuria	4	120-184 (155)
	Tyrosine	R/O Tyrosinemia	7	320-509 (397)
	Leucine+Isoleucine	R/O Maple syrup urine disease	1	740
	Citrulline	R/O Citrullinemia	6	45-62 (53)
	Ornithine	R/O Hyperornithinemia	15	325-429 (354)
	Arginine	R/O Argininemia	1	54
Organic acidurias	C3	R/O Propionic acidemia	1	10.92
	C5	R/O Isovaleric acidemia or R/O 2-Methylbutyryl CoA dehydrogenase deficiency or R/O 2-Methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency	21	0.57-4.00 (0.91)
	C5OH	R/O 3-OH-3 Methylglutaryl CoA lyase deficiency or R/O 3-Methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency or R/O 3-Methylglutaconyl CoA hydratase deficiency	7	0.74-15.78 (1.92)
Fatty acid metabolic disorders	C0	R/O Carnitine palmitoyl transferase type I deficiency	1	77.65
	C4	R/O Short chain acyl CoA dehydrogenase deficiency	3	0.73-2.34 (1.22)
	C10:1	R/O Medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency	1	0.47
	C14OH	R/O Long chain hydroxy acyl CoA dehydrogenase deficiency	1	0.15
	C10:2	R/O 2,4-Dienoyl CoA reductase deficiency	1	0.34
Total number of cases			70	

For abbreviations of analytes, see Table 1.

2012년 1월부터 2014년 9월까지 의뢰된 검사 건수는 총 119,948 건이고, 그중 6,681건에서 처음 의뢰된 검체를 이용하여 재검을 시행하였고 이는 총 검사 건수의 5.6% (6,681/119,948)에 해당되었다. 6,681건 중 재검 후에도 여전히 양성 소견을 보이는 713건에 대하여 재채혈을 요구하였고, 그중 600건에서 재채혈 검체를 의뢰받아 소환율은 전체 의뢰 건수 중 0.5% (600/119,948)였고, 선별 재검검사를 위한 재채혈 검체 요구 건수 중 84.2% (600/713)에 해당하였다. 재채혈 요구 건수 중 84.2%만 재채혈 검체를 다시 의뢰하였는데, 재채혈 미실시건의 경우, 주치의가 자체 판단하여 검사를 종료하거나 신생아의 보호자가 재검을 거부하는 경우들이었고, 연락 체계상의 문제로 검사가 누락되는 경우는 아니었다. 재채혈 검체 600건 중 70건에서 여전히 양성 소견을 보여, 확진검사를 의뢰하도록 통보하였고, 이는 전체 검사 의뢰 건수 119,948건 중 0.06%, 재채혈 검체로 실시한 선별 재검검사 건수 600건 중 11.7%에 해당하였다. 선별 재검검사에서도 양성 소견을 보일 때 의심되는 질환에 해당하는 성분들은 Table 4에 명기하였다.

본 기관에서 선별 재검검사에서도 양성을 보인 질환들은 이전 국내 타 기관에서 보고된 질환들과도 비슷한 추세를 보이며[4, 10, 11], 아시아 다른 나라들에서 보고한 질환들과도 비슷한 양상을 보였다[12, 13]. 하지만, 본 기관에서는 선별 재검검사상 양성을 보인 질환들 중 특히 Ornithine이 증가되어 고오르니틴혈증(Hyperornithinemia)이 의심되는 경우와 Isovalerylcarnitine (C5)이 증가되어 이소발레린산혈증(Isovaleric acidemia)이나 2-메틸부티릴 CoA 탈수소효소(2-Methylbutyryl-CoA dehydrogenase) 결핍증 또는 2-

메틸 3-히드록시부티릴-CoA 탈수소효소(2-methyl 3-OH butyryl-CoA dehydrogenase) 결핍증이 의심되는 경우의 빈도가 높았다.

고찰

전 세계적으로 해마다 1천만 명 이상의 신생아가 선천성 대사이상 및 유전질환에 대한 선별검사를 받고 있다. 현재 대부분의 신생아 선별검사 기관에서 분석 기기로는 탠덤 질량분석기를 선택하고 있으며, 방법에 따라 60가지 이상의 물질까지 분석 가능한 것으로 소개되고 있다[3]. 2006년에는 American College of Medical Genetics (ACMG)에서 29종의 핵심 질환(core disorder, core condition)과 25종의 2차 대상(secondary target, secondary condition)을 분류하여 선별질환의 패널을 제시하였다[14].

국내에서도 1990년대 초부터 탠덤 질량분석기를 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사에 적용함으로써 이 분야에 있어서 획기적인 발전의 전환점이 되었고[11], 현재 국내에서는 13기관에서 탠덤 질량분석기를 이용하여 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사를 실시하고 있다. 2013년도 국내 출생아 수는 436,600명이었고, 이 중 정부지원 선천성 대사이상질환 검사 시행 건수는 429,759건(98.4%)이며, 특히, phenylalanine, leucine, methionine 3항목은 13기관 모두 탠덤 질량분석기로 분석, 보고하였다. 이뿐만 아니라, 현재 정부 지원 6종 외 별도의 산모 자비부담이면서, 탠덤 질량분석기를 이용한 수십 종의 질환에 대한 신생아 선별검사도 전국 출생아의 80% 이상에서 시행되고 있다고 한다[1].

본 기관에서 실시한 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사의 시행 건수는 2년 8개월간 119,948건이므로, 이는 동 기간 동안 전국에서 탠덤 질량분석기로 실시한 산모 자비부담 신생아 선별검사 시행 건수의 약 12%에 해당된다.

본 기관에서 기준치는 CLSI NBS 04-A (formerly I/LA 32-A) 지침 [3]에 따라 설정한 것인데, CLSI 지침에 의하면, 설정 시 높은 기준치인 경우에는 계산된 평균값으로부터 SD (3X-6X)를 더하고, 낮은 기준치인 경우에는 계산된 평균값으로부터 SD (3X-6X)를 뺀 값으로 정할 수도 있지만, percentile로 구하는 것이 더 적당하다고 하였다. 이때 가장 전형적으로 사용되는 기준치는 검사실 상황에 따라 직접 측정된 수백 또는 수천 건의 정상 검체를 이용하여 99.5% 주변(around 99.5%)의 percentile을 이용하여 설정한 기준치이다. 또 다른 기준치 설정 방법으로는 질병으로 확진된 경우들에서 구해진 “질병 범위(disease range)”를 이용하는 것이다. 정상군의 99 percentile과 질병 범위의 가장 낮은 5 percentile 사이를 경고 기준으로 설정하는 방법이다.

본 기관에서 총 검사 건수 119,948건 중 처음 의뢰된 검체를 이용한 재검 건수가 6,681건으로서 재검률이 5.6%로 높은 이유는 처음 검사 시작 시 기준치 설정 초기에는 검체 수 3,000 검체를 측정하여 99.5 percentile을 기준으로 재검 건수가 많도록 설정하였고, 결과가 축적됨에 따라 15,000 검체 결과를 재분석하여 농도가 감소하는 질환인 C0의 낮은 기준치로는 0.1 percentile을, 그 외 항목은 99.9 percentile을 기준으로 재설정하면서 재검 건수를 점차적으로 감소시켰기 때문이다.

본 기관에서는 선별 재검검사상 양성을 보인 질환들 중 특히 빈도가 높았던 질환인 고오르니틴혈증은 ornithine carbamoyltransferase (OTC) 효소 결핍이나 ornithine aminotransferase 효소 결핍 등에 의해 발생하고, 특히 OTC 효소 결핍에 의한 고오르니틴혈증이 요소회로 대사 질환 중 가장 흔한 질환이며, 약 14,000명 당 1명의 발병빈도가 보고되어 있고, 신생아에서 조기 진단 및 치료가 요구되는 질환이다[15]. 하지만, 본 기관의 기준치가 타 기관과 비슷하면서, 고오르니틴혈증 의심 환자에서 오르니틴의 농도는 기준치보다 약간 높으면서, 시트룰린의 농도가 감소하지 않았으므로, 본 기관의 결과는 위양성 가능성이 높을 것으로 추정된다.

C5가 증가된 경우, 타 기관에서 이소발레린산혈증으로 확진된 두 예에서 C5의 농도는 각각 19.9 $\mu\text{mol/L}$ 와 6.49 $\mu\text{mol/L}$ 로 매우 높았던 반면[4], 본 기관에서 선별 재검검사상 양성을 보인 대부분의 경우 3배를 제외하고는 모두 기준치보다 1.5-2배 증가된 농도를 보였고, 특히 C5의 경우 비경구적 영양법이나 항생제 치료를 받는 신생아에서 위양성을 보일 수 있다고 보고되어 있어[2], 본 기관의 결과 중 대부분은 위양성 가능성이 높을 것으로 추정된다.

처음 선별검사상 양성 결과 또는 유효하지 않은 결과일 경우, 새

로운 검체로 선별 재검검사를 실시해야 하고, 다시 양성 결과일 경우에는 정밀검사를 포함한 확진검사를 요청해야 한다. 원칙적으로 확진검사를 요청한 신생아에 대하여 확진검사 실시 여부를 포함하여 확진검사 결과 등을 신생아 선별검사 기관에서는 추적 조사할 수 있어야 한다. 이에 더하여 CLSI 지침은 선천성 대사이상질환으로 진단받은 환아가 추후 적절한 치료 및 관리를 받고 있는지를 포함한 장기간 추적이 필요하다고 주장한다[16]. 그러나, 본 기관과 같은 전문 수탁기관의 경우 선별 재검검사 양성자에 대한 확진검사를 위한 재검체 확보가 어렵고, 선별 재검검사 양성자가 타 병원에서 확진검사를 시행받은 경우 추후 결과 추적이 어려워 확진검사 결과를 확인할 수 없는 실정으므로, 국가 지원 6종 선별검사 양성자부터라도 국가에서 추적관리시스템을 도입, 운영하는 것이 효율적이라 생각한다.

국내에서 선천성 대사이상질환이 확진검사를 통해 진단되고, 증례로 보고된 경우는 이소발레린산혈증[17], 페닐케톤뇨증[18], 타이로신혈증[19], 중쇄 아실 CoA 탈수소효소 결핍증[20], 단풍당뇨증[21], OTC 효소 결핍으로 인한 고암모니아혈증[22], 시트룰린혈증[23] 등 다양하다. 하지만, 이들의 경우 본 기관과 같은 전문 수탁 기관에서 선별검사서 이상을 보여 추적된 경우가 아니고, 선별검사 결과와는 별개로, 상급 종합 병원에 내원 시 확진검사를 진행하거나, 상급 종합 병원에서 출생하여 해당 병원에서 선별검사와 확진검사가 진행된 경우가 대부분이었다.

최근에는 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사서 선별질환 결정 기준 등에 있어서도 환자 보호자나, 부모의 권리, 지역 사회의 가치, 국가나 의료제공자들의 의무 및 윤리적 측면까지 총체적으로 고려해야 한다고 제안하는 등 본 검사의 임상적 유용성에 대한 사회적 관심도가 지속적으로 증가하는 추세이므로[24], 본 기관의 확진검사를 위한 추적 노력도 지속적으로 필요할 것이다.

본 연구에서 저자들은 그동안 본 기관에서 시행해 온 탠덤 질량 분석기를 이용한 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사의 양성 결과 빈도와 소환율, 각각의 질환에 대한 기준치 설정 방법과 내부정도관리 등의 검사 현황을 소개하였다. 본 연구는 국내에서 탠덤 질량분석기를 이용한 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사 관련 연구로는 가장 최근의 자료이며, 소환율 측면에서 과거의 타 전문 수탁기관의 연구들과 유사한 결과를 보인 것에 임상적인 의미가 있다고 생각한다.

요 약

배경: 램지노믹스 검사센터는 2012년 1월부터 탠덤 질량분석기를 이용하여 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사를 시행해 오고 있다. 이에 본 연구에서는 본 전문 수탁기관에서 시행해 온 탠덤

질량분석기를 이용한 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사의 양성 결과 빈도와 소환율, 각각의 질환에 대한 기준치 설정 및 정도관리 방법 등의 검사 현황을 소개하고자 한다.

방법: 본 기관에서 액체 크로마토그래피 기기로 Agilent 1260 Infinity HPLC System (Agilent Technologies, USA), MS/MS system으로는 API 2000 (AB Sciex, Canada)을 사용하였다. 본 기관에서 선별하는 질환은 55종이고, 이 중 아미노산 질환이 25종, 유기산 질환이 16종, 지방산 대사질환이 14종이다.

결과: 본 기관에서는 신생아 검체 15,000건을 대상으로 99.9 또는 0.1 percentile을 기준치로 설정하였다. 2012년 1월부터 2014년 9월까지 의뢰된 검사 건수는 총 119,948건이고, 그중 6,681건에서 처음 의뢰된 검체를 이용하여 재검을 시행하였다. 6,681건 중 재검 후에도 여전히 양성 소견을 보이는 713건에 대하여 재채혈을 요구하였고, 그중 600건에서 재채혈 검체를 의뢰받아 소환율은 전체 의뢰 건수 중 0.5% (600/119,948)였고, 선별 재검검사를 위한 재채혈 검체 요구 건수 중 84.2% (600/713)에 해당하였다. 재채혈 검체 600건 중 70건에서 여전히 선별검사 결과 양성 소견을 보여, 확진검사를 의뢰하도록 통보하였고, 이는 전체 검사 의뢰 건수 119,948건 중 0.06%, 재채혈 검체로 실시한 선별 재검검사 건수 600건 중 11.7%에 해당하였다.

결론: 본 연구에서는 본 전문 수탁기관에서 시행해 온 탠덤 질량분석기를 이용한 선천성 대사이상질환 신생아 선별검사의 양성 결과 빈도와 소환율, 각각의 질환에 대한 기준치 설정 및 정도관리 방법 등의 검사 현황을 소개하였다.

이해관계: 저자들은 본 연구와 관련하여 해당 회사와 이해관계가 없음.

REFERENCES

1. 보건복지부와 인구보건복지협회. 2013년도 선천성대사이상검사 채혈지 통계분석 및 외부정도관리, 현장실사 분석보고.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Newborn screening for preterm, low birth weight, and sick newborns; approved guideline. CLSI document NBS03-A (Replaces I/LA 31-P). Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Newborn screening by tandem mass spectrometry; approved guideline. CLSI document NBS04-A (formerly I/LA32-A). Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010.
4. Yoon HR, Lee KR, Kang S, Lee DH, Yoo HW, Min WK, et al. Screening of newborns and high-risk group of children for inborn metabolic disorders using tandem mass spectrometry in South Korea: a three-year report. *Clin Chim Acta* 2005;354:167-80.
5. Zytovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 2001;47:1945-55.
6. CDC cutoffs. Newborn screening quality assurance program. Quarterly Report Tandem Mass Spectrometry 2014 quarter 4. <https://wwwn.cdc.gov/NSQAP/Restricted/CDCCutOffs.aspx>.
7. McHugh D, Cameron CA, Abdenu J, Abdulrahman M, Adair O, Al Nuaimi SA, et al. Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: a worldwide collaborative project. *Genet Med* 2011;13:230-54.
8. Marquardt G, Currier R, McHugh DM, Gavrillov D, Magera MJ, Matern D, et al. Enhanced interpretation of newborn screening results without analyte cutoff values. *Genet Med* 2012;14:6548-55.
9. <http://www.clir-r4s.org/Default.aspx>.
10. Song SM, Yoon HR, Lee AN, Lee KR. Seven-year experience with inherited metabolic disorders screening by tandem mass spectrometry. *J Genet Med* 2008;5:21-5.
11. Lee EH. Tandem Mass Spectrometry를 이용한 선천성 대사이상 질환 선별검사: 2년 경험을 통한 효용성평가 및 향후 전망. *J Genet Med* 2003;3:94-6.
12. Yu CL and Gu XF. Newborn screening of inherited metabolic diseases by tandem mass spectrometry. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2006;38:103-6.
13. Niu DM, Chien YH, Chiang CC, Ho HC, Hwu WL, Kao SM, et al. Nationwide survey of extended newborn screening by tandem mass spectrometry in Taiwan. *J Inherit Metab Dis* 2010;33:S295-305.
14. Levy PA. An overview of newborn screening. *J Dev Behav Pediatr* 2010;31:622-31.
15. Brusilow SW and Maestri NE. Urea cycle disorders: diagnosis, pathophysiology, and therapy. *Adv Pediatr* 1996;43:127-70.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. Newborn screening follow-up; approved guideline. CLSI document NBS02-A2 (replaces I/LA 27-A). Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013.
17. Lee YW, Lee DH, Vockley J, Kim ND, Lee YK, Ki CS. Different spectrum of mutations of isovaleryl-CoA dehydrogenase (IVD) gene in Korean patients with isovaleric acidemia. *Mol Genet Metab* 2007;92:71-7.
18. Lee YW, Lee DH, Kim ND, Lee ST, Ahn JY, Choi TY, et al. Mutation analysis of PAH gene and characterization of a recurrent deletion mutation in Korean patients with phenylketonuria. *Exp Mol Med* 2008;40:533-40.

19. Park HD, Lee DH, Choi TY, Lee YK, Kim JW, Ki CS, et al. Clinical, biochemical, and genetic analysis of a Korean neonate with hereditary tyrosinemia type 1. *Clin Chem Lab Med* 2009;47:930-3.
20. Woo HI, Park HD, Lee YW, Lee DH, Ki CS, Lee SY, et al. Clinical, biochemical and genetic analyses in two Korean patients with medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Korean J Lab Med* 2011;31:54-60.
21. Park HD, Lee DH, Hong YH, Kang DH, Lee YK, Song J, et al. Three Korean patients with maple syrup urine disease: four novel mutations in the BCKDHA gene. *Ann Clin Lab Sci* 2011;41:167-73.
22. Kim HJ, Park SJ, Park KI, Lee JS, Eun HS, Kim JH, et al. Acute treatment of hyperammonemia by continuous renal replacement therapy in a newborn patient with ornithine transcarbamylase deficiency. *Korean J Pediatr* 2011;54:425-8.
23. Woo HI, Ki CS, Lee SY, Kim JW, Song J, Jin DK, et al. Mutation spectrum of the ASS1 gene in Korean patients with citrullinemia type 1. *Clin Biochem* 2013;46:209-13.
24. Forman J, Coyle F, Levy-Fisch J, Roberts P, Terry S, Legge M. Screening criteria: the need to deal with new developments and ethical issues in newborn metabolic screening. *J Community Genet* 2013;4:59-67.