PCR 진단키트의 성능평가를 위한 가이드라인 개발

Development of Guidelines for Performance Evaluation of PCR kits

문진산*, 강경묵, 서태영, 강환구

Jin-San Moon*, Kyoung-Mook Kang, Tae-Young Suh, Hwan-Goo Kang

농림축산검역본부 동물약품관리과

Veterinary Pharmaceutical Management Division, Animal and Plant Quarantine Agency

Ⅰ. 서론

최근 전 세계적으로 사람 및 동물에서 질병의 조기 진단 및 예방이 중요하게 되면서 진단시장에 대한 관심이 증가되고 있다. 또한, IT, BT, NT 기술의 발달로 인하여 성능이 향상된 체외진단시약이 개발되어 신속, 정확한 진단이 가능하게 됨에 따라 점차적으로 동물의 건강이나 질병 진단을 위해 체외진단시약의 활용이 많아지고 있다(16). 이러한 추세를 반영하듯 2018년 12월 31일 기준으로 동물용 체외진단시약 제조업체 38개, 수입업체 46개 등 84개 업체에서 동물 감염성 및 비감염성 질병 진단에 사용되는 다양한 유형의 762개 제품이 농림축산검역본부에 동물용 의료기기로서 신고 또는 허가를 받았다(1).

이러한 제품 중 소, 돼지, 닭, 오리 등의 산업 동물수의 증가와 지속적인 축산물 소비량 증가에 의하여 인수공통 전염병, 설사병 및 호흡기 질환 등 소모성 질병의 진단시약을 포함하여 생산성 향상을 위한 다양한 동물 감염성 질병 진단시약의 활용이 더욱 확대되고 있다(7-9,16). 또한, 지구온난화에 따른 기후 및 환경변화는 모기, 진드기, 파리 등 곤충의 생태 환경 변화와 국가 간의 이동 증가로 원충 및 바이러스성 곤충 매개 신종질병 발생 빈도가 증가하여 질병의 모니터링과 현장 검사용 신속진단키트 시장이 주목 받고 있다(22). 특히, 최근에 One health 개념의 확산으로 식중독을 포함하여 인수공통전염병의 조기 진단은 공중보건학적으로 더욱 중요해 지고 있다(17,22). 농장 및 축산식품 생산 현장에서 사용되는 여러 가지 진단시약 중 분자진단기술이 발전하고, 유전자 검사가 민감도가 가장 높고 신속한 진단법으로 알려지면서 최근에 산업현장에서 PCR 진단의 활용도가 더욱 높아지고 있는 실정이다.

축산 야외 현장에서 이러한 진단 키트의 사용을 위해서는 동물용 체외진단시약으로 인허가를 받아야 하며, 인허가의 중심에는 기술문서를 포함하여 정확하고 신뢰성 높은 성능평가 자료가 제출되어져야 한다(4,5,18). 진단키

* Corresponding author: Jin-San Moon
Veterinary Pharmaceutical Management Division, Animal and Plant Quarantine Agency 177 hyeoksin 8-ro, Gimcheon-si, Gyeongsangbuk-do 39660, Korea.
Tel.: +82-54-912-0536 Fax: +82-54-912-0530 E-mail: moonjs727@korea.kr.

표 1. 체외진단시약의 성능평가 시험항목 및 미국 CLSI 관련 규정

구 분	시험항목		관련 규정(참고문헌)
분석적 성능시험	민감도	최소검출 한계	CLSI EP17-A (Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantification)(14)
		판정 기준치	CLSI GP10-A (Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Test Using Receiver Operating Characteristic(ROC) Plat(10)
	특이도 (간섭, 교차반응)		CLSI EP7-A2 (Interference Testing in Clinical Chemistry)(13)
	정밀도 (반복성, 재현성)		CLSI EP5-A2 (Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods)(11)
임상적 성능시험	상관성		CLSI EP12-A2 (User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance)(15)

트의 성능평가에는 여러 가지가 있지만 일반적으로 가장 중요한 항목은 진단민감도와 특이도와 기존 검사와의 일치율이라 할 수 있다. 성능평가에 있어서 검체 수 산정을 포함한 적절한 시험방법 설계는 진단키트의 올바른 평가를 위해 매우 중요하다. 불충분한 검체 수는 성능평가를 정확하게 할 수 없으며, 과다한 검체 수는 비용-효율성이 떨어지는 문제를 초래하게 된다. 일반적으로 검체 수 산정을 위해서는 검사원리 및 검사방법, 질병 유병율, 검사목적 및 중요도, 진단 민감도와 특이도, 유의수준, 검정력, 비교 방법 등 제품 및 질병의 특성을 고려해야 한다(11,12,14,15).

국내에서는 동물용 체외진단시약에 대한 질병별 또는 품목별 세부적인 지침(가이드라인)이 없다보니 유사한 제품임에도 불구하고 제조사별로 상이한 성능시험 시험항목 및 방법 등을 적용하고 있어서 인허가 및 품질관리에 있어서 어려움이 있는 실정이다. 그리하여 농림축산검역본부에서는 민원인의 편의성 제공 및 심사의 객관성 확보를 위하여 〈표 1〉에서와 같이 미국의 임상검사표준연구소(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 문서 및 세계동물보건기구(OIE)에서 발표한 국제 규정(23,24), 국내 식품의약품안전처(19-21)와 농림축산검역본부에서 발행된 인허가 가이드라인(2), 기 허가된 제품의 심사 자료에 기초하여 동물 질병의 특성 및 사용 환경을 고려하여 동물용 체외진단시약의 성능 및 안정성시험에 관한 일반적인 가이드라인을 마련하였다. 이와 함께 동물 감염성 면역화학검사시약(Rapid 및 ELISA kit) 및 유전검사용 시약(PCR kit)과 종양표지자 면역검사시약 등 5종에 대한 동물 비감염성 체외진단시약에 대한 품목별 가이드라인과 예시자료를 제시하였다(3). 그 후 전문가 협의회 및 관계자 설명회 등을 통하여 다양한 의견을 수렴한 다음 최종 가이드라인이 2019년 1월에 발간되었다. 이에 본 논단에서는 가이드라인 중 동물 감염성 질병 진단을 위한 PCR 진단키트의 분석적 및 임상적 성능시험에 대한 평가항목 및 일반 원칙에 대해서 소개하고자 한다.

II. 본론

1. 분석적 성능시험

분석적 성능시험의 일반원칙은 국내외 가이드라인의 시험방법에 따라 수행할 수 있고, 시험기준은 식품의약품안전처(19-21) 또는 국외 가이드라인(CLSI 가이드라인 등)을 준용(10-15)하여 제품의 특성에 맞게 타당하게 설정하여야 한다. 분석적 성능을 평가하기 위한 검체수와 실험결과는 질병별 특성과 검사의 목적, 유병률, 제품의 분석능력 등을 고려하여 통계학적으로 해석이 가능한 수준에서 산정하여 해당 제품별 특성에 따라 성능을 평가한다. 성능시험에 사용되는 시험물질(양성 및 음성 컨트롤, 검

체 등), 시험방법에 대해서는 정확한 출처와 정보 등이 포함된 세부내용을 기재하여야 되고, 성능시험 결과의 유효성 판정에서 양성, 위양성 또는 음성 판정 기준 값을 정한 근거를 제시해야 한다. 분석적 성능시험에 대한 시험방법과 결과는 미국 CLSI 가이드라인 등 국제적으로 공인 시험법에 따라 권장기준에 적합하여야 한다.

가. 분석적 민감도

1) 최소검출한계 (Limit of detection)

① 일반사항

표준물질 또는 국제표준품, 상용패널 등 특성이 명시되어 있는 물질을 이용하여 측정할 것을 권장하며 표준물질을 구할 수 없는 항목이나 아형의 경우에는 국내 · 외 허가된 체외진단분석기용 시약과의 비교시험 성적서를 첨부하여야 한다. 일반적으로 95% 검출률을 보이는 최저 핵산 농도를 최소검출한계로 설정하는 것을 원칙으로 하며, 일관되게 검출되는 최소 농도 값으로 설정할 수 있다. 유전자형 검사제품의 경우, 가장 유병률이 높고 문제가(허가를 받기 위해 해당되는 제품에 한하여) 되는 유전자형 및 아형에 대해서 최소검출한계를 설정한다.

② 시험물질

시험에 사용한 양성 및 음성 시료와 사용된 장비 및 시약에 대한 정보를 제시한다. 희석시에는 제조사에서 제시한 검체종류로 음성검체를 이용할 것을 권장하며, 대상 표준물질을 연속 희석시에는 추정되는 검출한계 전후의 농도 값을 포함하여 음성 검체를 최소 5단계 이상 희석하여 사용하고 측정 가능한 검체의 종류별 시험 결과를 제시하여야 한다. 혈장을 사용하고자 하는 경우에는 제조사가 사용 가능한 것으로 표기한 모든 종류의 항응고제에 대해 최소 50개(양성 25개, 음성 25개)이상의 검체를 이용하여 성능을 확인하여야 한다. 검체로는 제조사에서 제시한 검체와 호환(commutable)되는 표준균주를 첨가한 검체, 바이러스 표준균주 배양 상층액, PCR 검사인 경우 plasmid, 제조사에서 제시한 검체 종류로 음성검체(공란 한계 측정용) 등을 이용할 수 있다.

③ 시험방법

시험에 사용되는 검체종류(혈청, 혈장, 전혈 등)와 검체 준비과정(기질, 검체의 수, 측정횟수, 검체농도, 농도를 확인한 방법 등)에 대한 실험방법을 제시하여야 한다. 시험방법은 참고한 부분에 한해서 문헌 기호를 인용하여 실험방법을 요약 제출할 수 있다. 사용가능 한 것으로 제시된 검체가 여러 종류라면 검체별(혈액, 뇨 등)로 최소검출농도를 산출하여야 한다.

측정범위는 단계적으로 희석하여(serial dilution) 여러 단계 희석한 농도의 검체를 수회 반복하여 측정하며 일반적으로 95% 검출률을 보이는 최저 농도를 최소검출한계로 확정하고, 이를 위해 3~5일간 2~3회 반복적으로 평가하는 것이 권장된다. 바이러스 유전학적 검사법인 경우 분석하려는 각 형별과 아형을 대표하는 strain을 포함하여 국제표준품, 표준패널, 또는 제조사의 품질관리용 기준물질 등을 연속 희석한다. 바이러스 배양이 어려운 경우는 핵산 정량으로 바이러스 RNA 농도를 확인하여야 한다.

④ 결과제시

정량검사의 경우 직선성의 범위(측정범위)를 제시하고, 정성검사의 경우 양성/음성 판정기준치의 설정 배경을 제시하고, 경계범위가 있을 경우에는 이를 설정한 근거를 제시해야 한다. 통계적으로 유효한 검출 한계치와 설정에 사용된 검체의 종류, 검체수, 반복횟수, 계산법을 함께 제시한다. 최소검출한계는 검사시행 중 95%이상 양성 결과를 나타내는 최소 농도(검출한계)가 제시되어져야 한다. Real-time PCR 제품의 경우에는 장비별 실험(사용 장비간 동질성 시험) 결과를 제출하여야 한다.

2) 판정기준치 (Cut off value)

① 일반사항

양성(반응성), 음성(비반응성) 및 경계 값을 결정하는

판정기준치를 결정하는데 사용되는 검체는 다른 방법이나 임상적 기준에 의해 정의된 검체를 이용하여야 한다. 정성검사에서는 배경한계 또는 검출한계로 대신할 수 있으나 검증자료를 제시하여야 한다. 측정항목, 측정원리, 판독방법 등에 따라 판정기준치의 설정방법이 달라질 수 있으므로 전문가 그룹의 자문 등을 거칠 것을 권장한다. 질병의 진단이 목적이 아니라, 양성 축의 모니터링 등을 목적으로 하는 정량검사에서는 정량검사 자료를 대체로 평가하여야 한다.

판정기준치가 검출한계의 산출을 근거로 설정된 경우, 결과분포 및 설정방법을 제시하여 타당성을 입증하여야 한다. 판정기준치는 공란한계의 산출을 근거로 설정된 경우, 결과분포 및 설정방법을 제시하여 타당성을 입증하여야 한다. 분자유전 제품에 대한 판정기준치는 실시간중합효소연쇄반응(Real-time PCR)에서 Ct값으로 설정하여야 한다. 검사과정에서 판정기준치를 산정하는 방법을 명시한다. 경계범위가 있을 경우에 이를 설정한 근거를 제시하여야 한다.

② 결과제시

경계범위(gray zone 또는 equivocal zone)가 있을 경우, 이를 설정한 근거를 제시하여야 한다. 판정기준치의 설정이 임상적 민감도 및 특이도를 바탕으로 한 경우 타당한 임상적 근거를 제시한다.

3) 유전형 · 아형별 검출 · 정량 효율

① 일반사항

평가 가능한 검체 또는 표준물질을 확보할 수 있는 범위 내에서 각 유전형 및 아형의 검출, 정량 효율을 평가하고 결과를 제시하여야 한다. 평가 가능한 검체 또는 표준물질을 확보할 수 없는 유전형 및 아형에 대해서는 프라이머 · 프로브의 디자인이 각 유전형 및 아형을 검출할 수 있도록 고안되었음을 제시할 수 있어야 한다. 검출한계에서 유전형 및 아형별 검출, 정량 효율을 평가한 경우에는 그 자료로 대체할 수 있다.

② 시험물질

시험물질의 정성 및 정량 검사는 시험물질 subtype별 10개 이상의 양성 검체의 결과를 제시할 것을 권장한다. 시험물질의 참고물질을 유전자형별로 확보가 가능할 시 이것을 이용하여 결과를 제시하거나 확보된 양성 검체의 결과를 제시할 것을 권장한다.

③ 결과제시

평가된 각 유전형, 아형 및 정량에 대한 결과를 제시한다. 검출률 또는 정량의 효율면에서 차이를 보이는 유전형, 아형이 존재하면 이를 명시해야 한다.

나. 분석적 특이도

1) 간섭반응 (Interference)

① 일반사항

간섭반응을 일으킬 수 있는 물질에 대하여 시험한 뒤 결과를 제시하고, 이를 주의사항에 반드시 기록하여야 한다. 간섭반응은 검체의 유형, 측정항목, 측정원리, 처리시약 등에 따라 다양하므로 해당 검사의 잠재적 간섭물질 등 시험결과에 영향을 줄 수 있는 인자에 대해 검토하고 자료를 제시하여야 한다.

간섭물질은 검체 내부 또는 외부요인 일 수 있고, 측정법에 따라 다양하므로 간섭물질의 가능성이 있는 모든 물질의 목록을 제시하고 자료를 제공한다. 검체 처치에 첨가된 물질, 검체에 포함될 수 있는 물질 등 흔히 사용되는 약물을 포함하도록 한다. 혈장 및 전혈이 검체로 사용되는 경우 EDTA, heparin, sodium citrate 등 항응고제에 대한 간섭반응 자료를 제시하여야 한다.

② 시험물질

측정 대상이 되는 검체와 호환되는 기질의 검체를 이용한다. 측정하고자 하는 바이러스의 핵산이 검출한계보다 약간 높은 농도를 보이는 검체를 확보하거나, 음성의 검체에 spiking하여 사용하며, 간섭물질을 spiking하거나 임상검체 중 간섭물질의 농도가 높은 검체를 이용한다. 각

분석물질에 대한 간섭물질의 영향을 평가하기 위해 3가지 형태의 세트(분석물질 양성검체(간섭물질 없음), 분석물질 양성검체+간섭물질, 분석물질 약한 양성 검체+간섭물질)를 준비해야 한다.

③ 시험방법

검체의 종류, 간섭물질의 종류, 간섭물질의 농도, 분석물질의 농도, 검체의 제조방법 등에 대한 시험방법을 제공하여야 하며, 검사대상 물질의 농도는 최소검출한계 근처로 한다. 각 검체를 3회 이상 반복 검사 할 것을 권장한다. 간섭물질을 함유한 검체와 간섭물질을 함유하지 않은 검체의 결과를 비교한다. 정량검사의 경우는 바이어스(Bias)를 구한다. 분석물질(해당 바이러스 핵산)이 음성이고, 간섭물질을 포함한 검체도 검사하여 위양성 결과를 보이는지 확인한다. 높은 농도의 간섭물질에 영향을 받지 않는 경우 더 이상의 평가를 시행하지 않아도 되고, 영향을 받는 경우는 간섭물질의 농도에 따른 영향을 보기 위해 용량-반응검사(Dose-response test)를 실시해야 한다.

④ 결과제시

간섭물질을 함유한 검체와 간섭물질을 함유하지 않은 검체의 결과 값을 제시하고, 정량검사의 경우는 결과를 비교하여 바이어스가 있는지 확인하고 두 값의 차이가 허용범위(dmax) 보다 작은지 판단한다. 간섭이 확인된 물질의 경우 간섭을 보이는 구체적 농도와 결과 차이를 기술하여야 한다. 대상측정물질을 함유하지 않고 간섭 가능한 물질만 포함된 검체의 실측한 자료를 바탕으로 공란한계와 검출한계를 넘지 않는 결과를 보인 최대간섭물질농도를 제시하여야 한다. 간섭물질에 대한 분석물질 결과, 간섭이 확인된 경우 이를 주의사항에 기록함을 권장한다.

2) 교차반응 (Cross-reactivity)

① 일반사항

세균, 바이러스 등 미생물의 유전자를 검출하는 제품은 해당 유전자 증폭 검사의 표적과 관련성 있는 유전자 또는 미생물 대상 검사의 경우 유사한 증상을 일으키는 다른 미생물 등과의 교차반응성 평가를 권장한다. 각 검체별로 존재가능성이 높은 유전자 및 미생물에 대하여 평가한다. 검사항목이 유전자형인 검사의 경우는 다른 유전자형과의 교차반응 평가에 대한 자료를 제공해야 한다.

② 시험물질

교차반응을 일으킬 수 있는 핵산을 포함하는 임상검체를 이용하여 교차반응성을 평가하며, 임상적으로 나타날 수 있는 고농도를 사용할 것을 권장한다. 평가되어야 할 핵산은 유사한 임상 증상을 일으키는 원인체, 유전학적으로 유사한 원인체, 검사하고자 하는 검체의 상재균을 대표하는 미생물이 포함되어야 한다. 각 해당 항목에 대해 양성검체를 확보할 것을 권장하나, 검체 확보가 어려울 경우, 음성 혈청에 바이러스를 spiking하여 사용할 수 있다.

③ 시험방법

교차반응 물질의 종류, 교차반응 물질의 농도, 검체종류, 비교검체, 분석물질의 농도 및 결과 등에 대한 시험방법을 제공하여야 한다. 교차반응 평가를 위해 준비된 검체는 최소 3회 이상 반복 검사하기를 권장한다.

④ 결과제시

교차반응 평가에 사용된 양성물질의 종류, 농도, 측정한 실측치(Raw data)를 제시해야 한다. 교차반응을 보이는 물질의 종류, 빈도, 특이도 및 95% 신뢰범위를 제시해야 한다.

다. 정밀도 (Precision)

정밀도는 동일 검체를 일정기간 동안 반복 측정한 결과를 분석한 것으로서 〈표 2〉에서와 같이 반복성과 재현성 자료가 제시되어져야 한다. 반복성은 단일 기관에서 3개 이상의 다른 로트 별 제품에 대해서 시험을 실시해야 하며, 재현성은 2개 이상의 임상기관에서 실시하여 정밀도

를 평가해야 한다. 복수의 핵산 추출법이 적용되는 경우에는 각각에 대해서 검증할 것을 권장한다. 다만, 복수의 감염체 그룹 즉, 그람양성균, 그람음성균, 진균, RNA 바이러스, DNA 바이러스를 동시에 검출하는 제품의 경우, 각 그룹별 대표 감염 원인체를 설정하여 평가할 수 있다. 정밀도 시험에 대한 시험방법 및 결과는 CLSI 가이드라인 등 국제적으로 공인된 시험법에 따라 권장기준에 적합하여야 한다.

① 시험물질

정밀도 시험(반복성, 재현성 시험)의 경우 측정하고자 하는 물질을 포함하는 임상검체나, 표준품에 준한 물질을 사용할 수 있다. 정량검사의 경우 측정범위의 저, 중, 고농도 값, 정성검사의 경우 음성, 양성, 판정기준치 주변값의 검체를 모두 포함하도록 한다. 제품 내에 포함된 정도관리물질을 이용한 평가를 포함하는 것을 권장한다. 핵산추출 시약이 포함되지 않은 PCR 검사 키트인 경우에 표준균주 대신 plasmid 등 이용이 가능하다.

② 시험방법

반복성 시험의 경우 시행기관은 검사특성에 맞추어 일정기간 동안 매일 반복 측정하는 계획을 수립하여 시행한다. 검체의 종류, 검체 수, 측정방법, 측정횟수 등에 대한 시험방법을 제시하여야 한다. 각 검체를 2~3일 간격으로 1일 1회 이상, 회당 2회 이상 반복 측정, 최소 10일 이상 권장하고 있다.

재현성 시험의 경우 검사 장소(기관)간, 장비 간, 검사자 간, 로트간 재현성 자료를 제시하여야 한다. 장소 간 정밀도를 위해 두 군데 이상의 기관(제조사 포함)에서 평가한다. 2인 이상의 검사자, 최소 5일 이상, 1일 1회 이상, 회당 2회 이상 반복 검사를 시행할 것을 권장하고 있다. 여러 추출법이 적용되는 경우 다양한 추출법이 평가에 포함되도록 계획을 수립하여야 한다.

③ 결과제시

반복성 시험의 경우 검사 내(Within-run), 검사 간(Between-run), 날짜 간(Between-day), 로트 간(Between-lot), 검사실 내(Within-laboratory) 자료, 재현성 시험의 경우 검사 장소(기관)간, 장비 간, 검사자 간, 로트 간 재현성 자료를 제시하여야 한다. 정성검사의 경우는 검체별 결과 일치율을 %로 제시하여야 한다. 정량검사 또는 정량적 결과 값(S/CO ratio, Ct값 등)을 제시하는 정성검사인 경우 평균, 표준편차, CV(%) 등으로 결과를 제시한다. 결과설명서는 평가에 포함된 장소의 수, 수행일수, 수행 횟수, 장비 수, 검사자 수, 보정간격의 수, 보정물질 및 시약의 로트 개수에 대한 언급을 포함해야 한다.

2. 임상적 성능시험 (임상적 민감도, 임상적 특이도)

임상적 성능은 임상적 민감도와 임상적 특이도를 근간으로 하며, 임상적 민감도와 임상적 특이도를 평가하기 위해 사용된 질병 또는 특정 상태를 진단한 표준검사방법

표 2. 정밀도 시험의 종류 및 실험방법

구분	실험 종류	시험방법
반복성 (기관 내 정밀도)	검사 내 (Within-run) 검사 간 (Between-run) 날짜 간 (Between-day) 로트 간 (Between-lot) 검사실 내 (Within-laboratory)	단일기관에서 1인 이상이 제조사의 실험방법에 따라서 3개의 다른 로트별 제품에 대해서 최소 10일 이상, 2~3일 간격으로 매일 1회 이상, 회당 2회 이상 반복 검사하는 것을 권장한다.
재현성 (검사기관 간 정밀도)	검사 장소(기관)간 장비 간 검사자 간 로트 간	2곳 이상의 검사기관(제조사 포함)에서 2인 이상의 검사자가 제조사의 실험방법에 따라 최소 3개 로트 이상, 최소 5일 이상, 매일 1회 이상, 회당 2회 이상 반복 검사하는 것을 권장한다.

(Reference standard)이 기술되어야 한다. 질병 또는 특정 상태를 진단하는 표준검사방법이 비실용적이거나 유용하지 않을 경우에 다른 검사법으로 대체할 수 있으며 이러한 경우에 관련 근거 자료를 제출하여야 한다. 질병을 확증할만한 표준검사방법이 없으며 임상 증상으로 확진이 어려운 경우에는 임상적 민감도 및 임상적 특이도 대신 기존 검사법과의 상관성(총 일치율, 양성 일치율, 음성 일치율)과 각각의 95% 신뢰구간으로 대신할 수 있다. 기허가 제품과 측정원리 및 사용목적이 동등한 경우에 시판되고 있는 상용화된 표준물질이 있다면 본질적 동등품목 비교표를 작성하여 임상적 성능시험자료를 제출하지 않아도 된다. 상용화된 표준물질이 없는 경우에는 표준검사방법(기허가 제품 포함)과 비교시험자료를 제출하여야 한다.

제품의 사용목적이 진단이 아니라 진단보조, 예후판정, 추적검사, 치료반응 또는 반응예측, 생리적 상태판단 등 효과판정 등에 사용되는 경우 임상적 민감도와 임상적 특이도를 제시할 수 없을 때에는 다른 진단법 또는 검사법과의 일치율, 정확도가 알려진 다른 방법으로의 확인결과, 다른 임상적 지표와의 일치율, 환축군별 측정결과의 분포양상 등의 분석 자료를 제시할 수 있다. 판정기준치의 설정이 임상적 판정기준치(민감도, 특이도)를 바탕으로 한 경우에 타당한 임상적 근거를 제시하여야 한다. 임상적 성능시험에 대한 시험방법 및 결과는 미국 CLSI 가이드라인 등 국제적으로 공인된 시험법에 따라 권장기준에 적합하여야 한다.

① 시험물질

다양한 농도를 포함한 양성 및 음성 임상검체와 상용화된 검체 패널을 이용하여 평가한다. 해당 제품의 적용이 가능한 권장하는 검체 유형(전혈, 혈청, 혈장(항응고제의 종류), 소변 등)별로 평가하며, 시험 대상은 적용하고자 하는 질병에 대한 환축집단을 반영하여야 한다. 임상검체에 있어서 음성 또는 양성임을 확인하는 검사방법에 따라 결과의 통계학적 분석이 달라질 수 있기 때문에 임상검체인 경우 기허가 진단제품 또는 확진검사방법 등을 확인하였음을 기술한 자료나 음성임을 확인 가능한 서류 등 양성과 음성임을 확인한 방법을 자료로 제출해야 한다.

신선한 검체(병리학적인 경우 고정검체 또는 파라핀 포맷된 조직검체 등 포함)를 이용할 것을 권장하지만, 유병률이 너무 낮아서 충분한 수의 신선한 검체를 확보하기 어려운 경우에는 냉동 검체의 안정성이 보장된다면 보관검체를 사용할 수 있다. 임상적 성능시험을 위해 일반적으로 사용되는 검체는 임상적 성능시험을 위해 별도로 수집된 검체, 일상적인 진단 검사나 다른 연구목적으로 수집되었다가 사용하고 남은 잔여검체와 과거에 수집되어 유전자은행 등을 통해 얻을 수 있는 보관검체이어야 한다. 이 중에서 임상적 성능시험의 목적에 적합한 검체를 선택하여 사용해야 한다. 검체의 완전성을 뒷받침하기 위해서 검체의 특성은 가능하면 출처 등을 구체적으로 기술해야 한다. 검사의 목적, 유병률, 제품의 분석 등에 따라 통계학적으로 해석이 가능한 충분한 검체수를 산정하여 평가한다. 검체 수 결정방법의 예로써 세계동물보건기구(OIE)에서 권고한 지침(23,24) 등을 참고할 수 있다. 유병률은 국내에 발표되는 유병률에 대한 자료나 웹페이지 등을 참고하도록 하였다.

농림축산검역본부에서는 동물 감염병 체외진단시약 중 〈표 3〉에서와 같이 구제역, 돼지열병 등 세계동물보건기구(OIE)에서 정한 동물의 전염병(고위험도 동물 전염병)과 인수공통전염병의 진단을 위하여 감염원, 항원, 항체 또는 기타 유래물질 및 유전자를 검출하는데 사용되는 시약을 3등급으로, 나머지 질병을 저위험도 동물 전염병 진단시약으로 분류하고 이를 2등급으로 「동물용의료기기 범위 및 지정 등에 관한 규정」에서 정하고 있다(6).

이를 토대로 하여 임상적 민감도의 경우 일반적으로 저위험도 동물 전염병 진단시약 등 2등급 제품은 양성 50개, 고위험도 동물전염병 및 인수공통전염병 진단시약 등 3, 4등급의 제품은 최소한 양성검체에 있어서 그 이상의 검체수가 권장된다.

임상적 특이도의 경우 일반적으로 저위험도 동물 전염병 진단시약 등 2등급 제품은 음성 50개, 고위험도 동물

표 3. 동물 전염성 질병의 등급 분류 및 예시

구분 (품목명)		등급	예시
인수공통전염병 진단을 위한 유전검사용 체외진단시약		3	결핵, 브루셀라, 탄저, 렙토스피라, 비저, 유비저, 돼지단독, 세균성 이질, 장출혈성대장균, 페스트, 야토병, 여시니아증, 리스테리아증 등
동물 감염병 진단을 위한 유전검사용 체외진단시약	OIE-listed disease	3	구제역, 우역, 우폐역, 소바이러스성설사병, 아프리카돼지열병, 돼지생식기호흡기증후군, 돼지전염병위장염 등
	Non OIE-listed disease	2	기종저, 소이바라기, 유방염, 소부제병, 로타바이러스성 설사병, 돼지부종병, 조류대장균증, 오리패혈증 등

표 4. 국내 동물 감염성 질병의 임상적 성능평가 가이드라인 주요 내용

구분	성능평가 지침 주요 내용	비고
임상적 민감도	– 저위험도 동물 감염성 질병 진단시약 (Non OIE-listed disease) 등 2등급 제품은 양성 50개, 고위험도 동물 감염성 질병(OIE-listed disease) 및 인수공통전염병 진단시약 등 3등급 제품은 최소한 양성검체에 있어서 그 이상의 검체수가 권장됨 – 가능한 신선한 검체를 이용하여야 하며, 확진된 보관검체로 검사할 경우도 최소 5일 이상 검체를 나누어서 검사 – 가능한 2개 이상의 검사실에서 수행	임상적 민감도 및 특이도 평가를 위한 검체 숫자는 동물 질병 특성 및 국내에서의 사용 환경 등을 고려하여 설정함
임상적 특이도	– 저위험도 동물 감염성 질병 진단시약 (Non OIE-listed disease) 등 2등급 제품은 음성 50개, 고위험도 동물 감염성 질병(OIE-listed disease) 및 인수공통전염병 진단시약 등 3,4등급의 제품은 최소한 양성검체에 있어서 그 이상의 검체수가 권장됨 – 진단의 목표가 질환에 따라 고위험도 감염성 질병(OIE-listed disease)으로 분류된 경우에 음성 검체 수는 100개 이상이 권장됨	

전염병 및 인수공통전염병 진단시약 등 3, 4등급의 제품은 최소한 음성검체에 있어서 그 이상의 검체수가 권장된다〈표 4〉. 다만, 조류인플루엔자 및 구제역 등 국가방역에 막대한 영향을 주는 질병의 경우 민감도 평가를 위해서는 양성 50개 이상, 특이도 평가를 위해서는 음성 100개 이상의 검체수가 권장되며, 진단의 목표가 되는 질환이 고위험도 감염성 질병으로 분류 된 경우에 민감도 평가를 위한 양성검체 사용에 대해서는 검역본부 관련 부서와 논의할 것을 권장하고 있다.

② 시험방법

검체 종류와 수, 유전자형 및 아형별 수, 시험 상 주의사항, 통계분석법 등에 대한 자세한 실험방법을 제공해야 한다. 가능한 전향적으로 신선한 검체를 이용할 것을 권장하지만, 과거에 확진된 보관검체로도 실험할 수도 있으며, 보관검체로 검사할 경우도 최소 5일 이상 검체를 나누어서 검사한다. 임상시험 장소는 가능한 2개 이상의 독립된 검사실에서 검사를 시행 할 것을 권장하고 있다. 다만, BL3에서 다루어지는 고위험도 전염성 항원 진단법의 경우 독립된 검사실 확보에 어려움이 있으므로 예외로 한다. 평가 전에 결과 해석에 대한 알고리즘 및 불일치한 경우 추가검사 등의 원인 분석 방법을 미리 확립하고 이를 명시한다. 또한, 감염에 합당한 증상을 가진 집단이나 새로운 시약으로 검사를 시행할 집단에서의 유병률을 평가할 것을 권장하고 있다.

③ 결과제시

임상적 성능시험의 결과는 임상적 민감도 및 특이도,

95% 신뢰구간 등을 제시하여야 하며, 전체 결과 및 특이한 결과, 구별되는 소견이 있는 세부 집단별 결과 등이 있을시 그 결과를 제시하여야 한다. 유병률을 구한 경우는 유병률도 제시하여야 한다. 불일치한 검체가 있을시 원인을 분석한 자료를 제출하고 해석을 제시한다. 전향적으로 목표하는 검체 수가 될 때까지 모든 양성 및 음성 검체를 수집하였을 경우에 유병률, 양성예측도, 음성 예측도를 구할 수 있으므로 임상적 민감도, 임상적 특이도와 함께 유병률, 양성예측도, 음성 예측도를 제시해야 한다.

3. 상관성

① 일반사항

국내 또는 외국에서 허가된 체외진단분석기용 시약(유사제품)과의 상관성을 확인할 수 있는 비교시험 성적서를 포함하여야 한다. 다만, 측정원리 및 측정항목이 새로운 경우 동일 목적으로 사용되는 제품과 비교 할 수 있다. 임상적 민감도와 임상적 특이도를 산출하기 위해 시행한 검사에서 기존 검사법(기허가 제품)을 병행하여 검사하였을 경우, 도출된 두 검사 결과를 정리하여 상관성의 자료로 제시할 수 있다. 질병 진단에 있어서 확증할만한 참고검사법이 없으며 임상증상으로도 확진이 어려운 경우에는 임상적 민감도와 임상적 특이도 자료 대신 상관성 자료를 제출할 수 있다.

② 시험물질

다양한 역가의 표준물질과 통계적으로 해석 가능한 임상검체수를 포함하여 비교시험을 수행한다. 임상검체는 기 허가된 방법이거나 여타 검증된 방법으로 검사되어 검체의 이력 등이 밝혀진 검체를 사용할 것을 권장하고 있다. 정성검사의 경우 다양한 임상을 포함하는 검체를 포함하여 비교하도록 한다. 정량검사의 경우는 측정범위 내의 다양한 농도가 포함되도록 하고, 상관성을 평가할 경우 최소 40개 이상을 권장한다. 다만, 검체의 목적, 유병률과 제품의 분석능력에 따라 통계적으로 의미 있는 검체수가 다르므로 검사의 목적, 유병률과 제품의 분석능력에 따라 통계적으로 의미 있는 검체 수를 산정한다.

③ 시험방법

해당 제품과 측정 원리 및 항목이 가장 유사한 국내 허가 제품 또는 외국 허가 제품(국내 허가 제품이 없을 시)과의 비교시험을 실시한다. 가능한 2개 이상의 회사 제품과 비교 시험 할 것을 권장하며 비교 제품은 각 제품의 사용방법에 따라서 시험한다. 정량검사의 경우 각 검사를 2회 이상 반복 수행 할 것을 권장하고 있다. 결과가 불일치하는 경우, 다른 검사를 통해 불일치의 원인을 분석하고 이에 대한 자료를 제공하여야 한다. 불일치의 원인을 분석할 때는 가능한 확진방법(염기서열검사 등)과 비교한다.

④ 결과제시

평가 결과는 참고하고자 하는 유전검사시약으로부터 얻은 결과와 평가하고자 하는 유전검사시약으로부터 얻은 검사결과를 비교하여 도출하여야 한다. 상관성 시험결과는 〈표 5〉와 같이 기록표를 이용하여 표기하고, 각 검사항목의 총 일치율, 양성 일치율, 음성 일치율을 구한다. 또한, 전체 결과 및 특이 환축 그룹이 있다면 그룹별 결과를 제시한다. 정량검사에 대해서는 기울기, 절편(신뢰구간과 함께), 상관계수 및 의학적 결정치에서의 바이어스(Bias)를 제시한다. 정성 또는 반정량검사에 대해서는 양성과 음성검체에 대한 비교검사와의 % 일치도를 제시하여야(신

표 5. 상관성 시험 기록표

구 분		타사제품 (참고검사, 대조군)		합 계
		양성	음성	
자사제품 (평가검사, 시험군)	양성	a	b	a+b
	음성	c	d	c+d
합 계		a+c	b+d	N(a+b+c+d)

※ 총 일치율 = (a+d)×100 / N
※ 양성 일치율 = a/(a+c) × 100
※ 음성 일치율 = d/(b+d) × 100

뢰구간과 함께)한다. 결과가 불일치하는 경우에는 불일치의 원인분석에 대한 자료를 제출해야 한다.

Ⅲ. 결론

안전하고 고품질의 축산물 생산을 위해서는 동물 감염성 질병 관리가 선행되어져야 한다. 이를 위해서는 조기에 질병을 진단할 수 있는 체외진단용 장비 및 시약들이 적절하게 개발되고 현장에서 널리 활용되어져야 할 것이다. 이를 위하여 농림축산검역본부에서는 국내외 관련 규정 및 지침과 기허가 된 제품의 심사 자료에 기초하여 동물 질병의 특성 및 사용 환경 등 국내 실정을 반영하여 동물 감염성 질병 진단을 위한 PCR 진단키트의 분석적 및 임상적 성능 평가 시에 포함되어야 할 일반원칙 및 시험물질, 시험방법, 결과 제시 등 세부적인 가이드라인을 제시하였다. 이러한 가이드라인 개발을 통하여 인허가에 있어서 투명한 심사 · 평가 체계를 구축함으로써 제품 개발 및 허가 · 심사 시, 그리고 품질관리에 있어서 적정성을 기할 수 있어서 관련 산업계의 발전을 지원할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 신뢰성 있는 성능평가 자료 제공을 통하여 해외 허가 촉진 등을 통한 국가 경쟁력 제고와 더불어 축산 현장에서 유용하게 활용되어 공중보건 향상에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

참고 문헌

1. Animal and Plant Quarantine Agency(KR). Current status of approval and products registration of veterinary medical devices in 2018. http://www.qia.go.kr /viewwebQiaCom.co?id=46342&type=2_22lylyy (Jan.3.2019.).
2. Animal and Plant Quarantine Agency(KR). Guideline for approval and evaluation, clinical test report(June. 2017).
3. Animal and Plant Quarantine Agency(Kr). Guideline for the performance and stability evaluation of in vitro diagnostic veterinary medical reagents. http://www.qia.go.kr/viewwebQiaCom.co ?id=46407 &type=2_22lylyy (Jan.15.2019.).
4. Animal and Plant Quarantine Agency(KR). Regulations on the approval of veterinary medical devices, Notice 2015-20 (Aug. 21. 2015).
5. Animal and Plant Quarantine Agency(KR). Regulations on the evaluation of technical documents for veterinary medical devices, Notice 2015-35 (Nov. 24. 2015).
6. Animal and Plant Quarantine Agency(KR). Regulations on the scope and designation of veterinary medical devices, Notice 2017-20 (Apr.3.2017).
7. An HJ, Kim CH, Kwon YJ, Kim DH, Wee SH, Moon JS. Radiation safety management for diagnostic radiation generators and employee in animal hospitals in Korea. Korean J Vet Res, 54(3) : 151-157, 2014.
8. An HJ, Kim CH, Yoon HJ, Wee SH, Moon JS. Performance evaluation of registration and sale of veterinary medical devices in Korea. J Vet Clin, 32(1): 85-90, 2015.
9. An HJ, Yoon HJ, Kim CH, Wee SH, Moon JS. Performance assessment and improvement plan of the regulatory management system of veterinary medical devices in Korea. Korean J Vet Res, 55(2) : 97-103, 2015.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute(US). Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Test Using Receiver Operating Characteristic(ROC) Plat; Approved Guideline - First edition. CLSI GP 10-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 1995.
11. Clinical and Laboratory Standards Institute(US). Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline - Second Edition. CLSI EP5-A2. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2004.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute(US). Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. CLSI EP6-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2003.

13. Clinical and Laboratory Standards Institute(US). Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline – Second Edition. CLSI EP7-A2. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2005.

14. Clinical and Laboratory Standards Institute(US). Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantification; Approved Guideline. CLSI EP 17-A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standard Institute; 2012.

15. Clinical and Laboratory Standards Institute(US). User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline – Second Edition. CLSI EP 12-A2. Wayne PA: Clinical and laboratory Standard Institute; 2008.

16. Kang KM, Kang MH, Suh TY, Kang HG and Moon JS. Trends of market and approval management system for in vitro diagnostic veterinary medical reagents in Korea. J Vet Clin; 2018; 35(4): 119-125.

17. Lee WK, Kim SY, Kim JH, Ahn YW, Kim HJ, Woo SM, Jeong HK, Oh HJ. A study on the approval of in vitro diagnostic products as medical devices. Regulatory Research on Food, Drug and Cosmetic. 2015, 10, 75-82.

18. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs(KR). The enforcement rules for the control of veterinary drugs, etc, Notice 346 (Dec. 24. 2018).

19. Ministry of Food and Drug Safety(KR). Guideline for approval and evaluation of clinical performance of in vitro diagnostic medical reagents (Nov. 2014).

20. Ministry of Food and Drug Safety(KR). Guideline for approval and evaluation of high risk virus diagnostic reagents(genetic testing)(May. 2012).

21. Ministry of Food and Drug Safety(KR). Guideline for approval and evaluation of in vitro diagnostic medical reagents using multiple amplification (July. 2017).

22. Moon JS, Kang KM, Suh TY, Kang HG. Trends of the market and approval management system of in vitro diagnostic veterinary medical reagents for zoonosis disease in Korea. Safe Food. Vol.13, No.4, 2018.

23. World Organization for Animal Health, Recommendations for validation of diagnostic tests. OIE section 3.6, OIE Validation Guideline; 2014.

24. World Organization for Animal Health, Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. OIE chapter 1.1.6., OIE Terrestrial Manual; 2013.