

# *therascreen*<sup>®</sup> KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침(안내서)

체외 진단용

처방전 전용

Rotor-Gene<sup>®</sup> Q MDx (US) 기기와 함께 사용

QIAamp<sup>®</sup> DSP DNA FFPE Tissue Kit 와 함께 사용

버전 1

**IVD**

**REF**

870021



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 독일

R14

**MAT**

1132967KO



# 목차

용도.....	7
요약 및 설명.....	8
절차의 원리.....	10
플랫폼 및 소프트웨어.....	12
실행 매개변수.....	12
시약.....	13
제공 품목.....	16
키트 내용물.....	16
필요하지만 제공되지 않는 품목.....	17
경고 및 사전 주의 사항.....	19
경고.....	19
사전 주의 사항.....	19
시약 보관 및 취급.....	21
시료 취급 및 보관.....	23
시료 취급.....	23
결장직장암 조직의 DNA 추출을 위한 조직 시료 준비.....	23
비소세포폐암 조직의 DNA 추출을 위한 조직 시료 준비.....	24
시료 보관.....	24
프로토콜: DNA 추출.....	25
결장직장암 검체를 위한 DNA 추출.....	25
비소세포폐암 검체를 위한 DNA 추출.....	26
프로토콜: DNA 검체 평가.....	28

시작 전 중요 사항.....	28
시작하기 전에 해야 할 일.....	29
프로토콜: KRAS 돌연변이 검출.....	40
시작 전 중요 사항.....	40
시작하기 전에 해야 할 일.....	40
절차.....	41
결과 해석.....	52
분석 및 돌연변이 판정.....	52
Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> KRAS Assay Package 플래그.....	54
비소세포폐암 및 결장직장암 모두에 관련된 플래그.....	54
비소세포폐암 전용 플래그.....	56
결장직장암 전용 플래그.....	58
문제 해결 가이드.....	60
정도 관리.....	61
금기 사항.....	61
제한 사항.....	61
결장직장암 시료의 성능 특징.....	63
분석 성능.....	63
컷오프.....	63
공백 한계.....	63
분석 표준 방법과의 비교.....	64
검출 한계(Limit of Detection, LOD).....	69
투입 DNA 의 영향.....	74
DNA 투입의 함수인 선형성/증폭 효율.....	75

돌연변이 비율에 따른 선형성/증폭 효율.....	77
간섭 물질.....	79
교차 오염.....	80
배타성/교차 반응성.....	81
비특이적 증폭/교차 반응: 야생형 KRAS DNA.....	81
비특이적 증폭/교차 반응/배타성: 돌연변이 양성 KRAS DNA.....	82
반복성 및 재현성.....	83
검체 처리 변동성.....	85
로트 상호 교환성.....	87
비소세포폐암 시료의 성능 특징.....	88
분석 성능.....	88
검출 한계(Limit of Detection, LOD).....	88
세포 상관 관계 연구.....	88
분석 표준 방법과의 비교.....	90
검체 획득의 등가성.....	91
반복성 및 재현성.....	93
분석 정확도(임상 검체 사용).....	105
비특이적 증폭.....	107
투입 DNA 의 영향.....	107
비특이적 증폭/교차 반응/배타성: 돌연변이 양성 KRAS DNA.....	109
검체 처리 변동성.....	110
로트 상호 교환성.....	111
FFPE 절편의 안정성.....	112
간섭 물질.....	112

보호대역 연구 .....	114
임상적 성능 .....	116
Erbix(세특시맵)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구 .....	116
Vectibix(파니투무맵)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구 .....	118
LUMAKRAS™(소토라십)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구 .....	122
Krazati®(아다그라시브)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구 .....	123
참고 문헌 .....	125
기호 .....	128
부록: Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> KRAS Assay Package 의 설치 .....	130
주문 정보 .....	133
문서 개정 이력 .....	135

# 용도

therascreen® KRAS RGQ PCR Kit 는 포르말린 고정 파라핀 포매(Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded, FFPE) 결장직장암(Colorectal Cancer, CRC) 조직 및 비소세포폐암(Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) 조직에서 추출한 DNA 를 사용하여 인간 KRAS 종양 유전자에서 일곱 가지의 체세포 돌연변이를 검출하기 위해 Rotor-Gene Q MDx 기기에서 사용되는 실시간 정성적 PCR 분석입니다. 이 검사는 승인된 치료 제품 라벨에 따라 표 1 에 나열된 표적 치료제로 치료할 수 있는 환자를 식별하기 위한 동반 진단용입니다.

표 1. 동반 진단 적응증

적응증	생체표지자	요법
결장직장암(CRC)	KRAS 야생형(코돈 12 및 13 에 돌연변이 없음)	Erbix®(세특시맵) Vectibix®(파니투무맵)
비소세포폐암(NSCLC)	KRAS G12C	LUMAKRAS™(소토라삼) Krazati®(아다그라시브)

## 요약 및 설명

KRAS 종양 유전자 내 돌연변이는 사람의 암에서 자주 발견됩니다(1~3). 이런 돌연변이의 존재는 전이성 결장직장암(Metastatic Colorectal Cancer, mCRC) 환자에게서의 특정한 EGFR 억제제 암 치료법에 대한 반응 부족과 관련이 있습니다(4, 5~13). KRAS 종양 유전자의 이런 돌연변이는 전이성 결장직장암 사례의 약 40%에서 발견됩니다(14).

KRAS G12C 돌연변이는 특히 아미노산 위치 12의 글리신 잔류물을 시스테인 잔류물로 대체하는 형태의 K-Ras 단백질이 발현되는 것을 초래합니다. 이는 비소세포폐암 환자에서 표적 K-Ras 억제제 LUMAKRAS™(소토라십)를 사용한 치료에 대한 잠재적 적격성을 나타냅니다. 이 돌연변이는 약 13%의 비소세포폐암 사례에 나타날 것으로 추정됩니다(15).

Scorpions®(16)와 ARMS(AAllele Refractory Mutation System) 기술(17, 18)을 사용하여 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit는 야생형 유전체 DNA(표 2)의 배경에서 KRAS 종양 유전자의 코돈 12 및 13의 일곱 가지 돌연변이를 검출할 수 있습니다. COSMIC 데이터베이스(2012 v59)의 데이터에 따르면, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 검출된 일곱 가지 돌연변이는 결장직장암 환자에서 보고된 모든 KRAS 돌연변이의 97%를 넘습니다(19).



**표 2. 돌연변이 및 COSMIC ID 목록\***

돌연변이]	염기 변화	COSMIC ID
GLY12ALA(G12A)	GGT>GCT	522
GLY12ASP(G12D)	GGT>GAT	521
GLY12ARG(G12R)	GGT>CGT	518
GLY12CYS(G12C)	GGT>TGT	516
GLY12SER(G12S)	GGT>AGT	517
GLY12VAL(G12V)	GGT>GTT	520
GLY13ASP(G13D)	GGC>GAC	532

\* COSMIC ID 는 Catalog of Somatic Mutations in Cancer([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic))에서 가져온 것입니다.

# 절차의 원리

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 여덟 가지의 개별적 PCR 증폭 반응(KRAS 종양 유전자의 엑손 2 의 코돈 12 및 13 의 일곱 가지 돌연변이 특이적 반응과 엑손 4 의 한 가지의 야생형 대조물질)을 제공합니다. 아래는 키트 주요 구성품에 대한 설명입니다.

## 돌연변이 반응 혼합물

각 돌연변이 특이적 반응 혼합물은 돌연변이 특이적 증폭 불응 돌연변이 시스템(Amplification Refractory Mutation System, ARMS) 프라이머를 사용하여 돌연변이 된 DNA 를 선택적으로 증폭시킨 후 *Scorpions* 프라이머를 사용하여 증폭 생성물을 검출합니다.

## ARMS

대립 유전자 특이적 증폭은 *Taq* DNA 중합효소가 PCR 프라이머의 3' 말단에서 일치 염기와 불일치 염기를 구별하는 능력을 이용하는 ARMS 에 의해 이루어집니다. 프라이머가 완전히 일치할 경우 최상의 효율로 증폭이 진행됩니다. 3' 염기가 일치하지 않으면 낮은 수준의 배경 증폭만 발생할 수 있습니다. 그러므로 돌연변이 된 염기 서열은 대다수의 DNA 가 돌연변이를 갖고 있지 않은 검체에서도 선택적으로 증폭됩니다.

## Scorpions

증폭의 검출은 *Scorpions* 를 사용하여 수행됩니다. *Scorpions* 는 공유 결합으로 프로브에 연결되는 PCR 프라이머를 포함하는 이작용기 분자들입니다. 이 프로브는 형광단 카르복시플루오레세인(FAM™)과 소광제를 포함하고 있습니다. 후자는 형광단의 형광도를 감소시킵니다. PCR 중에 프로브가 ARMS 앰플리콘과 결합하면 형광단과 소광제가 분리되어 형광도가 검출 가능한 수준으로 증가합니다.

## 대조 반응

대조 반응 혼합물(튜브 CTRL)은 Scorpions 프라이머와 비표지 프라이머를 사용하여 KRAS 유전자의 엑손 4 의 짧은 서열을 증폭시킵니다. 대조 반응은 적절한 수준의 증폭 가능한 DNA 가 검체에 존재하는지를 결정하는 데 사용되며, 돌연변이 상태를 결정하는 데 사용되는 분석적 계산에 사용되는 요소입니다.

## 내부 대조물질

8 개의 반응 혼합물 각각은 반응의 실패(0% 억제제의 존재로 인한 반응 실패)를 검출할 수 있도록 설계된 내부 대조물질을 포함합니다. 내부 대조물질은 비 KRAS 관련 올리고뉴클레오타이드 표적 서열, 비표지 프라이머 그리고 헥사클로로플루오레세인 (HEX™)으로 표지된 Scorpions 프라이머를 사용하여 대조 및 돌연변이 반응에서 FAM 표지 Scorpions 와 구별합니다.

## 양성 대조물질

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 KRAS 양성 대조물질(튜브 PC)도 포함하고 있습니다. 양성 대조물질은 키트에 의해 검출되는 각 돌연변이를 나타내는 합성 올리고뉴클레오타이드의 혼합물입니다. 양성 대조물질의 검출은 키트의 각 반응 혼합물의 적절한 기능 여부를 확인해 줍니다.

## 음성 대조물질

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에는 "템플릿 없는 대조물질" 반응을 위해 사용되는 템플릿 없는 대조물질을 위한 탈핵산분해효소수(튜브 NTC)가 들어 있습니다. 템플릿 없는 대조물질은 음성 대조물질로 사용되며, 분석 설정 중의 잠재적인 오염을 평가합니다.

## Taq DNA 중합효소

Taq DNA 중합효소는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에서 사용하는 중합효소 연쇄 반응을 위한 효소입니다.

## 플랫폼 및 소프트웨어

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 에서 다운로드할 수 있는 *therascreen* KRAS Assay Package 가 설치된 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기와 함께 사용하도록 특별히 고안되었습니다.

- 호환되는 RGQ 소프트웨어와 *therascreen* KRAS Assay Package 버전에 관해서는 17 페이지의 "필요하지만 제공되지 않는 품목"을 참고하십시오.
- 기기에 관한 사항은 기기 사용 설명서를 참고하십시오.
- 대조물질 및 검체에 대한 플래그를 최소화하려면 설치 절차와 현장 요건에 따라 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기 배치와 관련하여 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침을 엄격하게 준수해야 합니다.
- "부록: Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 의 설치 설치"(130 페이지)에서 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 설치 지침을 참고하십시오.

Rotor-Gene Q MDx (US) 기기를 기기 사용 설명서에 나와 있는 요건에 따라 유지보수해야 합니다.

## 실행 매개변수

Rotor-Gene Q MDx (US) 기기는 *therascreen* KRAS Assay Package 를 사용하여 다양한 주기 매개변수 또는 "실행"을 위해 프로그래밍됩니다. *therascreen* KRAS Assay Package 는 다음 두 개의 템플릿으로 구성되어 있습니다.

- "therascreen KRAS 잠금 템플릿"(DNA 검체 평가용)
- "*therascreen* KRAS 잠금 템플릿"(KRAS 돌연변이 검출용)

이 분석 템플릿은 PCR 실행 매개변수를 포함하고 있으며 결과를 계산합니다. 대조 반응 혼합물을 이용한 DNA 검체 평가 및 돌연변이 반응 혼합물을 이용한 KRAS 돌연변이 검출에 동일한 실행 매개변수가 사용됩니다.

1. 95°C 에서 15 분간 유지하여 Taq DNA 중합효소를 활성화합니다.
2. 95°C 에서 30 초간 40 주기의 PCR 을 실시하여 변성시키고, 60°C 에서 1 분간 결합 및 신장시킵니다.

특정 반응의 형광성이 *therascreen* KRAS Assay Package 에 의해 주어진 사전 정의된 임계값을 초과할 때의 PCR 주기가 C<sub>T</sub>값으로 정의됩니다.

대조 반응을 사용하여 DNA 검체를 평가하면 얻어진 C<sub>T</sub> 값에 기반하여 검체가 분석에 적합한 수준의 DNA 를 포함하고 있는지, 분석 전에 어떤 검체가 희석이 필요한지를 결정할 수 있습니다.

다양한 돌연변이 반응 혼합물로 검체를 평가하여 각 C<sub>T</sub> 값을 결정하면 *therascreen* KRAS Assay Package 소프트웨어에서 다음 식을 사용하여 검체의 ΔC<sub>T</sub> 값을 결정하기 위한 계산을 수행할 수 있습니다.

$$\Delta C_T = [\text{돌연변이 분석 } C_T \text{ 값}] - [\text{대조물질 분석 } C_T \text{ 값}]$$

미리 결정된 분석 C<sub>T</sub> 및 ΔC<sub>T</sub> 값에 기초하여 Rotor-Gene Q 소프트웨어는 DNA 검체의 돌연변이 상태를 정성적으로 결정하고, 어떤 검체가 어떤 돌연변이를 포함하고 있는지 보고합니다.\*

## 시약

반응 혼합물은 이중으로 구성되어, 표적을 검출하는 FAM 표지 시약과 내부 대조물질을 검출하는 HEX 표지 시약을 포함하고 있습니다. 반응 혼합물 및 양성 대조물질 시약은 Tris EDTA(에틸렌다이아민테트라아세트산) 완충액을 포함하고 있고, 양성 대조물질은 운반 핵산 Poly A RNA 를 포함하고 있습니다.

\* 드물게, 한 개의 중앙에 둘 이상의 돌연변이가 포함되어 있을 수 있습니다. 그런 경우, 최저 ΔC<sub>T</sub> 값을 산출하는 돌연변이가 식별됩니다.

표 3. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에 공급되는 시약

시약	성분	수량
대조 반응 혼합물	대조 비표지 프라이머, 대조 Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpion 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액	튜브 2 개 x 600µl
12ALA 반응 혼합물	12ALA ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpion 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액	튜브 1 개 x 600µl
12ASP 반응 혼합물	12ASP ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpion 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액	튜브 1 개 x 600µl
12ARG 반응 혼합물	12ARG ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpion 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액	튜브 1 개 x 600µl
12CYS 반응 혼합물	12CYS ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpion 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액	튜브 1 개 x 600µl

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

**표 3. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에 공급되는 시약**

시약	성분	수량
12SER 반응 혼합물	12SER ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpion 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액	튜브 1 개 x 600µl
12VAL 반응 혼합물	12VAL ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpion 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액	튜브 1 개 x 600µl
13ASP 반응 혼합물	13ASP ARMS 프라이머, Scorpions 프라이머, 내부 대조물질 비표지 프라이머, 내부 대조물질 Scorpion 프라이머, 내부 대조물질 템플릿, 디옥시뉴클레오티드 트리포스페이트, 염화 마그네슘, Tris EDTA 완충액, PCR 완충액	튜브 1 개 x 600µl
KRAS 양성 대조	대조 템플릿, 12ALA 템플릿, 12ASP 템플릿, 12ARG 템플릿, 12CYS 템플릿, 12SER 템플릿, 12VAL 템플릿, 13ASP 템플릿, Poly A RNA, Tris EDTA 완충액	튜브 1 개 x 250µl
Taq DNA 중합효소	Taq DNA 중합효소: 50% 글리세롤/물	튜브 1 개 x 80µl
템플릿 없는 대조물질	탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 1.9ml
템플릿 희석용	탈핵산분해효소수	튜브 1 개 x 1.9ml

# 제공 품목

## 키트 내용물

**therascreen KRAS RGQ PCR Kit** (24)

**카탈로그 번호** 870021

**준비 수** 24

색상	ID	튜브 ID	용량
빨간색	대조 반응 혼합물	1 CTRL	2 x 600µl
보라색	12ALA 반응 혼합물	2 12ALA	600µl
주황색	12ASP 반응 혼합물	3 12ASP	600µl
분홍색	12ARG 반응 혼합물	4 12ARG	600µl
초록색	12CYS 반응 혼합물	5 12CYS	600µl
노란색	12SER 반응 혼합물	6 12SER	600µl
회색	12VAL 반응 혼합물	7 12VAL	600µl
파란색	13ASP 반응 MixP	8 13ASP	600µl
베이지색	KRAS 양성 대조	9 PC	250µl
박하색	Taq DNA 중합효소	Taq	80µl
흰색	템플릿 없는 대조를 위한 탈핵산분해효소수	NTC	1.9ml
흰색	희석용 탈핵산분해효소수	Dil.	1.9ml

therascreen KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침(안내서)

1



# 필요하지만 제공되지 않는 품목

화학물질로 작업할 때는 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참고하십시오.

제조업체 권고사항에 따라 기기를 점검 및 교정했음을 확인합니다.

- 0.1 ml Strip Tubes and Caps, 72-Well Rotor 와 함께 사용(QIAGEN, 카탈로그 번호 981103 또는 981106)
- 마스터 혼합물 준비용 살균 마이크로 원심분리기 튜브
- 에어로졸 막이 있는 멸균 피펫 팁
- 유성펜
- 72-Well Rotor 가 장착된 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기(QIAGEN, 카탈로그 번호 9002035)
- *therascreen* KRAS Assay Package CD 버전 3.1.1 을 포함하는 Rotor-Gene Q 소프트웨어 버전 2.3.1 이상(QIAGEN, 카탈로그 번호 9023818)

**참고:** Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 는 소프트웨어 버전 2.3.1 이상에서만 작동합니다.

**참고:** 이전 버전의 분석 패키지는 새로운 소프트웨어 버전 2.3.1 이상과 호환되지 않습니다.

- Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes, 수동 반응 설정을 위한 알루미늄 블록(QIAGEN, 카탈로그 번호 9018901)
- 검체 준비용 전용 피펫(조절식)
- PCR 마스터 혼합물 준비 전용 피펫(조절식)
- 템플릿 DNA 분주 전용 피펫(조절식)
- 56°C, 70°C, 90°C 에서 배양 가능한, 열교반기, 가열 회전 배양기, 가열 블록 또는 수조
- 1.5ml 튜브용 로터 포함 실험대용 원심분리기

- 실험대 교반기
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN, 카탈로그 번호 60404, 25 페이지의 "결장직장암 검체를 위한 DNA 추출" 참고)

# 경고 및 사전 주의 사항

## 경고

체외 진단용

처방전 전용

Rotor-Gene Q MDx (US) 기기와 함께 사용

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 와 함께 사용함

화학 물질로 작업할 때는 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조하십시오. 안전보건자료는 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 에서 온라인 PDF 형식으로 사용할 수 있으며 여기에서 각 QIAGEN 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS 를 찾아서 보고 인쇄할 수 있습니다.

## 사전 주의 사항

사용자는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용할 때 항상 다음 사전 주의 사항을 준수해야 합니다.

- 이 테스트는 포르말린 고정 파라핀 포매 조직 표본에 사용하기 위한 것입니다.
- 모든 화학 물질 및 생물학적 물질은 잠재적으로 위험합니다. 시료 및 검체는 감염 가능성이 있으며 생물학적 유해물질로 취급해야 합니다.
- 검체 및 분석 폐기물은 현지 안전 절차에 따라 폐기하십시오.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 용 시약은 최적의 상태로 희석되었습니다. 시약을 추가로 희석하면 성능 저하를 야기할 수 있으므로 추가로 희석하지 마십시오. 25 $\mu$ l 미만 부피의 반응액(반응 혼합물 + 검체)을 사용하지 마십시오.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 모든 시약은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에서 제공하는 검사에 함께 사용하기 위해 특별히 조제되었습니다.

- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 공급되는 모든 시약은 동일한 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 공급되는 다른 시약과 함께 사용하도록 되어 있습니다. 성능에 영향을 줄 수 있으므로 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 내에서 또는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 간에 시약을 교체하지 마십시오.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 제공된 *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)만 사용하십시오. 동일한 유형 또는 다른 유형의 다른 키트에 제공된 *Taq* DNA 중합효소 또는 다른 공급업체의 *Taq* DNA 중합효소로 대체하지 마십시오.
- 추가적인 경고, 사전 주의 사항 및 절차는 *Rotor-Gene Q MDx (US) 사용 설명서*를 참고하십시오.
- 유효 기간이 만료되었거나 부적절하게 보관된 구성품은 사용하지 마십시오.
- 대조물질 및 검체에 대한 플래그를 최소화하려면, 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침을 엄격하게 준수해야 합니다.
  - 올바른 시약 혼합이 요구되며, 분석 설정 중 각 혼합 단계에서 이를 확실히 수행해야 합니다.
- 설치 절차 및 장소적 요건에 따른 *Rotor-Gene Q MDx (US)* 기기 배치.

**참고:** 대조물질 및 반응액 혼합 시약이 양성 대조물질 시약에 들어 있는 합성 물질로 오염되지 않도록 각별히 주의하십시오.

**참고:** 반응 혼합물을 설정하고 양성 대조물질 시약을 첨가할 때 개별적인 전용 피펫을 사용하십시오.

**참고:** 양성 대조물질 첨가에 사용한 구역이 아닌 다른 구역에서 반응 혼합물을 준비하고 분주하십시오.

**참고:** 실행이 끝날 때까지 *Rotor-Gene Q MDx (US)* 기기를 열지 마십시오.

**참고:** 실행이 끝날 때까지 *Rotor-Gene Q* 튜브를 열지 마십시오.

**참고:** 잘못된 검체 사용, 로딩 오류 및 피펫팅 오류가 없이 정확한 검체 테스트가 이루어지도록 주의해야 합니다.

# 시약 보관 및 취급

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 드라이아이스로 보존되어 배송됩니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 가 도착 시 동결된 상태가 아니거나 외부 포장에 운송 중에 개봉되었거나 배송물에 포장 명세서, 사용 지침 또는 시약이 들어 있지 않은 경우에는 QIAGEN 기술 서비스 또는 현지 유통업체로 문의하십시오([www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 방문).

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 받는 즉시 빛이 들어오지 않는  $-30\sim-15^{\circ}\text{C}$  의 항온 냉동고에 보관해야 합니다. 지정된 보관 조건에서 보관하는 경우 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 명시된 유통 기한까지 안정적입니다.

일단 개봉한 시약은 원래 포장재에 넣은 상태로  $-30\sim-15^{\circ}\text{C}$  에서 12 개월간 또는 포장재에 표시된 유통 기한까지 보관할 수 있습니다. 해동과 동결을 반복해서는 안 됩니다. 최대 6 회의 동결-해동 사이클을 초과하지 마십시오.

시약은 실온에서 최소 1 시간, 최대 4.5 시간 동안 해동해야 합니다. 시약을 사용할 준비가 되면, PCR 반응을 설정할 수 있습니다. 마스터 혼합물과 DNA 검체가 들어 있는 Rotor-Gene Q 튜브는 Rotor-Gene Q MDx (US) 에 즉시 로드할 수 있습니다. PCR 반응액을 설정한 후 실행 전 총 시간이 다음 시간을 초과해서는 안 됩니다.

- 실온에서 보관 시 7 시간

**참고:** 이 시간에는 PCR 설정 및 보관 시간이 모두 포함됩니다.

- 냉장고( $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ )에서 보관 시 18 시간

**참고:** 이 시간에는 PCR 설정 및 보관 시간이 모두 포함됩니다.

**참고:** 반응 혼합물 시약의 Scorpions 는 (모든 형광 표지 분자와 마찬가지로) 빛에 민감합니다. 광 표백을 방지하기 위해 대조물질 및 반응 혼합물 시약을 빛으로부터 보호하십시오.

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 시약은 최적으로 희석되어 있으므로 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침(안내서)(이 문서)에 명시된 대로 분석에 사용하기 전에 추가로 정제하거나 처리할 필요가 없습니다.

포장 상자와 라벨에 인쇄되어 있는 모든 구성품의 유효 기간과 보관 조건에 주의를 기울여야 합니다. 유효 기간이 만료되었거나 부적절하게 보관된 구성품은 사용하지 마십시오.

# 시료 취급 및 보관

## 시료 취급

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 결장직장암 또는 비소세포폐암 환자의 FFPE 종양 조직에서 추출한 DNA 검체에 사용하기 위한 것입니다. 종양은 유전자형과 표현형 모두에서 이질성입니다. 돌연변이 양성 종양은 야생형 DNA 를 포함할 수 있으며, 마찬가지로 조직학적으로 비종양 조직의 영역을 나타낼 수 있습니다. 모든 조직 검체는 잠재적으로 유해한 것으로 취급해야 합니다.

## 결장직장암 조직의 DNA 추출을 위한 조직 시료 준비

- 표준 물질과 방법을 사용하여 조직 시료를 10% 중성 완충액 포르말린(Neutral Buffered Formalin, NBF)에 고정하고 조직 시료를 파라핀에 포매합니다. 박절기를 사용하여 파라핀 블록에서 5 $\mu$ m 의 연속 절편을 잘라내어 유리 슬라이드에 고정합니다.
- 종양 함량 및 면적 결정을 위해서는 훈련된 사람(예: 병리학자)이 헤마톡실린 & 에오신(Hematoxylin & Eosin, H&E) 염색 절편을 평가하도록 합니다. 염색된 슬라이드를 표시하여 정상 조직과 종양을 구별합니다. DNA 추출을 위해 연속 절편을 사용합니다.
- 육안 절제 없이 처리하려면 종양 함량이 면적당 >20%의 절편을 사용하십시오(아래 참조).
- 종양 함량이 면적당  $\leq$ 20%인 절편에서는 하나 이상의 절편을 육안 절제합니다. 비종양 조직은 폐기합니다.
- 면적이 4mm<sup>2</sup> 미만인 절편의 경우, 두 개 이상의 절편을 처리하여 총 종양 면적을 최소 4mm<sup>2</sup>로 증가시킵니다(육안 절제 유무에 관계 없이 모든 검체에 적용). 비종양 조직은 폐기합니다.

- 과도한 파라핀은 멸균된 새 메스를 사용하여 조직에서 긁어냅니다.

**참고:** 건조한 메스를 사용하십시오. 기류식 후드 또는 흠 후드에서 이 단계를 수행하지 마십시오.

- 각 검체에서 새 메스를 사용하여 절편에서 종양 조직을 긁어내어 라벨이 부착된 마이크로 원심분리기 튜브에 넣습니다.

## 비소세포폐암 조직의 DNA 추출을 위한 조직 시료 준비

- 표준 물질과 방법을 사용하여 조직 시료를 10% NBF 에 고정하고 조직 시료를 파라핀에 포매합니다. 박절기를 사용하여 파라핀 블록에서 5 $\mu$ m 의 연속 절편을 잘라내어 유리 슬라이드에 고정합니다.
- 훈련받은 사람(예: 병리학자)이 H&E 염색 절편을 평가하여 종양이 존재하는지 확인해야 합니다. DNA 추출을 위해 연속 절편을 사용합니다.
- 과도한 파라핀은 멸균된 새 메스를 사용하여 조직에서 긁어냅니다.
- 현지 절차에 따라 통제된 방식으로 추출할 준비가 된 종양 표본, 블록, 슬라이드, 검체 및 마이크로 원심분리기 튜브에 표지를 붙이고, 취급 및 보관합니다.

## 시료 보관

FFPE 블록과 슬라이드는 실온에서 보관하십시오. 슬라이드는 DNA 추출 전에 주변 온도에서 최대 4 주간 보관할 수 있습니다.

- 추출한 유전체 DNA 는 사용 전 2~8°C에서 1 주일간 보관할 수 있으며, -25~-15°C에서 최대 8 주까지 보관 가능합니다.



# 프로토콜: DNA 추출

## 결장직장암 검체를 위한 DNA 추출

FFPE 결장직장암 표본으로 제조된 검체의 유전체 DNA 를 정제하기 위한 아래에 기술된 프로토콜을 수정하여 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN, 카탈로그 번호 60404)를 사용하십시오.

**참고:** *therascreen KRAS RGQ PCR Kit* 는 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 를 사용하여 추출된 DNA 를 사용하여 검증되었습니다. 다른 DNA 추출 제품을 사용하지 마십시오.

*QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서*(버전 1)에 들어 있는 지침에 따라 다음에 유의하여 DNA 추출을 실시하십시오.

- DNA 추출 전 시료의 준비에 관해서는 *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서*를 참고하십시오.
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 는 수동으로만 사용해야 합니다. *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서*에 설명되어 있는 QIAcube®를 위한 자동화된 프로토콜을 사용하지 마십시오.
- *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서*에 기술되어 있는 RNase 단계를 사용하지 마십시오.
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 로 제공되는 QIAGEN Deparaffinization Solution 을 사용하지 마십시오.
- *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서*에 기술된 파라핀 제거를 위한 자일렌/에탄올 방법만 사용하십시오.
- 모든 필수 단계에는 분자생물학 등급 에탄올을 사용하십시오.\*
- 추출당 1 개의 슬라이드를 사용하십시오.

\* 메탄올 또는 메틸에틸케톤과 같은 기타 물질을 함유한 변성 알코올은 사용하지 마십시오.

- 단백질분해효소 K 분해법(QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit *안내서*에 설명된 대로)을 1 시간 동안 수행해야 합니다.
- 검체는 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 의 200µl 용출 완충액(Buffer ATE)을 사용하여 용출해야 합니다.

추출한 유전체 DNA 는 사용 전 2~8°C에서 1 주일간 보관할 수 있으며, -25~-15°C에서 최대 8 주까지 보관 가능합니다.

## 비소세포폐암 검체를 위한 DNA 추출

FFPE 비소세포폐암 표본으로 제조된 검체의 유전체 DNA 를 정제하기 위한 아래에 기술된 프로토콜을 수정하여 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN, 카탈로그 번호 60404)를 사용하십시오.

**참고:** *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 를 사용하여 추출된 DNA 를 사용하여 검증되었습니다. 다른 DNA 추출 제품을 사용하지 마십시오.

*QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서*에 나와 있는 지침에 따라 다음에 유의하여 DNA 추출을 수행하십시오.

- 추출당 2 x 5µm 절편을 사용합니다.
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 는 수동으로만 사용해야 합니다.
- *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 안내서*에 설명된 RNA 분해효소 단계를 수행하지 마십시오.
- QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 로 제공되는 QIAGEN 파라핀 제거 용액을 사용하지 마십시오.
- *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서*에 기술된 파라핀 제거를 위한 자일렌/에탄올 방법만 사용하십시오.
- 단백질분해효소 K 분해법(*QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서*에 설명된 대로)을 1 시간 동안 수행해야 합니다.

- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 의 60 $\mu$ l 용출 완충액(ATE)을 추가하고 실온에서 2.5 분 동안 배양합니다.
- 최고 속도로 1 분간 원심 분리합니다.
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 의 60 $\mu$ l 용출 완충액(ATE)을 더 추가하고 실온에서 2.5 분 동안 배양합니다.
- 최고 속도로 1 분간 원심 분리합니다.
- 추출한 유전체 DNA 는 사용 전 2~8°C에서 1 주일간 보관할 수 있으며, -25~-15°C에서 최대 8 주까지 보관 가능합니다.

## 프로토콜: DNA 검체 평가

이 프로토콜은 검체 내 증폭 가능한 총 DNA 를 평가하는 데 사용됩니다.

### 시작 전 중요 사항

**참고:** 검체 내 총 증폭 가능 DNA 만 대조 반응을 사용하여 평가하므로 DNA 검체 평가는 PCR 억제제의 존재를 검출하도록 설계되지 않았습니다.

**참고:** 이 평가를 위해 분광 광도계 또는 기타 대체 방법이 아닌 아래에 설명된 대로 대조 반응 혼합물을 사용하는 것이 중요합니다. 심하게 분해된 DNA 는 프라이머가 짧은 DNA 단편을 생성하더라도 증폭되지 않을 수 있습니다.

- 사용 가능한 대조 반응 혼합물을 사용하여 최대 24 개의 검체를 평가할 수 있습니다.
- 테스트 전에 대조 반응 혼합물(튜브 CTRL)을 사용하여 DNA 를 평가하십시오.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 시약을 효율적으로 사용하려면 가능한 한 DNA 검체를 배치로 구성하여 완전히 채워진 실행을 만드십시오. 검체를 개별적으로 또는 적은 수량으로 테스트하면 시약이 더 많이 사용되고 한 개의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 테스트할 수 있는 전체 검체의 수량이 줄어듭니다.
- 효소가 비활성화될 수 있으므로 *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*) 또는 *Taq* DNA 중합효소가 들어 있는 혼합물을 흔들지 마십시오.
- 피펫 팁이 효소에 과도하게 덮이지 않도록 팁을 조심스럽게 액체 표면 바로 밑에 담가서 *Taq* DNA 중합효소를 피펫팅하십시오.
- 대조물질에 대한 플래그를 최소화하려면 올바른 시약 혼합과 관련하여 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침을 엄격하게 준수해야 하며, 분석을 설정하는 동안 각 혼합 단계에서 이를 반드시 확인해야 합니다.

## 시작하기 전에 해야 할 일

- Rotor-Gene Q MDx (US) 기기를 처음 사용하기 전에 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 가 설치되었는지 확인하십시오(참고: "부록: Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 의 설치의 설치", 130 페이지).
- 매번 사용 전에 모든 시약을 실온(15~25°C)에서 최소 1 시간 동안 완전히 해동하고, 10 회 뒤집어 혼합한 후, 짧게 원심분리하여 튜브 바닥의 내용물을 모아야 합니다. 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.
- 각 사용 전에 *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)를 실온(15~25°C)에 둡니다. 튜브를 짧게 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.

1. 대조 반응 혼합물(튜브 CTRL), 템플릿 없는 대조(튜브 NTC)를 위한 탈핵산분해효소수, KRAS 양성 대조물질(튜브 PC)을 실온(15~25°C)에서 최소 1 시간 동안 완전히 해동합니다.

실행 전 시약의 해동, PCR 설정 및 보관 시간은 아래 표에 나와 있습니다.

### 해동 시간

최솟값	최댓값	PCR 설정 후 보관 온도	최대 PCR 설정 및 보관 시간
1 시간	4.5 시간	실온(15~25°C)	7 시간
1 시간	4.5 시간	2~8°C	18 시간

**참고:** PCR 설정은 실온에서 수행됩니다. "보관"이라는 용어는 PCR 설정이 완료된 후 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기에서 PCR 실행을 시작하기까지의 시간을 말합니다.

**참고:** *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)를 다른 시약과 동시에 실온(15~25°C)으로 해동합니다(참고: "시약 보관 및 취급", 21 페이지). 튜브를 짧게 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.

2. 시약이 해동되면 염의 농도가 한 곳만 높지 않도록 각 튜브를 10 회 뒤집어 혼합하고 잠깐 원심 분리하여 튜브 바닥에 있는 내용물을 수집합니다.

**참고:** 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.

3. 아래의 표에 있는 용량에 따라 DNA 검체를 위한 충분한 대조 분석 마스터 혼합물(대조 반응 혼합물[튜브 CTRL] + Taq DNA 중합효소[튜브 Taq]), 한 개의 KRAS 양성 대조물질(튜브 PC) 반응 및 템플릿이 없는 대조(튜브 NTC)를 위한 한 개의 탈핵산분해효소수를 준비합니다.

PCR 설정에 충분한 여분을 확보할 수 있도록 1 개의 추가 검체에 대한 시약을 포함시킵니다. 대조 분석 마스터 혼합물에는 대조 또는 검체를 제외하고 PCR에 필요한 모든 구성 요소가 포함되어 있습니다.

대조물질 분석 마스터 혼합물 구성품	마스터 혼합물에 필요한 용량
대조 반응 혼합물(튜브 CTRL)	$19.76\mu\text{l} \times (n + 1)^*$
Taq DNA 중합효소(튜브 Taq)	$0.24\mu\text{l} \times (n + 1)$
<b>총부피</b>	<b>반응당 20<math>\mu\text{l}</math></b>

\* n = 반응액 수(검체 + 대조군).

PCR 설정을 위한 여분으로 한 개의 추가 검체(n + 1)를 위한 충분한 마스터 혼합물을 준비합니다. n 값은 24 (+ 대조군)를 초과하면 안 됩니다. 24는 한 번의 실행에 적합한 최대 검체 수입니다.

**참고:** 대조 분석 마스터 혼합물을 준비할 때 필요한 용량의 대조 반응 혼합물을 해당 튜브에 먼저 추가하고 마지막으로 Taq DNA 중합효소(튜브 Taq)를 추가합니다.

4. 아래 표의 배치에 따라 로딩 블록에 적절한 수의 PCR 4-스트립 튜브(각 스트립에는 4 개의 튜브가 있음)를 배치합니다. 번호는 로딩 블록 내 위치를 표시하며 최종 로터 위치를 나타냅니다. 튜브의 캡을 닫지 마십시오.

**참고:** 캡은 필요할 때까지 플라스틱 용기에 남겨 두십시오.

## 분석

대조물질	1[PC]	9	17	25	-	-	-	-	-
대조물질	2[NTC]	10	18	26	-	-	-	-	-
대조물질	3	11	19	-	-	-	-	-	-
대조물질	4	12	20	-	-	-	-	-	-
대조물질	5	13	21	-	-	-	-	-	-
대조물질	6	14	22	-	-	-	-	-	-
대조물질	7	15	23	-	-	-	-	-	-
대조물질	8	16	24	-	-	-	-	-	-

5. 피펫을 총 반응 혼합물 용량보다 적은 용량으로 설정하고 위아래로 10 회 완전 흡인하여 대조 분석 마스터 혼합물을 완전히 혼합합니다.

**참고:** 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.

6. 각 PCR 스트립 튜브에 20 $\mu$ l 의 대조 분석 마스터 혼합물을 즉시 추가합니다. 튜브 배치는 표를 참고하십시오.

DNA 검체 평가를 위해서는 대조 분석 마스터 혼합물을 한 개의 PC 튜브, 한 개의 NTC 튜브 및 각 DNA 검체 당 한 개의 튜브에 추가해야 합니다.

7. 템플릿 없는 대조 물질(튜브 NTC)을 위한 5 $\mu$ l 의 탈핵산분해효소수를 NTC 튜브(튜브 위치 2)에 즉시 첨가하고 튜브 캡을 닫습니다.
8. 검체 튜브(튜브 위치 3~26)에 각 DNA 검체 5 $\mu$ l 를 추가하고 튜브 캡을 닫습니다.
9. 5 $\mu$ l 의 KRAS 양성 대조물질(튜브 PC)을 PC 튜브(튜브 위치 1)에 추가하고 튜브 캡을 닫습니다.

각 튜브에는 총 25 $\mu$ l 의 반응물 용량(20 $\mu$ L 의 대조 분석 마스터 혼합물 + 5 $\mu$ l 의 NTC/검체/PC)이 들어 있어야 합니다.

10. 유성펜으로 각 PCR 4-스트립 튜브(예: 위치 1, 5, 9 등)의 가장 낮은 숫자 위치의 첫 번째 튜브 뚜껑에 표시하여 튜브가 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기의 72-Well Rotor 에 로드되는 방향을 표시합니다.

11. 캡을 덮은 튜브를 4 회 뒤집어 검체와 반응 혼합물을 섞습니다.

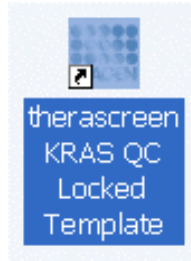
**참고:** 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.

12. 모든 PCR 4-스트립 튜브를 방향 표시를 사용하여 실행 배치에 따라 72-Well Rotor 의 적절한 위치에 배치합니다.

**참고:** 로터가 완전히 차지 않은 경우, 로터에 사용되지 않는 모든 위치를 캡이 씌워진 빈 튜브로 채워야 합니다. 이렇게 하면 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기의 열 효율이 유지됩니다.

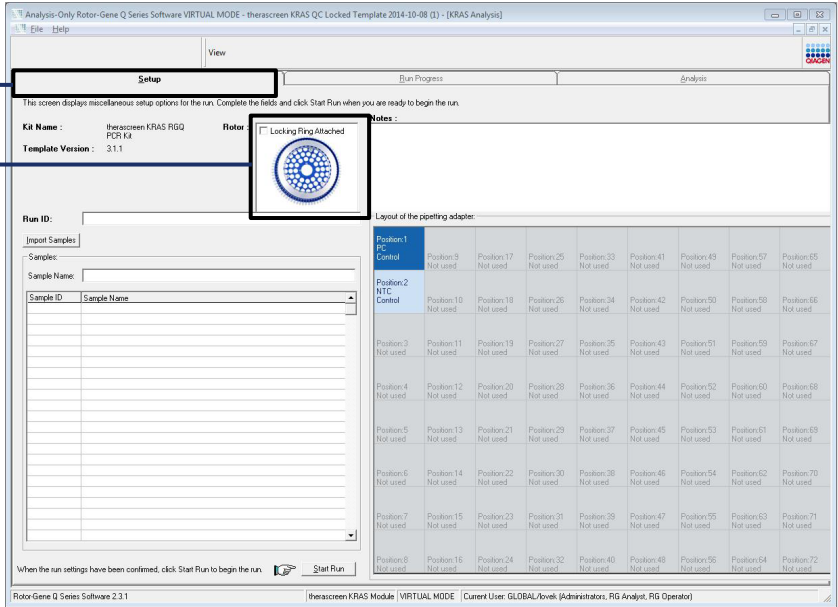
13. Rotor-Gene Q MDx (US) 기기에 72-Well Rotor 를 배치합니다. 작동 중 튜브를 고정하기 위해 잠금 링(Rotor-Gene Q MDx (US) 기기와 함께 공급됨)을 로터 상단에 배치합니다.

14. Rotor-Gene Q MDx (US) 기기에 연결된 노트북의 화면에서 **therascreen KRAS QC Locked Template**(therascreen KRAS 잠금 템플릿) 아이콘을 더블 클릭하여 Rotor-Gene Q 소프트웨어를 시작하는 동시에 템플릿을 엽니다.

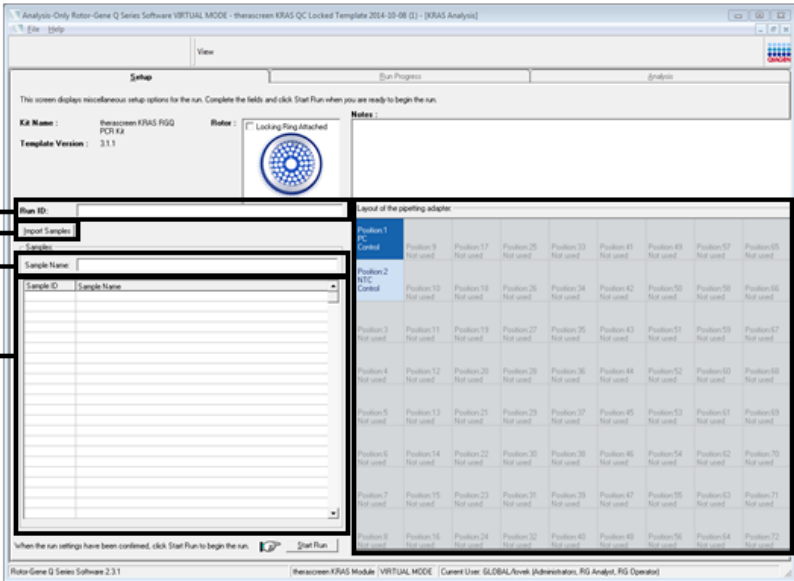


15. 기본값에 따라 **Setup**(설정) 탭이 표시됩니다(1). 잠금 링이 적절히 부착되었는지 확인하고, **Locking Ring Attached**(잠금 링 부착) 상자(2)에 체크합니다. Rotor-Gene Q MDx (US) 기기 뚜껑을 닫습니다.





16. 현지 명명 규칙에 따라 Run ID(실행 ID) 필드(아래 예의 1)에 실행 ID를 입력합니다.



17. 현지 명명 규칙에 따라 **Sample Name**(검체 이름) 필드(3)에 검체 이름을 입력하고 엔터 키를 누릅니다. 이렇게 하면 검체 이름이 아래의 검체 목록(4)에 추가되고, 검체에 **Sample ID**(검체 ID)(1, 2, 3 등)가 할당됩니다. 또한 오른쪽에 있는 **Layout of the pipetting adapter**(피펫팅 어댑터 배치)(5) 패널이 검체 이름을 포함하도록 업데이트됩니다.

**중요:** 검체 이름을 입력할 때 검체 ID가 섞이지 않도록 주의합니다. 또는 **Import Samples**(검체 가져오기) 버튼을 사용하여 \*.smp(Rotor-Gene Q 검체 파일) 또는 \*.csv(싹표로 구분된 값) 형식으로 저장된 검체 이름을 가져올 수도 있습니다. 이 방법을 사용하면 검체 이름이 자동으로 채워집니다.

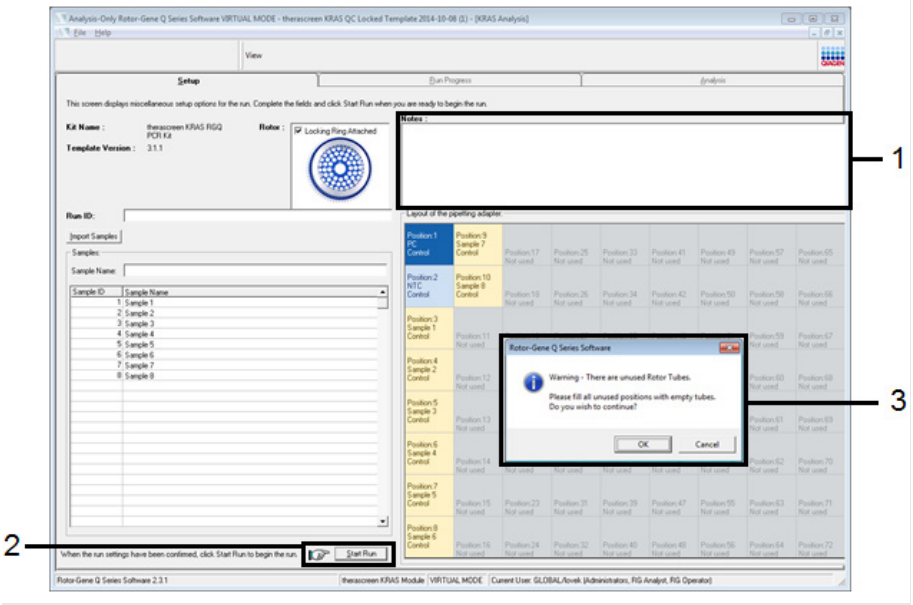
**참고:** **Layout of the pipetting adapter**(피펫팅 어댑터 배치) 패널에 추가한 검체 이름이 색깔이 바뀌며 강조 표시되고, 검체 이름이 검체 위치에 있는지 확인하십시오.

**참고:** 8 글자가 넘는 검체 이름은 **Layout of the pipetting adapter**(피펫팅 어댑터 배치) 패널에 모두 표시되지 않을 수 있습니다.

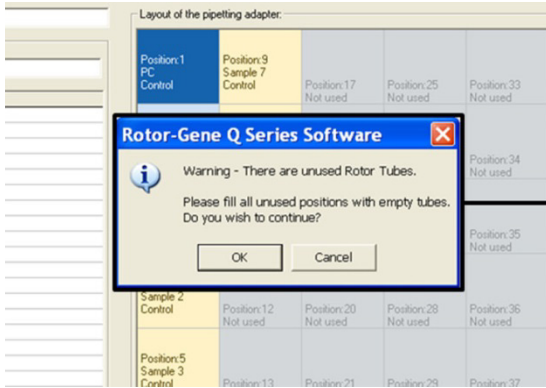
18. 17 단계를 반복하여 모든 추가 검체의 이름을 입력하십시오.

**참고:** 검체 이름을 편집하려면 검체 목록(4)에서 검체 이름을 클릭합니다. 선택된 검체가 위의 **Sample Name**(검체 이름) 대화상자 필드(3)에 나타납니다. 현지 명령 규칙에 따라 검체 이름을 편집하고 엔터 키를 눌러 이름을 업데이트합니다. 추가 검체 이름이 **Layout of the pipetting adapter**(피펫팅 어댑터 배치) 패널(5)에 표시됩니다.

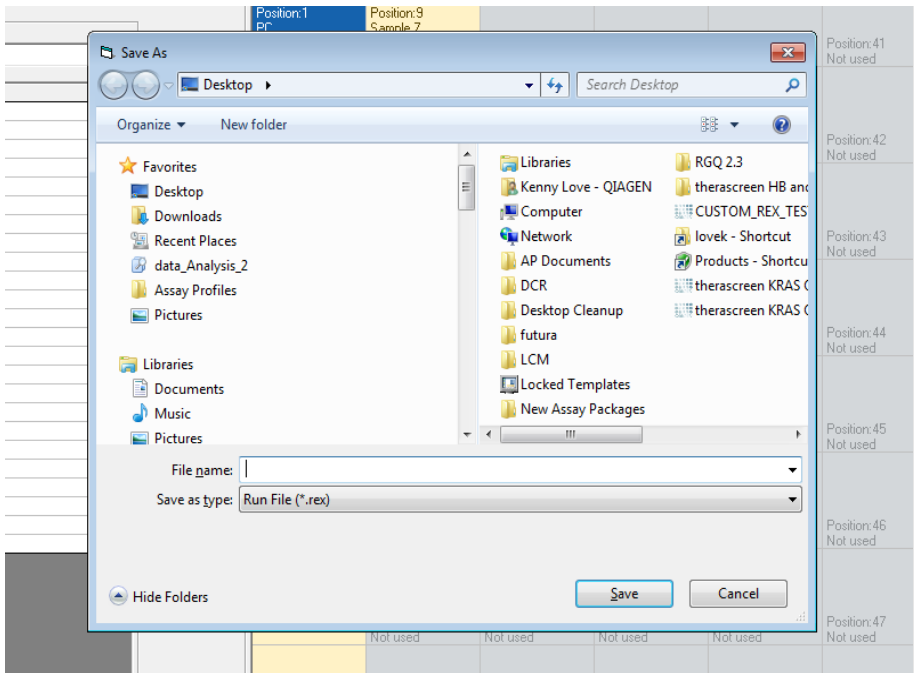
19. 모든 검체 이름을 입력한 후 이름이 정확한지 확인합니다. 필요하다면 **Notes**(참고) 필드(1)에 추가 정보를 추가하고, **Start Run**(실행 시작)(2)을 클릭합니다.



**참고:** 사용되지 않는 로터 위치가 있을 경우 경고가 표시되며(아래 예의 3), 로터의 모든 미사용 위치를 캡을 씌운 빈 튜브로 채워야 함을 사용자에게 알려줍니다. 모든 미사용 로터 위치가 캡을 씌운 빈 튜브로 채워졌는지 확인한 후, **OK**(확인)(아래 예의 1)를 눌러서 진행합니다.

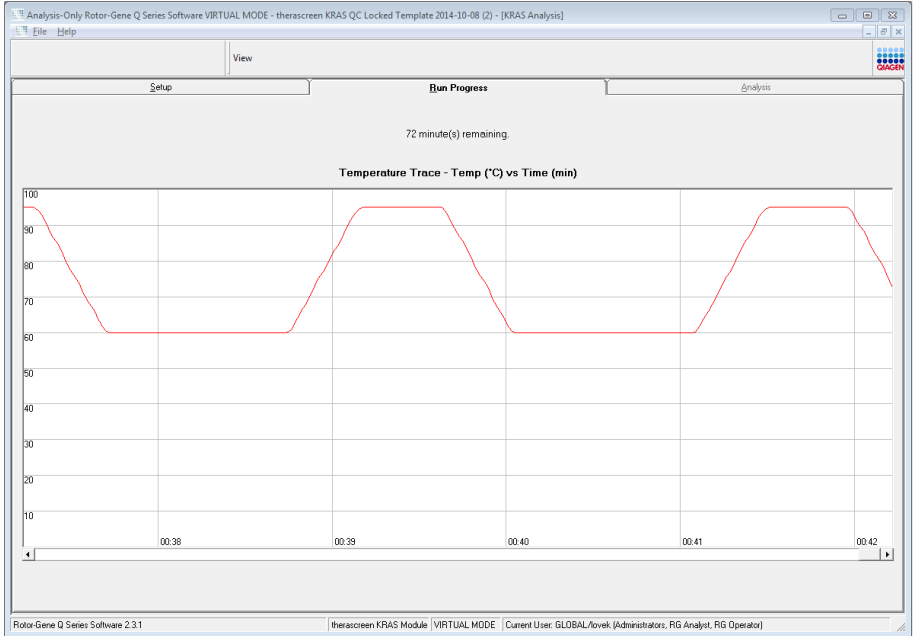


20. **Save As**(다른 이름으로 저장) 창이 열립니다. 적절한 파일명을 선택하고 **Save**(저장)를 클릭하여 PCR 실행을 선택된 위치에 \*.rex 실행 파일로 저장합니다.



## 21. PCR 실행이 시작됩니다.

**참고:** 실행을 시작하면 **Run Progress**(실행 진행) 탭이 자동으로 열리고 온도 추적 및 남은 실행 시간이 표시됩니다.



실행이 끝나면 **Analysis**(분석) 탭이 자동으로 열립니다. **Analysis**(분석) 탭이 열리지 않을 경우 **Analysis**(분석) 탭을 클릭합니다.

Analysis-Only Rotor-Gene Q Series Software VIRTUAL MODE - theascreen KRAS QC Locked Template 2014-10-08 (1) - [KRAS Analysis]

File Help

View

Setup Run Progress Analysis

Report

**QC Sample Result Table:**

Tube ID	Sample Name	Control Assay C <sub>T</sub>	Flags/Warnings	Status
1	PC Control	27.40	-	Valid
2	NTC Control	-	-	Valid
3	Sample 1	27.40	-	Valid
4	Sample 2	27.63	-	Valid
5	Sample 3	29.36	-	Valid
6	Sample 4	29.36	-	Valid
7	Sample 5	30.94	-	Valid
8	Sample 6	31.16	-	Valid
9	Sample 7	27.63	-	Valid
10	Sample 8	29.36	-	Valid

Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1 | theascreen KRAS Module | VIRTUAL MODE | Current User: GLOBAL/lovek (Administrator, RIG Analyst, RIG Operator)

## 22. 대조 결과가 QC Sample Result Table(QC 검체 결과표)에 보고됩니다.

- 대조군을 실행합니다(PC 대조 및 NTC 대조, 각각 튜브 위치 1 과 2).

결과가 허용 범위 이내이면 각각은 "Valid"(유효) 상태로 표시됩니다.

결과가 허용 범위 이내가 아니면 "Invalid"(무효) 결과가 표시됩니다.

- 검체 대조 반응 C<sub>T</sub> 값이 >32.00 이면, "Invalid"(무효) 결과가 표시됩니다.

DNA 의 양이 돌연변이 분석에 충분하지 않습니다.

검체를 재검사합니다. DNA 의 양이 아직 충분하지 않으면 가능한 경우 증양 조직을 더 추출하십시오(참고: "Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package 플래그", 54 페이지, 및 "문제 해결 가이드", 60 페이지).

- 검체 대조 반응 C<sub>T</sub> 값이 <21.92 이면, "Invalid"(무효) 결과가 표시됩니다.

DNA 농도가 돌연변이 분석을 하기에 너무 높습니다.

희석용 탈핵산분해효소수(튜브 Dil.)로 희석한 후 다시 테스트합니다.

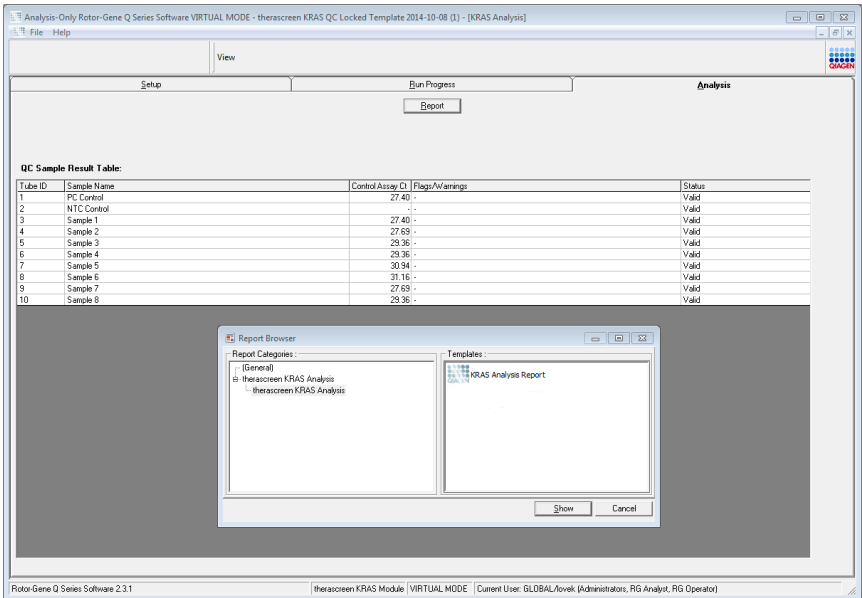
C<sub>T</sub> 값이 21.92~32.00 가 되도록 희석합니다. 1:1 희석은 C<sub>T</sub> 값을 약 1.0 증가시킵니다.

- 검체 대조 반응 C<sub>T</sub> 값이 21.92~32.00(21.92 ≤ 대조 C<sub>T</sub> ≤ 32.00)이면, "Valid"(유효) 결과가 표시됩니다.

DNA 농도가 돌연변이 분석을 하기에 적합합니다.

**참고:** 재추출 또는 희석이 필요할 경우 대조군 반응을 반복하여 DNA 농도가 사용하기 적합한지 확인합니다.

23. **Report**(보고서) 버튼을 클릭하여 보고서 파일을 만듭니다. **Report Browser**(보고서 브라우저) 창이 열립니다. **Templates**(템플릿)에서 **KRAS Analysis Report**(KRAS 분석 보고서)를 선택한 후 **Show**(표시)를 클릭합니다.



**참고:** 각 보고서 좌측 상단에 있는 **Save As**(다른 이름으로 저장) 버튼을 클릭하면 보고서를 다른 위치에 웹 아카이브 형식으로 저장할 수 있습니다.

## 프로토콜: KRAS 돌연변이 검출

이 프로토콜은 KRAS 돌연변이를 검출하기 위한 것입니다.

### 시작 전 중요 사항

- 검체 평가를 통과한 검체는 KRAS 돌연변이 분석을 사용하여 검사할 수 있습니다.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 효율적으로 사용하려면 검체를 7 개씩 배치로 묶어야 합니다(72-Well Rotor 를 채우기 위해). 배치 크기를 줄이면 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 테스트할 수 있는 검체 수가 줄어듭니다.
- 검체는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 제공된 모든 반응 혼합물을 사용하여 테스트해야 합니다.
- 효소가 비활성화될 수 있으므로 *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*) 또는 *Taq* DNA 중합효소가 들어 있는 혼합물을 흔들지 마십시오.
- 피펫 팁이 효소에 과도하게 덮이지 않도록 팁을 조심스럽게 액체 표면 바로 밑에 담가서 *Taq* DNA 중합효소를 피펫팅하십시오.

**참고:** 대조물질 및 검체에 대한 플래그를 최소화하려면 올바른 시약 혼합과 관련하여 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침을 엄격하게 준수하고, 분석을 설정하는 동안 각 혼합 단계에서 이를 반드시 확인해야 합니다.

### 시작하기 전에 해야 할 일

- 매번 사용 전에 모든 시약을 실온(15~25°C)에서 최소 1 시간 동안 완전히 해동하고, 10 회 뒤집어 혼합한 후, 짧게 원심 분리하여 튜브 바닥의 내용물을 모아야 합니다.
- 각 사용 전에 *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)를 실온(15~25°C)에 둡니다. 튜브를 짧게 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.
  - **참고:** 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.



## 절차

1. 모든 반응 혼합물 튜브, 템플릿 없는 대조를 위한 탈핵산분해효소수(튜브 NTC), KRAS 양성 대조물질(튜브 PC)을 실온(15~25°C)에서 최소 1 시간 동안 완전히 해동합니다. 실행 전 시약의 해동, PCR 설정 및 보관 시간은 아래 표에 나와 있습니다.

### 해동 시간

최솟값	최댓값	PCR 설정 후 보관 온도	최대 PCR 설정 및 보관 시간
1 시간	4.5 시간	실온(15~25°C)	7 시간
1 시간	4.5 시간	2~8°C	18 시간

**참고:** PCR 설정은 실온에서 수행됩니다. '보관'이라는 용어는 PCR 설정이 완료된 후 Rotor-Gene Q MDx 기기에서 PCR 실행을 시작하기까지의 시간을 말합니다.

**참고:** *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)를 다른 시약과 동시에 실온(15~25°C)으로 해동합니다(참고: "시약 보관 및 취급", 21 페이지). 튜브를 짧게 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.

2. 시약이 해동되면 염의 농도가 한 곳만 높지 않도록 각 튜브를 10 회 뒤집어 혼합하고 잠깐 원심 분리하여 튜브 바닥에 있는 내용물을 수집합니다.

**참고:** 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.

3. 아래의 표와 같이 8 개의 마이크로 원심분리기 튜브(제공되지 않음)에 각 해당 반응 혼합물에 따라 라벨을 붙입니다. DNA 검체를 위한 충분한 마스터 혼합물(대조 또는 돌연변이 반응 혼합물[튜브 CTRL, 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL 또는 13ASP] + *Taq* DNA 중합효소[*Taq*]), 한 개의 KRAS 양성 대조물질(튜브 PC) 반응, 템플릿 없는 대조 반응을 위한 한 개의 탈핵산분해효소수(튜브 NTC)를 표에 있는 용량에 따라 준비합니다. PCR 설정에 충분한 여분을 확보할 수 있도록 1 개의 추가

검체에 대한 시약을 포함시킵니다. 마스터 혼합물에는 검체를 제외하고 PCR 에 필요한 모든 구성품이 포함되어 있습니다.

분석 및 반응 혼합물 튜브	반응 혼합물의 부피	Taq 부피 DNA 중합효소
대조물질(튜브 CTRL)	19.76µl x (n + 1)	0.24µl x (n + 1)
12ALA(튜브 12ALA)	19.76µl x (n + 1)	0.24µl x (n + 1)
12ASP(튜브 12ASP)	19.76µl x (n + 1)	0.24µl x (n + 1)
12ARG(튜브 12ARG)	19.76µl x (n + 1)	0.24µl x (n + 1)
12CYS(튜브 12CYS)	19.76µl x (n + 1)	0.24µl x (n + 1)
12SER(튜브 12SER)	19.76µl x (n + 1)	0.24µl x (n + 1)
12VAL(튜브 12VAL)	19.76µl x (n + 1)	0.24µl x (n + 1)
13ASP(튜브 13ASP)	19.76µl x (n + 1)	0.24µl x (n + 1)

\* n = 반응액 수(검체 + 대조군).

PCR 설정을 위한 여분으로 한 개의 추가 검체(n + 1)를 위한 충분한 마스터 혼합물을 준비합니다. n 값은 7 (+ 대조군)를 초과하면 안 됩니다. 7 은 한 번의 실행에 적합한 최대 검체 수입니다.

**참고:** 분석 마스터 혼합물을 준비할 때 필요한 용량의 대조 또는 돌연변이 반응 혼합물을 관련 튜브에 먼저 추가하고, 마지막으로 Taq DNA 중합효소(튜브 Taq)를 추가합니다.

- 아래 표의 배치에 따라 로딩 블록에 적절한 수의 PCR 4-스트립 튜브(각 스트립에는 4 개의 튜브가 있음)를 배치합니다. 번호는 로딩 블록 내 위치를 표시하며 최종 로터 위치를 나타냅니다. 튜브의 캡을 닫지 마십시오.

**참고:** 캡은 필요할 때까지 플라스틱 용기에 남겨 두십시오.

분석	대조물질		검체 번호						
	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
대조물질	1	9	17	25	33	41	49	57	65
12ALA	2	10	18	26	34	42	50	58	66
12ASP	3	11	19	27	35	43	51	59	67
12ARG	4	12	20	28	36	44	52	60	68
12CYS	5	13	21	29	37	45	53	61	69
12SER	6	14	22	30	38	46	54	62	70
12VAL	7	15	23	31	39	47	55	63	71
12ASP	8	16	24	32	40	48	56	64	72

5. 피펫을 총 반응 혼합물 용량보다 적은 용량으로 설정하고 위아래로 10 회 완전히 흡인하여 분석 마스터 혼합물을 완전히 혼합합니다.

**참고:** 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.

KRAS 돌연변이 검출을 위해서는 분석 마스터 혼합물을 8 개의 PC 튜브, 8 개의 NTC 튜브, 각 DNA 검체 당 8 개의 튜브에 추가해야 합니다.

6. 템플릿 없는 대조물질용 5 $\mu$ l 의 탈핵산분해효소수(튜브 NTC)를 즉시 NTC 튜브 (튜브 위치 9~16)에 추가하고 튜브 캡을 닫습니다.

7. 검체 튜브(튜브 위치 17~72)에 각 DNA 검체 5 $\mu$ l 를 추가하고 튜브 캡을 닫습니다.

8. 5 $\mu$ l 의 KRAS 양성 대조물질(튜브 PC)을 PC 튜브(튜브 위치 1~8)에 추가하고 튜브 캡을 닫습니다.

9. 유성펜으로 각 PCR 4-스트립 튜브(예: 위치 1, 5, 9 등)의 가장 낮은 숫자 위치의 첫 번째 튜브 뚜껑에 표시하여 튜브가 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기의 72-Well Rotor 에 로드되는 방향을 표시합니다.

10. 캡을 덮은 튜브를 4 회 뒤집어 검체와 반응 혼합물을 섞습니다.

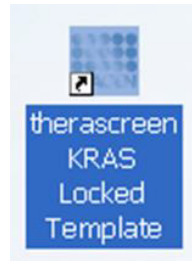
**참고:** 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.

11. 모든 PCR 4-스트립 튜브를 방향 표시를 사용하여 실행 배치에 따라 72-Well Rotor 의 적절한 위치에 배치합니다.

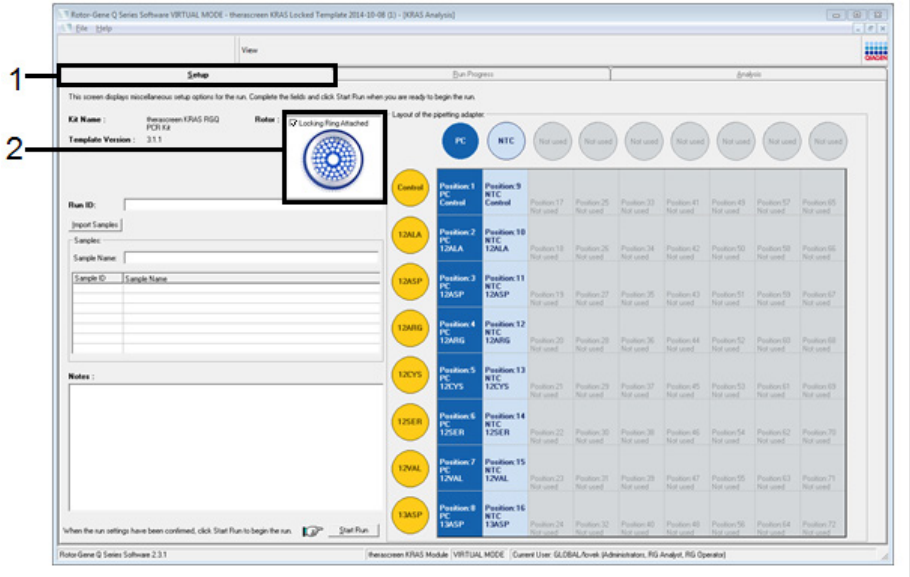
**참고:** 각 PCR 실행에 최대 7 개의 검체가 포함될 수 있습니다. 로터가 완전히 차지 않은 경우, 로터에 사용되지 않는 모든 위치를 캡이 씌워진 빈 튜브로 채워야 합니다. 이렇게 하면 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기의 열 효율이 유지됩니다.

12. Rotor-Gene Q MDx (US) 기기에 72-Well Rotor 를 배치합니다. 작동 중 튜브를 고정하기 위해 잠금 링(Rotor-Gene Q MDx (US) 기기와 함께 공급됨)을 로터 상단에 배치합니다.

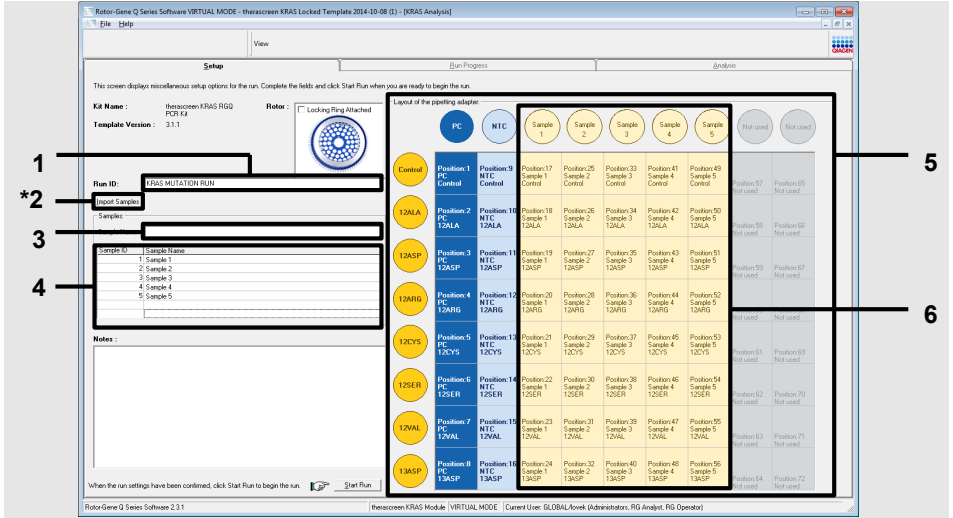
13. Rotor-Gene Q MDx (US) 기기에 연결된 노트북의 화면에서 **therascreen KRAS Locked Template**(therascreen KRAS 잠금 템플릿) 아이콘을 더블 클릭하여 Rotor-Gene Q 소프트웨어를 시작하는 동시에 템플릿을 엽니다.



14. 기본값에 따라 **Setup**(설정) 탭이 표시됩니다(1). 잠금 링이 적절히 부착되었는지 확인하고, **Locking Ring Attached**(잠금 링 부착) 상자(2)에 체크합니다. Rotor-Gene Q MDx (US) 기기 뚜껑을 닫습니다.



15. 현지 명명 규칙에 따라 **Run ID**(실행 ID) 필드(아래 예의 1)에 실행 ID 를 입력합니다.



16. 현지 명명 규칙에 따라 **Sample Name**(검체 이름) 필드(3)에 검체 이름을 입력하고 엔터 키를 누릅니다.

**중요:** 검체 이름을 입력할 때 검체 ID 가 혼동되지 않도록 주의합니다. 이렇게 하면 검체 이름이 아래의 검체 목록에 추가되고, 검체에 **Sample ID**(검체 ID)(1, 2, 3 등)가 할당됩니다. 또한 오른쪽에 있는 **Layout of the pipetting adapter**(피펫팅 어댑터 배치) 패널(5)이 검체 이름을 포함하도록 업데이트됩니다.

또는 **Import Samples**(검체 가져오기) 버튼(2)을 사용하여 \*.smp(Rotor-Gene Q 검체 파일) 또는 \*.csv(심표로 구분된 값) 형식으로 저장된 검체 이름을 가져올 수도 있습니다. 이 방법을 사용하면 검체 이름이 자동으로 채워집니다.

**참고:** **Layout of the pipetting adapter**(피펫팅 어댑터 배치) 패널에서 추가된 검체 이름이 색깔이 바뀌어 강조 표시되고, 검체 원 아래의 칼럼(6)에 여덟 개의 분석 항목이 모두 강조 표시되었는지 확인합니다.

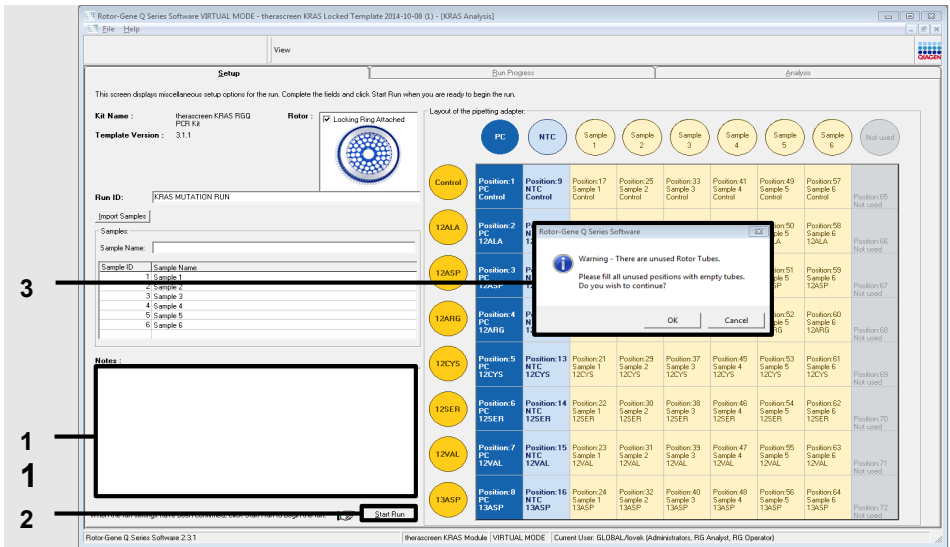
**참고:** 최대 7 개의 검체를 추가할 수 있습니다. 검체 ID(검체 원 안)에 자동으로 1~7 이 배정됩니다.

**참고:** 8 글자가 넘는 검체 이름은 **Layout of the pipetting adapter**(피펫팅 어댑터 배치) 패널에 모두 표시되지 않을 수 있습니다.

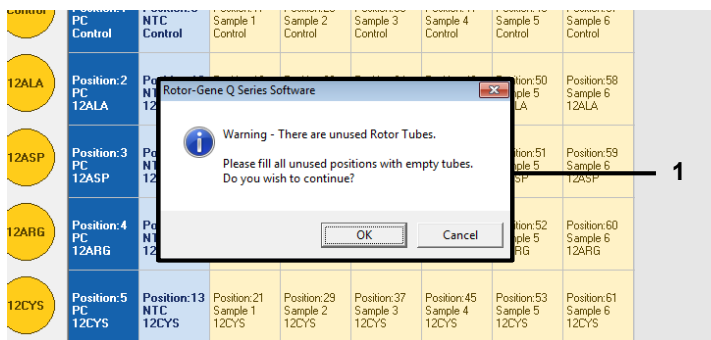
17.16 단계를 반복하여 모든 추가 검체의 이름을 입력하십시오.

**참고:** 검체 이름을 편집하려면 검체 목록(4)에서 검체 이름을 클릭합니다. 선택된 검체가 위의 **Sample Name**(검체 이름) 필드(3)에 나타납니다. 현지 명명 규칙에 따라 검체 이름을 편집하고 엔터 키를 눌러 이름을 업데이트합니다.

18. 모든 검체 이름을 입력한 후 이름이 정확한지 확인합니다. 필요하다면 **Notes**(참고) 필드(아래 예의 1)에 추가 정보를 추가하고, **Start Run**(실행 시작)(2)을 클릭합니다.

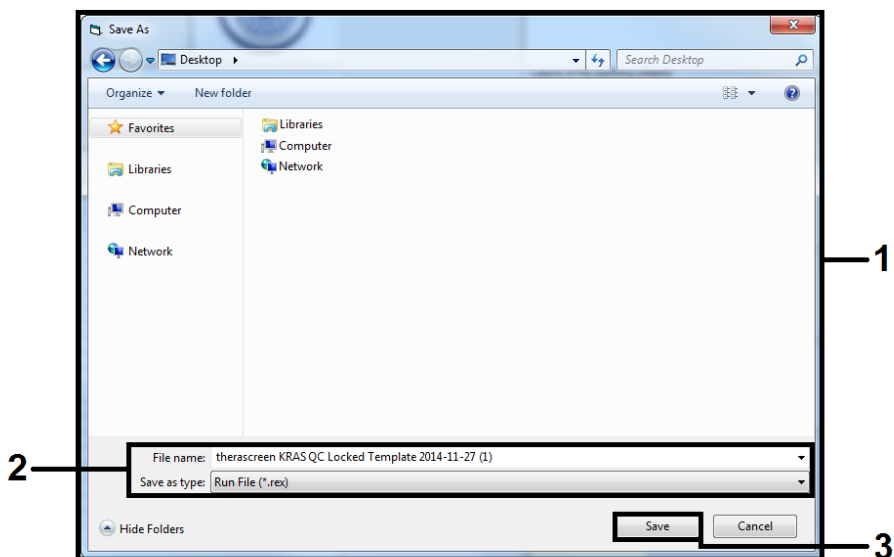


**참고:** 사용되지 않는 로터 위치가 있을 경우 경고가 표시되며(위의 3 및 아래 예의 1), 로터의 모든 미사용 위치를 캡을 씌운 빈 튜브로 채워야 함을 사용자에게 알려줍니다.



19. 모든 미사용 로터 위치가 캡을 씌운 빈 튜브로 채워졌는지 확인하고 **OK(확인)**를 눌러서 진행합니다.

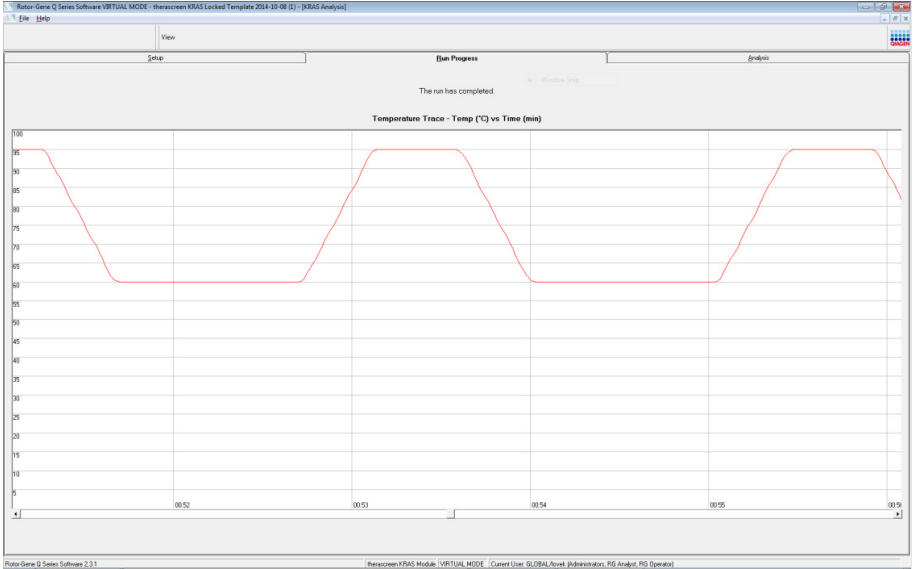
20. **Save As**(다른 이름으로 저장) 창이 열립니다(1). 적절한 파일명(2)을 선택한 후 **Save(저장)**(3)를 클릭하여 PCR 실행을 선택된 위치에 \*.rex 실행 파일로 저장합니다.





21. PCR 실행이 시작됩니다.

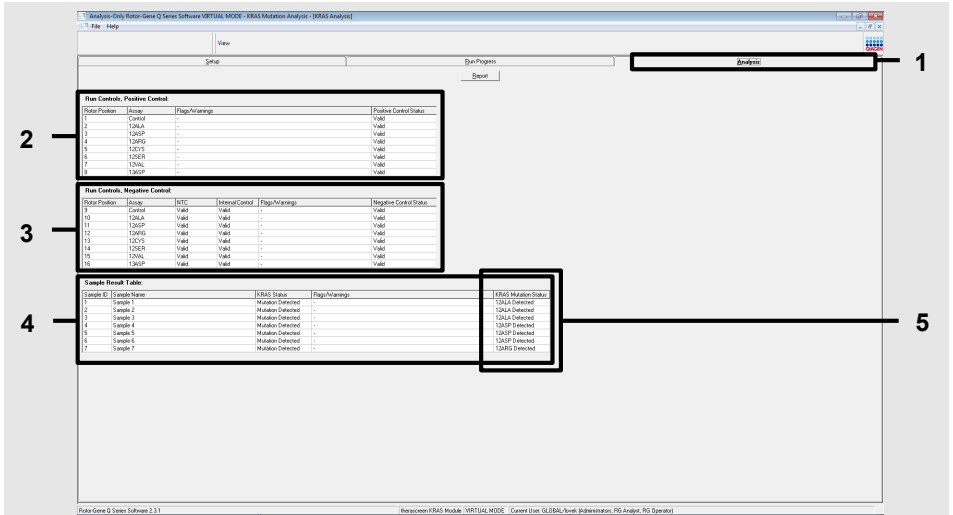
**참고:** 실행을 시작하면 **Run Progress**(실행 진행) 탭이 자동으로 열리고 온도 추적 및 남은 실행 시간이 표시됩니다.



22. 실행이 끝나면 **Analysis**(분석) 탭이 자동으로 열립니다.

**참고:** **Analysis**(분석) 탭이 열리지 않을 경우, **Analysis**(분석) 탭(1)을 클릭합니다.

**참고:** 계산 방법에 대한 설명은 52 페이지의 "분석 및 돌연변이 판정" 섹션에 나와 있습니다.



23. 분석 결과는 다음과 같이 보고됩니다.

- **Run Controls, Positive Control**(실행 대조물질, 양성 대조물질) 패널(2)

결과가 허용 범위 이내이면 **Positive Control Status**(양성 대조물질 상태)가 "Valid"(유효)로 표시되며, 그렇지 않을 경우 "Invalid"(무효) 결과가 표시됩니다.

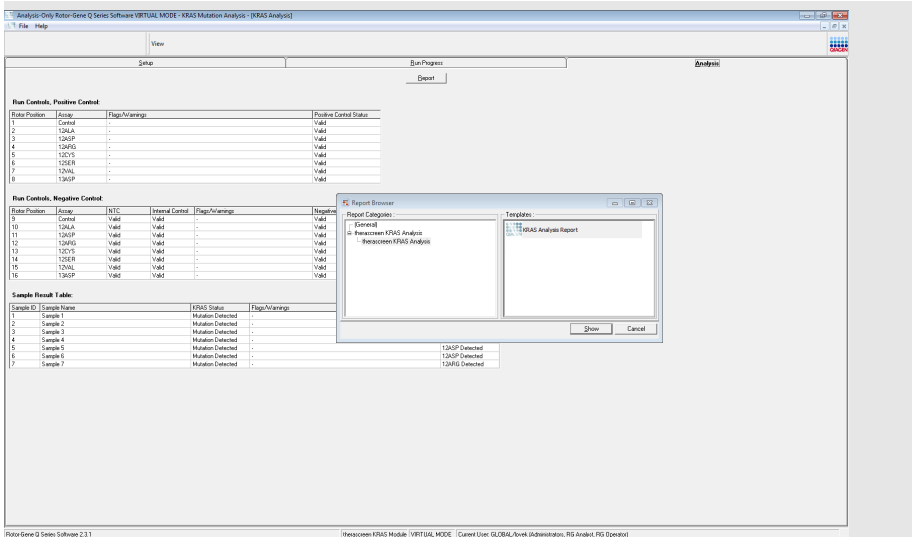
- **Run Controls, Negative Control**(실행 대조물질, 음성 대조물질) 패널(3)

NTC와 내부 대조물질 결과가 모두 허용 범위 이내이면 **Negative Control Status**(음성 대조물질 상태)가 "Valid"(유효)로 표시되고 그렇지 않으면 "Invalid"(무효) 결과가 표시됩니다.

- **Sample Result Table**(검체 결과표) 패널(4)

구체적인 돌연변이 **KRAS Mutation Status**(KRAS 돌연변이 상태) 칼럼(5) 아래에 돌연변이 양성 검체로 보고됩니다.

24. **Report(보고서)** 버튼을 클릭하여 보고서 파일을 만듭니다. **Report Browser(보고서 브라우저)** 창이 열립니다. **Templates(템플릿)**에서 **KRAS Analysis Report(KRAS 분석 보고서)**를 선택한 후 **Show(표시)**를 클릭합니다.



**참고:** 각 보고서 좌측 상단에 있는 **Save As(다른 이름으로 저장)** 버튼을 클릭하면 보고서를 다른 위치에 웹 아카이브 형식으로 저장할 수 있습니다.

**비소세포폐암 검체에만 해당하는 참고 사항:** 거짓 G12C(12CYS) 돌연변이 결과의 호출을 피하기 위해 아래 나열된 플래그가 있는 검체는 무효로 해석되어야 합니다. 플래그 해석에 대한 자세한 내용은 표 5(56 페이지)의 해석 권장 조치를 참고하십시오.

- SAMPLE\_INT\_CTRL\_EARLY\_CT
- SAMPLE\_POSITIVE\_AND\_INVALID
- SAMPLE\_INT\_CTRL\_FAIL
- MUTATION\_EARLY\_CT
- SAMPLE\_INVALID\_DATA

# 결과 해석

실행이 완료되면 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 에 의해 분석 및 돌연변이 판정이 자동으로 수행됩니다. 다음의 정보는 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 가 분석 및 돌연변이 판정을 수행하는 방법을 설명합니다.

## 분석 및 돌연변이 판정

특정 반응물의 형광도가 임계값을 초과하는 PCR 사이클을  $C_T$  값으로 정의합니다.  $C_T$  값은 특정 투입 DNA 의 양을 나타냅니다. 낮은  $C_T$  값은 높은 투입 DNA 수준을 나타내고, 높은  $C_T$  값은 낮은 투입 DNA 수준을 나타냅니다.  $C_T$  값을 보이는 반응은 양성 증폭으로 분류됩니다.

Rotor-Gene Q 소프트웨어는 기록된 두 개의 값 사이로 형광 신호를 보간합니다. 따라서  $C_T$  값은 0~40 범위 내의 어떠한 실수(정수로 한정되지 않음)도 될 수 있습니다.

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에서 임계값은 0.05 상대 형광 단위로 설정됩니다. 이 값은 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 에서 초록색 및 노란색 채널에 대하여 모두 구성됩니다. 임계값은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 개발 중에 정의되었습니다.

$\Delta C_T$  값을 결정하기 위해 다음 수식을 사용하여 계산이 수행됩니다.

$$\Delta C_T = [\text{돌연변이 분석 } C_T \text{ 값}] - [\text{대조물질 분석 } C_T \text{ 값}]$$

허용 가능한  $C_T$  값이 충족되며, 반응이 정확하게 수행되었는지 확인하기 위해 실행 대조(양성 대조물질, NTC 및 내부 대조물질)가 평가됩니다.

검체  $\Delta C_T$  값은 동일한 검체로부터의 돌연변이 분석 항목  $C_T$ 와 대조 분석 항목  $C_T$  간의 차이로 계산됩니다. 계산된 값이 해당 분석 항목의 컷오프  $\Delta C_T$  값 이하일 경우 검체가 돌연변이 양성으로 분류됩니다. 이 값보다 높으면 검체가 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 가 검출할 수

있는 돌연변이 백분율 미만(분석 한계 초과)이 포함되어 있거나, 검체가 돌연변이 음성이어서 "No Mutation Detected"(돌연변이 검출되지 않음)로 보고됩니다.

돌연변이 반응에서 증폭이 없으면 "No Mutation Detected"(돌연변이 검출되지 않음)로 분류됩니다. 배경 증폭으로 계산된  $\Delta C_T$  값이 컷오프  $\Delta C_T$  값보다 클 것으로 예상되는 경우 해당 검체는 "No Mutation Detected"(돌연변이 검출되지 않음)로 분류됩니다.

분석 결과는 "[mutation name] Detected"([돌연변이 이름] 검출), "No Mutation Detected"(돌연변이 검출되지 않음), "Invalid"(무효) 또는 실행 대조가 실패일 경우, "Run Control Failed"(실행 대조 실패)로 표시됩니다. 돌연변이 양성 검체의 경우, 구체적인 돌연변이가 보고됩니다. 표시될 수 있는 다른 가능한 결과는 본 사용 지침의 "프로토콜: DNA 검체 평가" 및 "문제 해결 가이드" 섹션에 설명되어 있습니다.

Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 에서 생성한 플래그에 대한 해석은 "Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 플래그"를 참고하십시오.

**참고:** 드물게, 한 개의 종양에 둘 이상의 돌연변이가 포함되어 있을 수 있습니다. 그런 경우, 최저  $\Delta C_T$  값을 산출하는 돌연변이가 식별됩니다.

## Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 플래그

결장직장암 및 비소세포폐암 검체의 특정 용도에 따라 특정 플래그와 관련된 특정 작업이 있습니다. 각 표시에 대한 플래그와 관련된 작업은 다음 섹션에 자세히 설명되어 있습니다.

### 비소세포폐암 및 결장직장암 모두에 관련된 플래그

표 4는 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package에 의해 생성될 수 있는 플래그, 플래그의 의미 및 취해야 할 조치를 보여줍니다.

**표 4. Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 플래그 의미 및 권장 조치**

플래그	의미	조치
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR 실행 무효 — FAM C <sub>1</sub> 가 대조 반응에서 양성 대조물질의 범위를 벗어났습니다	전체 PCR 실행을 반복합니다.
PC_MUTATION_INVALID_DATA	PCR 실행 무효 — 양성 대조물질(돌연변이 반응 혼합물)의 형광 데이터를 해석할 수 없습니다	전체 PCR 실행을 반복합니다.
NTC_INT_CTRL_FAIL	PCR 실행 무효 — 내부 대조물질이 음성 대조물질의 범위를 초과합니다	전체 PCR 실행을 반복합니다.
NTC_INT_CTRL_EARLY_CT	PCR 실행 무효 — 내부 대조물질이 음성 대조물질의 범위 미만입니다	전체 PCR 실행을 반복합니다.
NTC_INVALID_CT	PCR 실행 무효 — 음성 대조물질에 대해 FAM이 무효입니다(한도보다 작음)	전체 PCR 실행을 반복합니다.
NTC_INVALID_DATA	PCR 실행 무효 — 음성 대조물질의 형광 데이터를 해석할 수 없습니다	전체 PCR 실행을 반복합니다.
SAMPLE_CTRL_INVALID_DATA	검체 무효 — 검체 대조군의 형광 데이터를 해석할 수 없습니다	새로운 PCR 실행을 설정하여 관련 검체를 반복합니다.

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

**표 4. Rotor-Gene Q thescreen KRAS Assay Package 플래그 의미 및 권장 조치(계속)**

플래그	의미	조치
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC	검체 무효 – 검체 대조물질에서 FAM C <sub>T</sub> 가 너무 낮습니다	검체를 희석하여 대조 C <sub>T</sub> 값을 높입니다. 이 희석은 키트로 제공된 물을 사용하여 1:1 로 희석했을 때 C <sub>T</sub> 값이 1.0 증가하는 것으로 가정하여 계산해야 하며, 검체가 희석되면 새로운 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다.
SAMPLE_CTRL_FAIL	검체 무효 – 검체 대조 반응의 FAM C <sub>T</sub> 가 너무 높습니다	새로운 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편(≥4 개 절편)에서 검체를 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효이면 이 두 번째 추출물을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.

## 비소세포폐암 전용 플래그

표 5는 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package에 의해 생성될 수 있는 플래그, 플래그의 의미 및 비소세포폐암 검체에 대해 취해야 할 조치를 보여줍니다.

**표 5. Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 플래그 의미 및 비소세포폐암 검체에 대한 권장 조치**

플래그	의미	조치
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	내부 대조물질(HEX)의 CT 값이 너무 높음(또는 CT 값이 없음), FAM 채널 돌연변이 음성	거짓 G12C(12CYS) 돌연변이 결과를 무효로 해석해야 합니다. 나머지 검체를 DIL로 표시된 튜브의 물로 1/8로 희석하여 최종 부피가 40µl를 초과하도록 하고(예: DIL로 표시된 튜브의 DNA 10µl 및 물 70µl) 새 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편에서 검체를 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 유효하지 않은 경우 나머지 검체를 DIL로 표시된 튜브의 물로 1/8로 희석하여 최종 부피가 40µl를 초과하도록 한 다음 해당 희석을 테스트합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	돌연변이 튜브 무효 - 검체(내부 대조물질)의 CT HEX가 너무 낮음	새로운 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편에서 검체를 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효이면 이 두 번째 추출물을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.

다음 페이지에서 표 계속



이전 페이지로부터 표 계속

**표 5. Rotor-Gene Q iherascreen KRAS Assay Package 플래그 의미 및 비소세포암 검체에 대한 권장 조치**

플래그	의미	조치
SAMPLE_INVALID_DATA	돌연변이 튜브 무효 - 내부 대조물질의 형광 데이터를 해석할 수 없음	새로운 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편에서 검체를 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효이면 이 두 번째 추출물을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
MUTATION_EARLY_CT	돌연변이 튜브 무효 - 검체의 CT FAM 이 너무 낮음.	새로운 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편에서 검체를 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효이면 이 두 번째 추출물을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	하나의 검체에서 한 개 이상의 돌연변이가 유효하고 양성이지만, 동시에 동일한 검체의 한 개 이상의 돌연변이가 무효입니다(경고, 오류 아님)	새로운 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편에서 검체를 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효이면 이 두 번째 추출물을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.

## 결장직장암 전용 플래그

아래 표는 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 에 의해 생성될 수 있는 플래그, 플래그의 의미 및 결장직장암 검체에 대해 취해야 할 조치를 보여줍니다.

**표 6. Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 플래그 의미 및 결장직장암 검체에 대한 권장 조치**

플래그	의미	조치
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL	내부 대조물질(HEX)의 CT 값이 너무 높음(또는 CT 값이 없음), FAM 채널 돌연변이 음성	검체에 유효 상태가 부여된 경우 - 조치 없음.  검체에 무효 상태가 부여되면 새로운 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편에서 검체를 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효이면 이 두 번째 추출물을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT	돌연변이 튜브 무효 - 검체(내부 대조물질)의 CT HEX 가 너무 낮음	검체에 유효 상태가 부여된 경우 — 조치 없음.  검체에 무효 상태가 부여되면 새로운 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편에서 검체를 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효이면 이 두 번째 추출물을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

**표 6. Rotor-Gene Q iherascreen KRAS Assay Package 플래그 의미 및 결장직장암 검체에 대한 권장 조치(계속)**

플래그	의미	조치
SAMPLE_INVALID_DATA	돌연변이 튜브 무효 – 내부 대조물질의 형광 데이터를 해석할 수 없음	검체에 유효 상태가 부여된 경우 – 조치 없음.  검체에 무효 상태가 부여되면 새로운 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편에서 검체를 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효이면 이 두 번째 추출물을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
MUTATION_EARLY_CT	돌연변이 튜브 무효 - 검체의 CT FAM 이 너무 낮음.	검체에 유효 상태가 부여된 경우 – 조치 없음.  검체에 무효 상태가 부여되면 새로운 PCR 실행을 설정하여 검체를 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편에서 검체를 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효이면 이 두 번째 추출물을 반복합니다. 이 실행 후에도 검체가 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 검체에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID	하나의 검체에서 한 개 이상의 돌연변이가 유효이고 양성이지만, 동시에 동일한 검체의 한 개 이상의 돌연변이가 무효입니다(경고, 오류 아님)	없음.

# 문제 해결 가이드

이 문제 해결 가이드는 발생 가능한 문제를 해결하는 데 도움을 줄 수 있습니다. 기술 지원 및 자세한 정보는 [www.qiagen.com/Support](http://www.qiagen.com/Support) 에서 기술 지원 센터를 참조하십시오(연락처 정보는 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 에서 확인하실 수 있습니다).

## 의견 및 제안

### 무효 결과

- a) 한 개 이상의 키트 구성품의 보관 조건이 시약 보관 및 취급"(21 페이지)에 제공된 지침에 부합하지 않았습니까?  
시약의 보관 조건과 유통 기한(라벨 참조)을 확인하고, 필요한 경우 새 키트를 사용합니다.
  
- b) *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 유통 기한이 만료되었습니다.  
시약의 보관 조건과 유통 기한(키트 라벨 참조)을 확인하고, 필요한 경우 새로운 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 사용합니다.

### NTC 검체가 FAM 채널에서 양성 결과를 나타냅니다

- PCR 준비 중 오염이 발생했음  
새 시약으로 PCR을 반복 실행합니다.  
가능하면, 검사할 검체를 추가한 후에 바로 PCR 튜브를 닫으십시오.  
작업 공간과 기기의 오염을 정기적으로 제거해야 합니다.

# 정도 관리

QIAGEN의 ISO 인증 품질 관리 시스템에 따라 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 각 로트는 일관된 제품 품질을 보장하기 위해 사전 결정된 사양에 따라 테스트됩니다.

# 금기 사항

알려진 금기 사항은 없습니다.

# 제한 사항

이 테스트는 *KRAS* 유전자의 코돈 12 및 13의 7가지 돌연변이를 검출하도록 설계되었습니다. 결과가 "No Mutation Detected"(돌연변이 검출되지 않음)로 보고되는 검체는 이 분석으로 검출되지 않는 *KRAS* 돌연변이(*G13C*)를 포함하고 있을 수 있습니다.

돌연변이의 검출은 검체의 무결성과 시료에 존재하는 증폭 가능한 DNA의 양에 따라 달라집니다. 검체 내 DNA의 최초 평가 결과 검체의 양이 돌연변이 분석에 충분하지 않거나 너무 많은 경우에는 절차를 반복해야 합니다.

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit는 중합효소 연쇄 반응(Polymerase Chain Reaction, PCR) 절차에 사용됩니다. 모든 PCR 절차에서와 마찬가지로 검체가 검사 환경의 외부 DNA 소스나 양성 대조물질의 DNA로 오염될 수 있습니다. 검체 및 반응 혼합물 시약이 오염되지 않도록 주의하십시오.

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit는 질병의 진단에 사용되지 않습니다.

비소세포폐암 검체의 경우 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 KRAS G12C 돌연변이 확인을 위한 것입니다. 이 테스트는 각 돌연변이 반응이 측정되는 구체적인 돌연변이에 대하여 가장 민감하도록 설계되었습니다. 그러나 돌연변이가 검출된 검체에서 다른 돌연변이 반응과의 교차 반응이 발생할 수 있습니다. 둘 이상의 돌연변이 반응이 양성이면 결과는 최저  $\Delta$ CT 값을 갖게 됩니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 포르말린 고정 파라핀 포매 결장직장암 조직 및 비소세포폐암 조직에 대하여만 검증되었습니다.

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 와 함께 사용하는 경우에 대해서만 검증되었습니다. Rotor-Gene Q MDx 기기만 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 와 함께 사용하도록 검증되었습니다.

# 결장직장암 시료의 성능 특징

## 분석 성능

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 구체적인 성능 특징은 결장직장암 환자에게서 채취한 FFPE 조직 검체 및 8 개의 FFPE 사람 세포주(분석으로 검출된 7 개의 알려진 KRAS 돌연변이와 1 개의 KRAS 야생형(즉, 코돈 12 및 13 에 돌연변이가 없음))를 사용한 연구에서 결정되었습니다. 검체의 돌연변이 상태는 양방향 생어 염기서열 분석법으로 확인했습니다.

## 컷오프

분석을 위한 컷오프를 설정하기 위하여 220 개의 FFPE 검체를 NCCLS EP17-A(20)의 지침에 따른 방법을 사용하여 테스트했습니다. 대조군 반응  $C_T$  범위는 21.92~32.00 로 확정되었습니다. 돌연변이 반응의  $C_T(\Delta C_T)$ 에서 뺀 대조 반응  $C_T$ 에 기초한 컷오프 값을 표 7 에서 볼 수 있습니다.

표 7. 각 돌연변이 분석의 확정된 컷오프 값

	돌연변이 분석						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
컷오프( $\leq \Delta C_T$ )	8.0	6.6	8.0	8.0	8.0	7.5	7.5

## 공백 한계

돌연변이 양성 템플릿이 없는 상태에서 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 성능을 평가하기 위해 그리고 공백 검체가 낮은 농도의 돌연변이를 나타낼 수 있는 분석 신호를 생성하지 않도록 템플릿이 없는 검체를 평가했습니다. 결과는 어떤 돌연변이 또는 대조 반응 튜브도 검출 가능한 대조 또는 돌연변이  $C_T$  값을 보이지 않았습니다(내부 대조물질  $C_T$  값은 모두 유효했음).

## 분석 표준 방법과의 비교

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 테스트된 결장직장암 검체의 돌연변이 상태와 양방향 염기서열 분석과의 일치율을 확인하기 위한 두 건의 연구가 실시되었습니다. 첫 번째 연구에서는 베이스라인 임상, 인구 통계 및 종양 표본 특징에 기초하여 결장직장암 환자들로부터 입수한 350 개의 종양 검체를 선택했습니다. 통계적 무작위 샘플링 기법을 사용하여 돌연변이 상태가 알려지지 않은 150 개의 검체를 평가를 위해 선정했습니다. 이 연구에서는 이 150 개의 FFPE 검체를 테스트하고, 이어서 CLSI EP12-A2 Guidance(21)의 일치/불일치 통계 척도를 사용하여 분석했습니다. 총 137 개의 FFPE 검체가 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 및 양방향 염기서열 분석에서 모두 유효한 결과를 나타냈습니다.

그 결과 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 2 개의 검체를 음성으로 보고했는데, 그 중 1 개에 대하여 양방향 염기서열 분석은 12ASP 양성을 판정했고, 다른 한 개는 양방향 염기서열 분석에서 13ASP 로 나타났습니다. 반면에 3 개의 검체는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에 의해 KRAS 돌연변이를 갖고 있는 것으로 보고되었는데, 양방향 염기서열 분석에서는 양성으로 보고되지 않았습니다. 또한 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에 의해 12ARG 로 식별된 1 개의 검체는 양방향 염기서열 분석에서 12ASP 로 판정되었습니다. 양방향 염기서열 분석에서 돌연변이 음성으로 결정된 5 개의 검체는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에서 불확정(3 개 검체) 또는 무효(2 개 검체)였습니다(데이터 미표시). 생어 양방향 염기서열 분석에서 불확정이었던 한 개의 검체는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에서는 12SER 로 판정되었습니다(데이터 미표시).

이런 결과는 양성 일치율(Positive Percent Agreement, PPA) 96.3%, 음성 일치율(Negative Percent Agreement, NPA) 96.3%, 전체 일치율(Overall Percent Agreement, OPA) 96.4%를 나타냈습니다. 6 개의 실패한 생어 검체를 제외한 전체 결과를 각 95% 신뢰 구간(Confidence Interval, CI)과 함께 표 8 에 표시되어 있습니다.



## 표 8. 일치 분석

일치율 측정	빈도(%)	95% CI
전체 일치율	132/137(96.35)	92.69~98.21
양성 일치율	52/54(96.30)	89.41~98.77
음성 일치율	80/83(96.39)	91.30~98.55

표 9(다음 페이지)는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 와 양방향 염기서열 분석 간 일치에 대한 세부 사항을 보여줍니다.

표 9. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vs. 생어 양방향 염기서열 분석

양방향 염기서열 분석의 돌연변이 판정

KRAS Kit 의 판정	음성	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	총계
음성	80	-	-	1	-	-	-	1	82
12ALA	-	3	-	-	-	-	-	-	3
12ARG	-	-	-	1	-	-	-	-	1
12ASP	-	-	-	20	-	-	-	-	20
12CYS	-	-	-	-	3	-	-	-	3
12SER	-	-	-	-	-	-	-	-	0
12VAL	2	-	-	-	-	-	14	-	16
13ASP	1	-	-	-	-	-	-	11	12
총계	83	3	0	22	3	0	14	12	137

첫 번째 연구의 데이터를 보충하기 위하여 두 번째의 검체 세트를 평가했습니다. 271 개의 CRC FFPE 검체 세트를 확보하여 돌연변이 상태가 알려지지 않은 250 개의 검체와 희귀 돌연변이를 증대하기 위해 돌연변이 상태가 알려진 21 개의 검체를 위에서 설명한 생어 양방향 염기서열 분석과 비교했습니다.

총 13 개(~5%)의 검체에서 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 평가를 위해 육안 절제가 필요했습니다. 양방향 염기서열 분석 결과가 나온 271 개의 검체 중에서 24 개는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에서 불확정이었습니다(실패한 대조 C<sub>T</sub> 범위, 데이터 미표시). 일치율 분석은 유효한 양방향 및 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 결과를 보인 247 개 검체에 대하여 실시되었습니다. 9 개의 불일치 검체가 있었습니다. 247 개 검체 중 한 개는 양방향 염기서열 분석에서 돌연변이 양성 결과를 보였으나 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에서는 "No Mutation Detected"(돌연변이 검출되지 않음) 결과를 보였습니다. 여덟 개의 검체는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에서 양성 결과를 보였으나 양방향 염기서열 분석에서는 음성 결과를 보였습니다. 전체적으로 일치율은 96.4%였습니다. 이 데이터는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 정확한 성능을 뒷받침합니다(표 10 및 표 11).

**표 10. 일치 분석(두 번째 연구)**

일치율 측정	빈도(%)	95% CI
전체 일치율	238/247(96.36)	93.73~98.09
양성 일치율	106/107(99.07)	95.64~99.95
음성 일치율	132/140(94.29)	89.93~97.13

표 11(다음 페이지)은 두 번째 연구의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 와 양방향 염기서열 분석 간의 일치에 대한 세부 사항을 보여줍니다.

표 11. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit vs. 생어 양방향 염기서열 분석(두 번째 연구)

양방향 염기서열 분석의 돌연변이 판정

KRAS Kit 의 판정	음성	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	총계
음성	132	-	-	-	-	1	-	-	133
12ALA	-	10	-	-	-	-	-	-	10
12ARG	5	-	5	-	-	-	-	-	10
12ASP	-	-	-	31	-	-	-	-	31
12CYS	1	-	-	-	11	-	-	-	12
12SER	-	-	-	-	-	13	-	-	13
12VAL	2	-	-	-	-	-	25	-	27
13ASP	-	-	-	-	-	-	-	11	11
총계	140	10	5	31	11	14	25	11	247

## 검출 한계(Limit of Detection, LOD)

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 작동 범위는 시료 내 증폭 가능 DNA 의 양에 기준으로, 대조 반응  $C_T$  값으로 결정됩니다. 분석의 명시된 투입 범위는 대조  $C_T$  사전 지정 범위 21.92~32.00 로 정의되었습니다. LOD 란 총 증폭 가능 DNA 가 명시된 투입 범위 내에 있으면서 여전히 임계 컷오프  $\Delta C_T$  값 미만일 때 야생형의 배경에서 검출될 수 있는 돌연변이 DNA 의 최소 백분율입니다.

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에 포함된 7 가지의 각 돌연변이 특이적 반응의 LOD 를 측정하기 위한 연구가 수행되었습니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 경우, 야생형 DNA 배경에서의 돌연변이 DNA 검출 한계는 각 돌연변이 양성 검체의 테스트 복제본의 95%가 양성으로 판정된 최저 희석 인자로 정의됩니다. 여덟 개의 FFPE 세포주(돌연변이 DNA 함량이 알려진 7 개와 1 개의 야생형)가 이 평가에 사용되었습니다.

총 증폭 가능 DNA 중 돌연변이의 비율(돌연변이 DNA 의 백분율)은 먼저 고정되지 않은 세포에서 양방향 생어 염기서열 분석법으로 측정한 후 상대적 피크 분석을 사용하여 결정되었습니다. 3 개의 세포주의 경우, 돌연변이 함량은 100%였습니다(즉, 세포주 DNA 가 동형접합 돌연변이체임). 다른 세포주들은 혼합된 접합체였습니다. 각 검체로부터 여러 개의 DNA 추출물을 모아서 DNA 스톱을 만들었습니다. 그런 다음, DNA 스톱을 정규화하여 표적 대조 반응  $C_T$  값을 얻었습니다. 정규화된 돌연변이 DNA 추출물을 정규화된 야생형 DNA 추출물로 희석하여 총 증폭 가능 DNA 의 수준은 동일하지만 돌연변이 DNA 수준은 상이한 추출물 희석 시리즈를 만들었습니다. 그런 다음, 이 검체들로부터 연속적 희석물을 만들어 여러 개의 복제본으로 테스트를 실행했습니다.

첫 번째 희석 시리즈는 중간 범위의 대조 반응  $C_T$  값(약 26)으로 만들어졌습니다. 희석물당 아홉 개의 복제본을 테스트했습니다. 각 돌연변이 반응에서 희석의 함수로서 정확한 판정의 백분율은 표 12 에 나와 있습니다. 강조 표시된 상자는 복제본의 95% 이상이 정확한 판정을 받은 백분율을 나타냅니다.

표 12. 각 돌연변이 반응에 대한 희석의 함수로서 정확한 판정의 백분율

돌연변이 희석(%)	정확한 판정(%)						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
0.78	100	0	33.3	55.6	22.2	66.7	0
1.56	100	33.3	100	100	88.9	100	0
3.13	100	77.8	100	100	100	100	66.7
6.25	100	100	100	100	100	100	100
12.5	100	100	100	100	100	100	100
25.0	100	100	100	100	100	100	100
50.0	100*	100	100	100	100	100	100

\* 이 검체의 돌연변이 희석은 40.0%였습니다.

첫 번째 희석 시리즈의 결과는 낮은 수준과 높은 수준이 모두 분석의 투입 범위 이내인 보다 좁은 반응 특이적 범위의 백분율 돌연변이 희석을 사용하여 LOD 값을 확인하기 위한 희석물을 만드는 데 사용되었습니다. 높은 희석 시리즈의 경우, 각각 12 개의 복제본이 평가되었습니다. 높은 희석 시리즈(목표값은 대략  $C_T$  23~24)에서 희석의 함수로서 정확한 판정의 백분율이 표 13 에 나와 있습니다. 강조 표시된 상자는 복제본의 95% 이상이 정확한 판정을 받은 백분율을 나타냅니다.

표 13. 높은 희석 시리즈에 대해 희석의 함수로서 정확한 판정의 백분율

돌연변이	돌연변이 희석 높음(%)					
12ALA	0.13	0.27	0.54	1.08	2.15	4.30
정확한 판정(%)	0	0	91.7	100	100	100
12ASP	0.56	1.13	2.25	4.50	9.00	18.00*
정확한 판정(%)	0	8.3	3.33	83.3	100	100
12ARG	0.16	0.33	0.65	1.30	2.60	5.20
정확한 판정(%)	0	0	8.3	100	100	100
12CYS	0.12	0.24	0.49	0.98	1.95	3.90
정확한 판정(%)	0	0	8.3	83.3	100	100
12SER	0.31	0.63	1.25	2.50	5.00	10.00
정확한 판정(%)	0	0	33.3	66.7	100	100
12VAL	0.17	0.34	0.69	1.38	2.75	5.50
정확한 판정(%)	0	0	16.7	100	100	100
13ASP	0.63	1.25	2.50	5.0	10.0	20.0
정확한 판정(%)	0	0	0	100	100	100

\* 유효한 복제본의 수는 11 이었습니다.

낮은 시리즈에서는 명시된 경우를 제외하고, 희석당 24 개의 복제본을 평가했습니다. 낮은 희석 시리즈(목표값은 C<sub>T</sub> 31)에 대한 희석의 함수로서 정확한 판정의 백분율이 표 14 에 나와 있습니다. 강조 표시된 상자는 복제본의 95% 이상이 정확한 판정을 받은 백분율을 나타냅니다.

표 14. 낮은 희석 시리즈에 대한 희석의 함수로서 정확한 판정의 백분율

돌연변이	돌연변이 희석 높음(%)						
12ALA	0.27	0.54	1.08	2.15	4.30	8.60	12.90
정확한 판정(%)	12.5	20.8	33.3	83.3	100	100	100
12ASP	0.56	1.13	2.25	4.50	9.00	18.0	27.0
정확한 판정(%)	0	8.3	3.33	83.3	100	100	100
12ARG	0.33	0.65	1.30	2.60*	5.20	10.40	15.60
정확한 판정(%)	8.3	4.2	29.2	52.2	95.8	100	100
12CYS	0.24	0.49	0.98	1.95	3.90	7.80	11.70
정확한 판정(%)	8.3	4.2	20.9	54.2	83.3	100	100
12SER	0.63	1.25	2.50	5.00	10.0	20.0	30.0
정확한 판정(%)	0	0	8.3	33.3	70.9	83.3	100
12VAL†	0.34	0.69	1.38	2.75	5.50	11.0	16.50
정확한 판정(%)	4.3	16.7	46.7	75.0	100	100	100
13ASP	0.63	1.25	2.50	5.0	10.0	20.0	30.0
정확한 판정(%)	0	4.2	8.3	33.3	70.8	100	100

\* 2.60 희석에서 12ARG의 유효한 복제본의 수는 23이었습니다.

† 이 시리즈에서 12VAL의 유효한 복제본의 수는 23, 24, 15, 16, 13, 12, 19였습니다.

낮은 투입 및 높은 투입 DNA 데이터셋에서 로지스틱 회귀 모델이 각 분석에 개별적으로 적용되었습니다. 이 모델에서 반응 변수는 검출된 돌연변이(검출 = 1)와 검출되지 않은 돌연변이(검출 = 0)의 이진 출력이었고, 연속 설명 변수는  $\log_2\%$  돌연변이 희석이었습니다. LOD는 예측 검출 확률 0.95인 돌연변이 희석 비율로 계산되었습니다. 낮은  $C_T$  값 또는 높은  $C_T$  값으로 시작하는 희석 시리즈로부터 결정된 LOD가 표 15에 나와 있습니다.



**표 15. 낮은 CT 및 높은 CT 희석 시리즈에 대한 로지스틱 회귀 데이터(LOD)**

분석	낮음	높음
12ALA	4.25	0.56
12ASP	10.23	6.43
12ARG	7.27	0.87
12CYS	6.90	1.21
12SER	25.75	4.20
12VAL	5.17	0.90
13ASP	18.83	4.16

투입  $C_T$  값이 대략 22~27  $C_T$  일 때 FFPE 세포주를 사용한 최종 LOD 값이 표 16 에 나와 있습니다.  $C_T$  투입 범위의 하단에서는 분석의 민감도가 하락합니다. 투입 DNA 의 양은 작동 범위의 높은 지점과 중간 지점에서 관찰되는 백분율의 야생형 대 돌연변이 DNA 의 동일한 백분율을 뒷받침하기에 충분한 사본을 포함하지 않을 수 있습니다.

**표 16. FFPE 세포주를 사용한 각 돌연변이에 대한 LOD 값**

분석	LOD <sub>95</sub> (야생형 DNA 내 돌연변이 DNA 의 백분율)
12ALA	0.8
12ASP	6.4
12ARG	2.6
12CYS	1.5
12SER	5.6
12VAL	1.6
13ASP	6.4

## 투입 DNA 의 영향

총 DNA 수준이 다양한 검체들이 동일한 비율의 돌연변이 DNA 를 포함하고 있으면 측정된  $\Delta C_T$  값은 일관성을 유지할 것으로 예상됩니다. 이 연구의 목적은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 성능이 분석의 총 DNA 투입(대조  $C_T$ ) 범위에서 일관성이 있음을 입증하는 것이었습니다. 8 개의 FFPE 세포주에서 추출한 DNA 를 사용하여 달성 가능한 가장 낮은 대조 반응  $C_T$  를 가진 DNA 의 풀을 준비했습니다. 이후 농축된 DNA 스톱을 희석하여 작동 범위에 걸친 DNA 를 만들었습니다(초기 농축 스톱을 포함한 총 5 개의 희석물).

작동 범위 내의 각 지점에서 6 개의 복제 테스트를 수행하기에 충분한 재료가 준비되었습니다. 각 돌연변이 반응의 희석 범위와 결과에서 얻은 평균  $\Delta C_T$  값이 표 17 에 나와 있습니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 검출된 각 돌연변이의 경우, 분석의 작동 범위에 걸친 다양한 총 DNA 투입 수준에서 측정된  $\Delta C_T$  값은 연구에서 사전 설정된 수용 기준을 통과했습니다. DNA 투입이 증가할 때  $\Delta C_T$  에 약간의 증가가 있지만  $\Delta C_T$  값은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 작동 범위에 걸쳐 사전 지정된 수용 기준 이내로 일관되게 나타났습니다.

**표 17. DNA 투입이 투입 대조 반응  $C_T$  범위에서  $\Delta C_T$  값에 미치는 영향 - FFPE 세포주**

	희석 1	희석 2	희석 3	희석 4	희석 5
<b>돌연변이</b>	약 20~21 $C_T$	약 23~24 $C_T$	약 26~27 $C_T$	약 29~30 $C_T$	약 32~33 $C_T$
12ALA	1.56	1.25	1.16	1.14	1.27
12ASP*	2.46	2.18	2.11	2.11	1.75
12ARG	1.18	0.63	1.08	0.94	1.06
12CYS	0.29	0.25	0.15	0.26	-0.1

\* 12ASP 의 총 복제수는 27 이었습니다.

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

표 17. DNA 투입이 투입 대조 반응 CT 범위에서 ΔCT 값에 미치는 영향 – FPPE 세포주(계속).

	희석 1	희석 2	희석 3	희석 4	희석 5
<b>돌연변이</b>	약 22~23 C <sub>T</sub>	약 24~25 C <sub>T</sub>	약 27~28 C <sub>T</sub>	약 29~30 C <sub>T</sub>	약 32~33 C <sub>T</sub>
12SER	2.91	2.21	2.15	2.15	2.08
12VAL	0.98	0.71	0.58	0.81	0.67
13ASP	3.57	2.84	2.54	2.46	2.62

### DNA 투입의 함수인 선형성/증폭 효율

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 작동 범위에 걸쳐 각 돌연변이 반응에서의 PCR의 선형성 및 증폭 효율을 대조 반응과 비교하여 입증했습니다. 각 돌연변이 반응 및 대조 반응에서 증폭 효율은  $[2^{-(1/\text{기울기})}] - 1$ 로 계산되었습니다. 돌연변이 반응에 비해 대조군의 증폭 효율은  $\Delta C_T$ (즉, 돌연변이 판정)가 분석의 작동 범위에서 일관성을 보인다는 것을 나타냅니다. 대조 반응과 돌연변이 반응 간 증폭 효율의 최대 차이는 13ASP 분석에서 관찰되었으며, 효율의 평균적 차이는 약 14.5%였습니다. 데이터는 표 18에 요약되어 있습니다.

표 18. 증폭 효율(DNA 투입의 함수) 데이터 요약

검체	절편	절편 표준 오차	계산된 기울기	표준 오차(기울기)	양측 95% 신뢰 하한(기울기)	양측 95% 신뢰 상한(기울기)	증폭 효율	증폭 효율의 차이
<b>12ALA</b>	대조물질 C <sub>T</sub>	21.060	-1.008	0.007	-1.023	-0.993	<b>0.989</b>	0.03
	12ALA C <sub>T</sub>	22.476	-0.987	0.013	-1.013	-0.961	<b>1.019</b>	
<b>12ASP</b>	대조물질 C <sub>T</sub>	20.825	-1.035	0.01	-1.056	-1.014	<b>0.954</b>	0.056
	12ASP C <sub>T</sub>	23.237	-0.993	0.011	-1.016	-0.97	<b>1.01</b>	
<b>12ARG</b>	대조물질 C <sub>T</sub>	20.385	-1.013	0.16	-1.046	-0.98	<b>0.982</b>	-0.003
	12ARG C <sub>T</sub>	21.347	-1.015	0.008	-1.032	-0.999	<b>0.979</b>	
<b>12CYS</b>	대조물질 C <sub>T</sub>	23.437	-0.981	0.01	-1.003	-0.96	<b>1.026</b>	0.032
	12CYS C <sub>T</sub>	24.289	-0.961	0.006	-0.974	-0.947	<b>1.058</b>	
<b>12SER</b>	대조물질 C <sub>T</sub>	22.568	-1.003	0.008	-1.02	-0.986	<b>0.996</b>	0.105
	12SER C <sub>T</sub>	25.212	-0.934	0.014	-0.963	-0.904	<b>1.101</b>	
<b>12VAL</b>	대조물질 C <sub>T</sub>	21.208	-0.995	0.006	-1.007	-0.983	<b>1.007</b>	0.033
	12VAL C <sub>T</sub>	21.532	-0.972	0.005	-0.983	-0.961	<b>1.04</b>	
<b>13ASP</b>	대조물질 C <sub>T</sub>	23.207	-1.001	0.009	-1.02	-0.982	<b>0.999</b>	0.145
	13ASP C <sub>T</sub>	26.466	-0.909	0.017	-0.945	-0.873	<b>1.144</b>	

## 돌연변이 비율에 따른 선형성/증폭 효율

이 연구의 목적은 연속적으로 희석된 돌연변이 양성 검체가 증폭 효율에 미치는 영향을  $C_T$  투입 수준을 약 22~23  $C_T$ 에서부터 시작해서 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 작동 범위에 걸쳐 평가하는 것이었습니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 LOD 값은 초기에 FFPE 세포주에서 추출한 DNA 를 사용하여 결정되었습니다. 그런 다음, 대조 반응  $C_T$ 가 ~23  $C_T$ 에 해당하는 DNA 스톡을 준비했습니다. 이 스톡을 야생형 DNA 를 사용하여 매년 2 배씩 연속적으로 희석하여 템플릿의 총 야생형 DNA 는 일정하게 유지하면서 돌연변이 DNA 비율을 변화시켰습니다. 따라서 생성된 각 템플릿은 동일한 절대량 및 농도의 DNA 를 가졌지만 야생형 대 돌연변이 DNA 의 비율은 달랐습니다.

돌연변이 당 6 개의 복제본에 충분한 DNA 풀이 준비되었습니다. 각 희석 지점에서 각 돌연변이의  $C_T$  및  $\Delta C_T$  데이터를 계산했습니다. 돌연변이 반응  $C_T$  값을 그래프로 그리고 효율을 계산했으며, 대조 반응  $C_T$  값은 각 돌연변이의 희석 시리즈에서 일관되게 나타났습니다. 대조 반응  $C_T$  값이 지정된 범위(21.92~32.00) 이내에 속하는 각 검체에서  $\Delta C_T$  값을 계산했습니다. 돌연변이 반응  $C_T$  대  $\log_2$  DNA 투입 희석을 선형 회귀 모델로 분석했습니다. 기울기 및 95% 신뢰 구간이 보고되었습니다.

이 연구는 일정한 농도의 야생형 DNA 를 배경으로 돌연변이를 희석한 결과 위의 선형성 연구에서 결정된 값을 크게 벗어나지 않는 증폭 효율을 보였고, 증폭 효율은  $\pm 10\%$  미만의 차이를 나타냈음을 보여주었습니다. 데이터는 표 19 에 요약되어 있습니다.

표 19. 증폭 효율(틀 연변이 비율의 함수) 데이터 요약

검체	질편	질편 표준 오차	계산된 기울기	표준 오차(기울기)	양측 95% 신뢰 하한(기울기)	양측 95% 신뢰 상한(기울기)	증폭 효율
<b>12ALA</b>	23.540	0.025	-0.968	0.010	-0.989	-0.947	<b>1.047</b>
<b>12ASP</b>	24.804	0.054	-1.030	0.022	-1.075	-0.985	<b>0.960</b>
<b>12ARG</b>	24.226	0.028	-1.008	0.11	-1.031	-0.984	<b>0.990</b>
<b>12CYS</b>	24.354	0.027	-0.981	0.011	-1.003	-0.959	<b>1.027</b>
<b>12SER</b>	25.376	0.054	-0.892	0.022	-0.937	-0.847	<b>1.174</b>
<b>12VAL</b>	22.703	0.035	-1.021	0.014	-1.050	-0.992	<b>0.972</b>
<b>13ASP</b>	27.555	0.057	-0.810	0.023	-0.857	-0.763	<b>1.353</b>

## 간섭 물질

이 연구의 목적은 잠재적 간섭 물질이 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 성능에 미치는 영향을 평가하는 것이었습니다. 이는 두 가지 농도에서의 첨가 실험을 통해 각 물질이  $\Delta C_T$  값과 테스트 검체의 돌연변이 상태에 미치는 영향을 분석하는 방식으로 수행되었습니다. 농도는 표 20 에 나와 있습니다.

**표 20. 각 분석에서 테스트된 간섭 물질의 양**

간섭 물질	실제 높은 양 [ $\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ 용출물]	실제 낮은 양 [ $\mu\text{l}/200\mu\text{l}$ 용출물]
파라핀 왁스(자일렌 내)	$2.00 \times 10^{-4}$	$5.00 \times 10^{-5}$
자일렌	$2.00 \times 10^{-4}$	$5.00 \times 10^{-5}$
에탄올	$1.35 \times 10^{-3}$	$3.38 \times 10^{-4}$
Buffer ATL	$5.40 \times 10^{-4}$	$1.35 \times 10^{-4}$
단백분해효소 K	$1.32 \times 10^{-5}$	$3.30 \times 10^{-6}$
Buffer AL	$1.33 \times 10^{-3}$	$3.33 \times 10^{-5}$
세척 완충액 AW1	0.50	$1.25 \times 10^{-1}$
세척 완충액 AW2	5.00	1.25

정상적인 사용 중 발생할 것으로 예상되는 농도에서 평가된 잠재적 간섭 물질 중 어느 것도 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 가 돌연변이 양성 검체와 돌연변이 음성 검체를 구별하는 능력에 영향을 미치지 않습니다.

간섭 물질 연구 외에도 종양 검체 내 높은 수준의 괴사 조직이 유효한 데이터를 생산하는 능력에 영향을 미치는지를 확인하기 위해 임상 검체에서 괴사의 잠재적 영향을 평가하였습니다. "분석 표준 방법과의 비교"(분석 표준 방법과의 비교) 연구(64 페이지

참고)의 일부로 평가된 총 421 개의 검체에서 29 개의 검체는 병리학적 검토에서 50% 이상의 과사가 있는 것으로 확인되었습니다. 이 29 개의 검체 중 28 개는 양방향 생어 염기서열 분석과 일치하는 유효한 결과를 보였습니다. 한 개의 결과는 DNA 가 부족하여 무효였습니다.

## 교차 오염

이 연구의 목적은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용하여 잠재적으로 위양성 결과를 초래하는 DNA 검체 간 교차 오염의 정도를 결정하는 것이었습니다. 교차 오염의 잠재적인 원인은 다음과 같습니다.

- 검체 추출(*off*: 슬라이드 스크래핑)
- 검체 피펫팅
- 검체 튜브의 폐쇄("캡 씩우기")
- 사용 중 키트 시약의 오염
- Rotor-Gene Q MDx (US) 기기에 분석 튜브 로딩

이 연구에서는 FFPE 표준이 사용되었습니다: 야생형 표준 및 12ALA 표준(12ALA 반응은 키트에서 최저 LOD 를 보인 반응이기 때문).

이 연구는 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기 실행 이내 및 실행 간 오염 가능성을 조사하기 위해 고안된 10 개 PCR 실행으로 구성되었습니다. 이들 테스트 실행에서 야생형 DNA 가 들어 있는 튜브를 사용하여 돌연변이 DNA 로부터의 오염을 테스트했습니다.

이 연구의 결과는 교차 오염을 검출하기 위한 어떤 야생형 DNA 추출물에서도 검출 가능한 오염을 나타내지 않았습니다.



## 배타성/교차 반응성

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 8 개의 개별 반응으로 구성되었으며, 이는 KRAS 유전자의 비다형적 영역을 검출하는 한 개의 대조 반응 및 7 개의 돌연변이 특이적 반응입니다. 코돈 12 또는 13 의 야생형 KRAS 서열을 구체적으로 측정하는 반응은 없습니다. KRAS "No Mutation Detected"(돌연변이 검출되지 않음) 결과(즉, 야생형)는 돌연변이 양성 결과를 초래하는 7 가지 돌연변이 중 어떤 것도 없을 때 결정됩니다. 따라서 위양성 결과가 발생하지 않도록 과도한 양의 KRAS 야생형 DNA 를 갖는 각 반응에서 발생하는 비특이적 증폭 또는 교차 반응의 양을 입증해야 합니다. 마찬가지로, KRAS 돌연변이의 비특이적 증폭(이 반응은 검출하기 위한 것이 아님)은 돌연변이 반응들 간의 교차 반응의 양이 과도한 양의 돌연변이 DNA 가 존재할 때 잘못된 돌연변이 판정을 초래하지 않는다는 것을 입증하기 위해 평가됩니다. 이 분석에서 DNA 투입은 대조  $C_T$  범위(21.92~32.00)을 기준으로 하기 때문에 최고 농도의 DNA 투입은 대조  $C_T$  값이 약 22 을 기준으로 합니다. 이 평가를 위해 FFPE 임상 검체 FFPE 세포주 DNA 가 사용되었습니다.

### 비특이적 증폭/교차 반응: 야생형 KRAS DNA

구체적 돌연변이를 증폭하도록 만들어진 반응 혼합물에 의한 야생형 DNA 의 비특이적 증폭의 양을 해결하기 위해 야생형 FFPE 세포주 DNA 또는 최고 농도의 증폭 가능 DNA 투입 수준의 CRC 중앙 조직에서 추출한 DNA 의 60 개 복제본을 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용하여 평가했습니다. FFPE 세포주에서 추출한 DNA 의 경우, 대조  $C_T$  값은 약 22~23 이었습니다. 세 개의 야생형 CRC 검체의 대조  $C_T$  값은 24~25 였습니다. 이 결과는  $\Delta C_T$  값이 확정된 컷오프를 초과함을 보여주었습니다. 각 반응에서 관찰된 평균 및 최저  $\Delta C_T$  값이 표 21 에 나와 있습니다.

표 21. 돌연변이 반응의 야생형 검체에서 관찰된 최저 평균  $\Delta C_T$

돌연변이 반응	컷오프	관찰된 최저 $\Delta C_T$	검체 1	검체 2	검체 3
			$\Delta C_T$ 평균 (최저)	$\Delta C_T$ 평균 (최저)	$\Delta C_T$ 평균 (최저)
12ALA	8	12.76	18.00(11.40)	18.62(11.50)	20.03(19.36)
12ASP	6.6	10.35	10.90(9.62)	10.34(8.84)	10.68(9.01)
12ARG	8	14.26	20.33(12.94)	20.02(13.20)	20.03(19.36)
12CYS	8	13.66	20.62(17.38)	20.29(19.62)	20.03(19.36)
12SER	8	11.97	17.26(11.14)	17.90(11.42)	18.05(10.44)
12VAL	7.5	11.81	14.87(11.46)	16.27(11.50)	18.68(11.36)
13ASP	7.5	10.94	12.35(9.08)	13.68(10.69)	14.82(9.97)

### 비특이적 증폭/교차 반응/배타성: 돌연변이 양성 KRAS DNA

대조 반응  $C_T$ 가 약 23 이 되도록 각 FFPE 세포주로부터 DNA 검체를 준비하여 고농도의 투입 DNA 를 가진 돌연변이 검체를 모든 반응 혼합물에 대해 테스트했습니다. 각 돌연변이 검체의 여섯 개의 복제본을 평가했습니다. 검체의 돌연변이 백분율은 세포주 DNA 의 돌연변이체 백분율에 의해 결정되었습니다. 평균  $\Delta C_T$  값이 표 22 에 표시되어 있으며, 돌연변이 반응 간에 교차 반응이 있음을 보여줍니다. 12ALA 돌연변이는 증폭되었으며 12CYS, 12SER, 12VAL 반응에 대한  $\Delta C_T$  임계값보다 낮은  $\Delta C_T$  값을 생성했습니다. 12VAL 돌연변이는 증폭되었으며, 12ALA 반응의  $\Delta C_T$  임계값보다 낮은  $\Delta C_T$  값을 생성했습니다.

모든 사례에서 테스트 결과는 서로 짝을 이루는 돌연변이 반응에서 돌연변이 판정이 정확했음을 보여줍니다(즉, 최저  $\Delta C_T$  값이 올바른 돌연변이 판정임). 다른 모든 테스트 사례는 검출되지 않았거나  $\Delta C_T$  임계값 밖에 있었습니다.

표 22. 높은 투입 범위의 FFPE 세포주 DNA 를 사용한 돌연변이 반응들 간의  $\Delta C_T$  교차 반응

돌연변이 반응( $\Delta C_T$ )*								
돌연변이 DNA	컷오프	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1.42	12.66	-	5.81	2.78	6.31	13.21
12ASP	6.6	12.56	2.42	-	-	13.44	11.21	13.55
12ARG	8	13.12	11.56	1.12	11.42	-	13.43	12.66
12CYS	8	14.2	12.48	9.23	0.98	-	7.96	12.88
12SER	8	-	13.39	13.31	-	3.02	12.99	13.97
12VAL	7.5	6.83	-	-	-	13.38	0.28	13.74
13ASP	7.5	-	13.29	13.89	-	-	14.36	4.5

\* 서로 짝을 이루는 반응들의  $\Delta C_T$ 는 굵게 표시되었습니다. 빈칸은 교차 반응이 없음을 나타냅니다.  
 컷오프보다 낮은 교차 반응적 반응들의  $\Delta C_T$ 는 강조 표시되었습니다.

## 반복성 및 재현성

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 정밀성을 CLSI EP12-A 및 EP5-A2 의 측면을 포함하는 프로토콜을 사용하여 결정했습니다(21, 22). 임상 CRC 검체를 이 평가에 사용했습니다. 한 개의 야생형과 각 돌연변이마다 한 개의 검체를 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용하여 테스트했습니다. 3 개 기관에서 각각 2 명의 실시자가 모든 검체 및 대조물질을 3 개 로트의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 5 일간 매일 하루 2 회 테스트 실행했으며, 각 실행당 각 검체의 2 개 복제본을 사용했습니다. 각 검체의 각 반응에 대해 얻은  $C_T$  및  $\Delta C_T$  값도 분산 성분 분석을 통해 분석했습니다.

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 재현성은 저수준 돌연변이체(3xLOD) 및 야생형 검체에서 입증되었으며, 실험실 실험 이내 및 실험 간에 여러 로트, 플랫폼 및 실시자에 걸쳐 모든 분석에서 최소 39/40 의 정확한 돌연변이 판정이 나왔습니다. C50 및 3xLOD 검체를 사용하여 입증된 분산 추정치(1x 표준편차)는 표 23 및 표 24 에 나와 있습니다.

표 23. 분석 분산 추정치

분석	ΔC <sub>T</sub> 의 %CV		돌연변이 C <sub>T</sub> 의 %CV		대조군 C <sub>T</sub> 의 %CV		WT
	3xLOD	C50	3xLOD	C50	3xLOD	C50	
12ALA	13.14	8.32	1.87	2.02	0.97	1.12	1.12
12ARG	10.79	8.04	1.59	1.96	1.24	1.51	1.15
12ASP	12.86	5.87	1.11	1.00	0.90	0.90	1.04
12CYS	17.61	10.83	1.86	2.02	1.54	1.22	1.15
12SER	13.97	10.43	1.71	2.11	0.94	1.19	1.15
12VAL	9.66	15.47	1.52	1.65	1.11	3.74	1.26
13ASP	13.73	9.35	1.91	2.08	1.11	1.41	1.19

표 24. 반복성 정밀성 추정치

분석	ΔC <sub>T</sub> 의 %CV		돌연변이 C <sub>T</sub> 의 %CV		대조군 C <sub>T</sub> 의 %CV		WT
	3xLOD	C50	3xLOD	C50	3xLOD	C50	
12ALA	10.71	7.51	1.69	1.76	0.77	0.90	0.79
12ARG	9.83	8.04	1.21	1.76	0.84	1.33	0.90
12ASP	10.16	4.08	0.93	0.89	0.80	0.76	0.76
12CYS	13.15	8.80	1.31	1.76	1.40	1.01	0.76
12SER	6.76	6.18	1.10	1.48	0.80	0.90	0.90
12VAL	9.21	15.32	1.40	1.42	0.91	3.49	0.94
13ASP	8.67	7.01	1.30	1.65	0.91	1.19	0.97

전체 및 각 사이트 내에서 돌연변이 및 야생형 검체를 테스트한 3xLOD 검체의 추정 비율을 보고했습니다. 모든 분석 및 검체 조합에서 80 개의 복제본 중 최소 79 개가 정확한 돌연변이 판정을 받았습니다. 정확한 판정의 전체 비율은 99.6%(1115/1120)으로, 돌연변이 양성(3xLOD) 검체가 99.6%(558/560)였고, 돌연변이가 검출되지 않은 (야생형) 검체가 99.5%(557/560)였습니다(표 25).

표 25. 전체적 정확한 판정

정확한 판정

돌연변이	3xLOD 검체	야생형 검체(낮음)
12ALA	79/80	80/80
12ARG	80/80	79/80
12ASP	80/80	80/80
12CYS	79/80	80/80
12SER	80/80	79/80
12VAL	80/80	79/80
13ASP	80/80	80/80

검체 처리 변동성

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 프로세스의 일부로 검체 처리 변동성을 평가하기 위해 10 개의 FFPE CRC 검체(야생형 3 개 및 돌연변이 당 1 개)에서 각각 30 개의 순차적 5 $\mu$ m 절편을 절단했습니다. 이 절편들을 3 개 테스트 기관 중 1 곳으로 무작위 배정하여 각 기관이 FFPE 검체 당 10 개의 절편(총 100 개)을 받도록 했습니다. 테스트된 300 개의 DNA 추출물 중에서 298 개의 검체가 유효했습니다.

KRAS 돌연변이 판정과 관련한 3 개 기관 간의 일치율은 99.33%였습니다. 각 분석에서  $\Delta C_T$  값의 분산이 추정되었으며, 실험실 소스 간 및 실험실 소스 이내에서의 기여도는 ANOVA 분산 성분 모델을 사용하여 추정했습니다. 테스트 기관 내 분산은 12ASP(0.30)에서 가장 높았습니다. 테스트 기관 간 분산은 12SER(0.05)에서 가장 높았습니다. 돌연변이 및 야생형 검체의 표준 편차(Standard Deviation, SD)를 사용한 평균  $\Delta C_T$  값의 사이트별 비교는 결과에서의 매우 근접한 일치를 보여주었습니다(표 26 및 표 27). 이런 결과는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 와 관련한 DNA 추출 절차 및 검체 처리의 일치도를 보여줍니다.

표 26. 돌연변이 유형 검체의 평균  $\Delta C_T(SD)$  값의 사이트별 비교

	$\Delta C_T(\text{표준 편차})$						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
사이트 1	2.44(0.1)	2.62(0.3)	3.03(0.6)	2.24(0.1)	2.34(0.3)	2.51(0.1)	3.93(0.4)
사이트 2	2.44(0.2)	2.52(0.4)	3.01(0.7)	2.29(0.2)	2.10(0.4)	2.44(0.5)	4.15(0.7)
사이트 3	2.67(0.6)	2.52(0.2)	3.07(0.5)	2.29(0.2)	2.74(0.5)	2.56(0.2)	3.95(0.3)

표 27. 야생형 검체의 평균  $\Delta C_T(SD)$  값의 사이트별 비교

	$\Delta C_T(\text{표준 편차})$						
	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
사이트 1	12.46(0.3)	—*	10.37(0.4)	—	11.84(0.4)	12.36(0.5)	11.11(0.6)
사이트 2	12.09(0.6)	13.07(0.2)	10.17(0.5)	—	11.71(0.7)	12.20(0.6)	11.00(0.9)
사이트 3	12.07(0.2)	—	10.61(0.4)	—	11.94(0.3)	12.28(0.6)	11.82(0.5)

\* 돌파 현상이 관찰되지 않음으로 인한 결측값을 나타냅니다.

## 로트 상호 교환성

돌연변이 검출에 영향을 미치는 로트 - 로트 변동성에 대한 잠재성이 평가되었습니다. 이 연구에서는 3 개 로트의 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit(FFPE 추출 키트) 및 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 가 각 로트의 FFPE 추출 키트를 사용하여 평가되었습니다. DNA 는 3 개 로트의 FFPE 추출 키트를 사용하여 FFPE 세포주로부터 추출했으며, 대략 23, 26, 31 의 목표 대조  $C_T$  값을 갖는 DNA 검체들을 만들었습니다. 이런  $C_T$  값은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에서 정의된 작동 범위의 총 DNA 투입 수준에 걸치도록 선택되었습니다(대조  $C_T$  는 21.92~32.00 이내). 각 목표  $C_T$  값에서의 여섯 개의 복제본 추출을 3 개의 독립적 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로트로 각각 테스트했습니다.  $\Delta C_T$  값 및 돌연변이 판정을 모든 테스트 검체에서 수집했습니다. 사전 정의된 연구 목표는 유효한 테스트의 100%에서 관찰된 정확한 돌연변이 판정으로 충족되었으며, 이것은 검체 돌연변이 판정이 다양한 로트의 FFPE 추출 키트 및/또는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용하는 것에 영향을 받지 않음을 확인해 주었습니다.

# 비소세포폐암 시료의 성능 특징

## 분석 성능

### 검출 한계(Limit of Detection, LOD)

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 LOD 값은 이전에 FFPE 세포주에서 추출한 DNA 를 사용하여 결정되었습니다. 이 연구의 목적은 DNA 농도가 제한 인자가 아닐 때, 비소세포폐암 시료를 사용하여 각 돌연변이 분석의 LOD 가 야생형 DNA 의 배경에서 10% 돌연변이 함량 이하임을 재검증하는 것입니다. LOD 재검증은 세포주 검체 혼합물(12ALA, 12SER, 13ASP) 및 임상 FFPE 비소세포폐암 검체(12ASP, 12ARG, 12CYS, 12VAL)를 사용하여 수행되었습니다. 추적 관찰 연구에서는 12ALA, 12SER, 13ASP 돌연변이를 나타내는 임상 검체가 사용되었습니다. 돌연변이 양성 테스트 검체에서 추출한 DNA 및 야생형 검체(희석제로 사용)가 중간 DNA 투입 수준으로 정규화되었습니다. 그런 다음 돌연변이 양성 검체를 낮은 수준의 돌연변이 DNA 함량으로 희석하였습니다(이전에 결정된 LOD 로 정의됨). 돌연변이 양성 DNA 검체는 대조 반응 혼합물 및 관련 돌연변이 반응 혼합물을 사용하여 테스트했습니다. LOD 돌연변이 함량 수준으로 희석한 비소세포폐암 검체는 관찰된 돌연변이 양성 검출률에 대해 편측 정확 95% 신뢰 상한이 95% 이상으로 표 16 에 나와 있는 결장직장암 검체 LOD 값을 재검증했습니다.

### 세포 상관 관계 연구

이 연구의 목적은 FFPE 세포주 검체에서 추출한 DNA 및 임상 FFPE 비소세포폐암 조직 검체에서 추출한 DNA 에 대해 확립된 검출 한계(Limit of Detection, LOD), 그 미만 및 초과에서의 적중률과 비교하여 임상 FFPE 비소세포폐암 검체의 적절한 대체제로서 FFPE 비소세포폐암 세포주 검체의 유용성을 결정하는 것입니다. 또한 이 연구는 FFPE 세포주 검체가 KRAS 키트를 사용하여 검사했을 때 임상 FFPE 비소세포폐암 검체보다 성능이 떨어지지 않음을 입증하기 위해 수행되었습니다.



본 연구는 두 KRAS 돌연변이 양성 FFPE 세포주 검체(KRAS Kit 로 양성 검출)와 동일한 돌연변이 상태의 두 KRAS 임상 FFPE 검체를 사용했습니다. C100(1.5xLOD), C95(LOD), C75, C50, C25, C5 비율의 정확한 돌연변이 판정을 제공할 것으로 예상되는 여섯 개의 희석 수준으로 각 검체 패널 멤버에 대해 테스트했습니다. 가장 발생률이 높은 KRAS 코돈 12 돌연변이 중 두 가지인 G12C(12CYS)와 G12D(12ASP)를 이 연구에 사용했습니다.

두 가지 프로빗 모델을 분석에 사용했습니다. KRAS G12D 돌연변이의 경우, 데이터 결과가 통계적으로 유의하게 세포주와 임상 검체 간에 성능의 차이가 없음을 나타내지 않았습니다. 그러나 KRAS G12C 돌연변이의 경우, 세포주의 양성 비율이 여러 다른 희석 수준에서 임상 검체보다 낮았고, 세포주가 임상 검체보다 성능이 우수하지 않음을 입증했습니다. 12ASP 및 12CYS 세포주는 해당 임상 검체보다 성능이 우수하지 않았기에 연구 허용 기준이 충족되지 않았고, 이러한 세포주는 검증 연구를 위해 임상 검체를 사용할 수 없을 때 대체제로 사용되지 않았습니다.

## 분석 표준 방법과의 비교

이 연구의 목적은 양방향 생어 염기서열 분석과 비교하여 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 비소세포폐암의 전체 돌연변이 상태의 일치율을 입증하는 것이었습니다(표 28).

표 28. 생어와 KRAS RGQ 결과 간 상관 관계

생어 상태	KRAS 상태		
빈도(비율)	돌연변이 양성	돌연변이 검출되지 않음	총계
돌연변이 양성	79 (21.94)	1 (0.28)	80 (22.22)
돌연변이 검출되지 않음	21 (5.83)	259 (71.94)	280 (77.78)
총계	100 (27.78)	260 (72.22)	360 (100.00)

절제로 획득한 검체, FNA 및 CNB 의 혼합을 나타내는 입수한 360 개의 임상 비소세포폐암 FFPE 검체가 KRAS Kit 와 생어 양방향 염기서열 분석 간의 일치율을 평가하기 위해 사용되었습니다. DNA 를 각 검체에서 추출하여 KRAS Kit 및 양방향 생어 염기서열 분석으로 테스트했습니다. 360 개의 유효한 검체 중, 340 개의 검체가 KRAS Kit 와 양방향 염기서열 분석 간에 일치하는 결과를 생성했습니다. 이러한 일치하는 검체 중 두 개에서 하나는 KRAS Kit 에 돌연변이 판정을 보였지만 양방향 생어 염기서열 분석에는 이중 돌연변이로 나왔습니다. 이 중 하나가 KRAS Kit 의 한 판정과 일치하였고, 따라서 이 검체에는 일치하는 결과가 나왔습니다.

표 29 에 표시된 것처럼 PPA 는 98.75%(94.21, 99.94), NPA 는 93.21%(90.20, 95.51), OPA 는 94.44%(92.03, 96.29)였습니다.

표 29. 생어와 KRAS Kit 모두에서 유효한 결과가 있는 검체의 일치율

측정 일치율	빈도	일치율	정확 이항 양측 90% 신뢰 하한	정확 이항 양측 90% 신뢰 상한
전체 일치율	340/360	94.44	92.03	96.29
양성 일치율	79/80	98.75	94.21	99.94
음성 일치율	261/280	93.21	90.20	95.51

20 개의 불일치 검체가 있었습니다. 19 개는 양방향 생어 염기서열 분석에 WT 였지만 KRAS 키트에서는 돌연변이 결과가 나왔습니다. 한 검체는 KRAS 키트에 WT 였지만 양방향 생어 염기서열 분석에 돌연변이 양성(13ASP) 상태가 나왔습니다.

### 검체 획득의 등가성

이 연구의 목적은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 결정되는 비소세포폐암 검체의 돌연변이 판정이 검체 획득 방법에 영향을 받는지 평가하는 것이었습니다. 이 연구에서 평가한 3 가지 검체 획득 방법은 절제, FNA, CNB 였습니다.

이 연구를 위해, "환자 일치" CNB 및 FNA 검체를 수술적 절제(RES) 종양 검체에서 추출하여 3 가지 획득 방법으로 동일한 종양을 수집할 수 있게 했습니다. 각 검체는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 추출하여 테스트했습니다.

일차 분석은 획득 유형 전반에 걸쳐 검출된 특정 돌연변이에 기초했습니다. 전체 일치율, 양성 일치율, 음성 일치율의 측정은 각 쌍대 비교에 대해 정확 양측 95% 신뢰 한계와 함께 계산했습니다(표 30).

표 30. 검체 획득 방법 간 일치(3 가지 획득 방법 모두를 사용한 유효한 검체 포함)

비교	일치율	빈도	백분율(%)	양측 신뢰 하한	양측 95% 신뢰 상한
CNB 를 기준으로 하는 CNB 대 FNA	전체 일치율	148/156	94.87	90.15	97.76
	양성 일치율	29/35	82.86	66.35	93.44
	음성 일치율	119/121	98.35	94.16	99.80
CNB 를 기준으로 하는 CNB 대 RES	전체 일치율	148/156	94.87	90.15	97.76
	양성 일치율	29/35	82.86	66.35	93.44
	음성 일치율	119/121	98.35	94.16	99.80
FNA 를 기준으로 하는 FNA 대 CNB	전체 일치율	148/156	94.87	90.15	97.76
	양성 일치율	29/32	90.63	74.98	98.02
	음성 일치율	119/124	95.97	90.84	98.68

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

표 30. 검체 획득 방법 간 일치(계속)

비교	일치율	빈도	백분율(%)	양측 신뢰 하한	양측 95% 신뢰 상한
FNA 를 기준으로 하는 FNA 대 RES	전체 일치율	152/156	97.44	93.57	99.30
	양성 일치율	30/32	93.75	79.19	99.23
	음성 일치율	122/124	98.39	94.30	99.80
RES 를 기준으로 하는 RES 대 CNB	전체 일치율	148/156	94.87	90.15	97.76
	양성 일치율	29/32	90.63	74.98	98.02
	음성 일치율	119/124	95.97	90.84	98.68
RES 를 기준으로 하는 RES 대 FNA	전체 일치율	152/156	97.44	93.57	99.30
	양성 일치율	30/32	93.75	79.19	99.23
	음성 일치율	122/124	98.39	94.30	99.80

또한, Passing-Bablok 및 Deming 회귀 분석을 실시하여 여러 다른 검체 획득 방법 간의  $C_T$ 와  $\Delta C_T$  값을 비교했습니다. 회귀 분석 결과,  $C_T$  또는  $\Delta C_T$ 에 대해 RES, CNB, FNA 검체 유형 간에 일관되거나 비례적인 차이가 존재함을 시사하는 증거가 없는 것으로 나타났습니다. 선형 회귀 분석 또한 실시하여 관련  $\Delta C_T$  값에 대해 괴사 및 종양 조직의 비율에 영향이 있는지 조사했습니다. 괴사 및 종양 비율 대  $\Delta C_T$ 에 대한 회귀선 기울기는 괴사 또는 종양 조직 비율이 증가할 때  $\Delta C_T$  값에 의미 있는 변화가 있음을 시사하는 증거가 없음을 나타냅니다.

## 반복성 및 재현성

실험실 내 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 정밀성(반복성)을 평가하였습니다. 돌연변이 결과의 정확함과  $\Delta C_T$  값의 정밀도(돌연변이 반응과 대조 반응 간  $C_T$  값의 차이)가 모두 보고되었습니다.

총 15 개 패널 멤버를 준비했으며 KRAS 키트(LOD 및 2xLOD 에서), 그리고 야생형(Wild Type, WT) 패널 멤버로 7 개 돌연변이 각각에 대해 한 개가 검출되었습니다. 돌연변이 패널 멤버는 가용성에 따라 FFPE 세포주나 임상 검체로 대표되었습니다. 모든 검체는 27 의 대조물질  $C_T$  로 정규화되었고 돌연변이 검체는 야생형 DNA 에 희석하여 1x LOD 및 2x LOD 의 돌연변이 수준의 검체를 위해 충분한 재료를 생성했습니다.

각 검사 패널에 대한 정확한 판정 비율은 표 31 에, 분산 성분 값은 표 32 에 나와 있습니다.

표 31. 올바른 돌연변이 판정 비율

그룹화 변수		비율		양측 95% 신뢰 한계	
검체 수준	분석	분수	백분율	하한	상한
2xLOD	12ALA	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12ARG*	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12ASP	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12CYS	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12SER*	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	12VAL	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
	13ASP*	28/28	100.00%	87.66%	100.00%
LOD	12ALA	39/40	97.50%	86.84%	99.94%
	12ARG	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12ASP	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12CYS	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12SER*	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	12VAL	40/40	100.00%	91.19%	100.00%
	13ASP*	38/40	95.00%	83.08%	99.39%
WT	전체	28/28	100.00%	87.66%	100.00%

\* FFPE 세포주로 대표됨

표 32. SD 및 %CV 에 대한 분산 성분 - 반복성

판지 편수	검체 수	판지	검체 수	평균	검사 시간*	검사 시간*	검사 시간*	검사 시간*	검사 시간*	잔류*	총계
델타 C <sub>T</sub>	2xLOD	12ALA	28	5.54	(0.0000, 0.00%)	(0.1221, 2.20%)	(0.0443, 0.80%)	(0.0385, 0.70%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1335, 2.41%)	(0.1843, 3.33%)
		12ARG	28	4.80	(0.0000, 0.00%)	(0.1891, 3.94%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3244, 6.76%)	(0.3737, 7.79%)
		12ASP	28	4.72	(0.0860, 1.82%)	(0.1446, 3.06%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1463, 3.10%)	(0.1374, 2.91%)	(0.1751, 3.71%)	(0.2797, 5.93%)
		12CYS	28	5.66	(0.0563, 0.99%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0995, 1.76%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0390, 0.66%)	(0.2306, 4.08%)	(0.2498, 4.41%)
		12SER	28	5.36	(0.1429, 2.67%)	(0.0274, 0.51%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0647, 1.21%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1753, 3.27%)	(0.2129, 3.97%)
		12VAL	28	4.26	(0.0000, 0.00%)	(0.1016, 2.39%)	(0.0593, 1.39%)	(0.1128, 2.65%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2095, 4.92%)	(0.2457, 5.77%)
		13ASP	28	5.23	(0.0000, 0.00%)	(0.2892, 5.53%)	(0.0157, 0.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2171, 4.15%)	(0.3575, 6.83%)
LOD		12ALA	40	6.36	(0.0000, 0.00%)	(0.1584, 2.49%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2346, 3.69%)	(0.2819, 4.43%)
		12ARG	40	5.45	(0.0036, 0.07%)	(0.1639, 3.01%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0797, 1.46%)	(0.1674, 3.07%)	(0.2397, 4.40%)
		12ASP	40	4.73	(0.0000, 0.00%)	(0.2485, 5.25%)	(0.1087, 2.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0816, 1.72%)	(0.1041, 2.20%)	(0.2837, 6.00%)
		12CYS	40	6.62	(0.1688, 2.55%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2056, 3.11%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2909, 4.40%)	(0.3652, 5.52%)
		12SER	40	6.37	(0.1006, 1.58%)	(0.3153, 4.95%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0340, 0.53%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2253, 3.54%)	(0.3854, 6.05%)
		12VAL	40	5.13	(0.2874, 5.60%)	(0.0976, 1.90%)	(0.0227, 0.44%)	(0.0874, 1.71%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1629, 3.18%)	(0.2965, 5.78%)
		13ASP	38	6.26	(0.3433, 5.48%)	(0.1227, 1.96%)	(0.0778, 1.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3459, 5.52%)	(0.4738, 7.57%)

\* SD, %CV

다음 페이지에서 표 계속



이전 페이지로부터 표 계속

표 32. SD 및 %CV 에 대한 분산 구성 요소 - 반복성(계속)

수 평 관 과	반 사 관 과	관 과	수 평 관 과	관 과	관 과	관 과	관 과	관 과	관 과	관 과	관 과	관 과
초록색 C <sub>1</sub>	2xLOD	12ALA	28	32.09	[0.0000, 0.00%]	[0.1314, 0.41%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0675, 0.21%]	[0.1073, 0.33%]	[0.1158, 0.36%]	[0.1957, 0.61%]	
		12ARG	28	31.50	[0.0000, 0.00%]	[0.2598, 0.82%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.3324, 1.06%]	[0.4189, 1.33%]	
		12ASP	28	31.30	[0.0000, 0.00%]	[0.1891, 0.60%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0920, 0.29%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1800, 0.58%]	[0.2667, 0.85%]	
		12CYS	28	32.07	[0.0000, 0.00%]	[0.2523, 0.79%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1606, 0.50%]	[0.2011, 0.63%]	[0.1512, 0.47%]	[0.3388, 1.06%]	
		12SER	28	32.06	[0.0000, 0.00%]	[0.2049, 0.64%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1250, 0.39%]	[0.1177, 0.37%]	[0.1263, 0.39%]	[0.2648, 0.83%]	
		12VAL	28	30.65	[0.0000, 0.00%]	[0.1772, 0.58%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1198, 0.39%]	[0.1063, 0.35%]	[0.1656, 0.54%]	[0.2639, 0.86%]	
		13ASP	28	31.98	[0.0000, 0.00%]	[0.3773, 1.18%]	[0.0497, 0.16%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1813, 0.57%]	[0.4138, 1.29%]	
LOD	2xLOD	12ALA	40	32.86	[0.0000, 0.00%]	[0.2332, 0.71%]	[0.0516, 0.16%]	[0.0840, 0.26%]	[0.1319, 0.40%]	[0.1780, 0.54%]	[0.3144, 0.96%]	
		12ARG	40	31.90	[0.0000, 0.00%]	[0.2186, 0.69%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.2289, 0.72%]	[0.1519, 0.48%]	[0.3106, 0.97%]	
		12ASP	40	31.02	[0.0000, 0.00%]	[0.1762, 0.57%]	[0.1093, 0.35%]	[0.1296, 0.42%]	[0.2492, 0.80%]	[0.1005, 0.32%]	[0.2908, 0.94%]	
		12CYS	40	33.14	[0.1216, 0.37%]	[0.0493, 0.15%]	[0.0000, 0.00%]	[0.3468, 1.05%]	[0.0501, 0.15%]	[0.3155, 0.95%]	[0.4216, 1.27%]	
		12SER	40	33.08	[0.0832, 25%]	[0.2591, 0.78%]	[0.0000, 0.00%]	[0.2424, .73%]	[0.0000, 0.00%]	[0.2258, 0.68%]	[0.3864, 1.17%]	
		12VAL	40	31.62	[0.2858, 0.90%]	[0.0951, 0.30%]	[0.0000, 0.00%]	[0.2244, 0.71%]	[0.0344, 0.11%]	[0.1763, 0.56%]	[0.3432, 1.09%]	
		13ASP	38	33.09	[0.3237, 0.98%]	[0.1009, 0.31%]	[0.1409, 0.43%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.2785, 0.84%]	[0.4133, 1.29%]	

\* SD, %CV

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

표 32. SD 및 %CV 에 대한 분산 구성 요소 - 반복성(계속)

수 평 관 패	반 사 관 패	관 패	수 평 관 패	관 패	관 패	관 패	관 패	관 패	관 패	관 패	관 패	관 패
노란색 C <sub>1</sub>	2xLOD	12ALA	28	33.20	[0.0000, 0.00%]	[0.0515, 0.16%]	[0.0330, 0.10%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0607, 0.18%]	[0.2117, 0.64%]	[0.2235, 0.67%]	
		12ARG	28	33.05	[0.1397, 0.42%]	[0.1321, 0.40%]	[0.0000, 0.00%]	[0.2393, 0.72%]	[0.0000, 0.00%]	[0.3792, 1.15%]	[0.4559, 1.38%]	
		12ASP	28	33.00	[0.0597, 0.18%]	[0.2131, 0.65%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1313, 0.40%]	[0.1954, 0.59%]	[0.3059, 0.93%]	
		12CYS	28	33.19	[0.0646, 0.19%]	[0.0971, 0.29%]	[0.0233, 0.07%]	[0.0679, 0.20%]	[0.0863, 0.26%]	[0.1943, 0.59%]	[0.2378, 0.72%]	
		12SER	28	32.85	[0.0525, 0.16%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0337, 0.10%]	[0.0937, 0.29%]	[0.1320, 0.40%]	[0.1588, 0.48%]	
		12VAL	28	33.11	[0.0000, 0.00%]	[0.1026, 0.31%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1469, 0.44%]	[0.1469, 0.44%]	[0.2912, 0.88%]	[0.3458, 1.04%]	
		13ASP	28	33.03	[0.0000, 0.00%]	[0.1928, 0.58%]	[0.1015, 0.31%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1450, 0.44%]	[0.2493, 0.75%]	
LOD		12ALA	40	33.37	[0.0000, 0.00%]	[0.2010, 0.60%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1942, 0.58%]	[0.2177, 0.65%]	[0.3257, 0.98%]	
		12ARG	40	33.14	[0.0000, 0.00%]	[0.2168, 0.65%]	[0.0000, 0.00%]	[0.3061, 0.92%]	[0.1637, 0.49%]	[0.1748, 0.53%]	[0.3717, 1.12%]	
		12ASP	40	32.98	[0.0000, 0.00%]	[0.2599, 0.79%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1735, 0.53%]	[0.2228, 0.68%]	[0.3618, 1.10%]	
		12CYS	40	33.31	[0.0000, 0.00%]	[0.2028, 0.61%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1209, 0.36%]	[0.0000, 0.00%]	[0.2132, 0.64%]	[0.3050, 0.92%]	
		12SER	40	33.08	[0.1254, 0.38%]	[0.2847, 0.86%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1505, 0.46%]	[0.3263, 0.99%]	
		12VAL	40	33.29	[0.3133, 0.94%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.2621, 0.79%]	[0.3574, 1.07%]	
		13ASP	40	33.13	[0.1101, 0.33%]	[0.1326, 0.40%]	[0.1666, 0.50%]	[0.0000, 0.00%]	[0.0000, 0.00%]	[0.1925, 0.58%]	[0.2804, 0.85%]	

\* SD, %CV

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

표 32. SD 및 %CV 에 대한 분산 구성 요소 - 반복성(계속)

수 표 판	분 자 판	자 판	수 표 판	합 계	관 사 실 간*	관 사 실 간*	관 사 실 간*	관 사 실 간*	관 사 실 간*	관 사 실 간*	합 계
노란색 C <sub>1</sub>	WT	12ALA	28	33.41	(0.1443, 0.43%)	(0.1997, 0.60%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2269, 0.68%)	(0.3248, 0.97%)
		12ARG	28	33.30	(0.0875, 0.26%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.4098, 1.23%)	(0.0904, 0.27%)	(0.2368, 0.71%)	(0.3983, 1.20%)
		12ASP	28	33.12	(0.1591, 0.48%)	(0.1748, 0.53%)	(0.0477, 0.14%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2131, 0.64%)	(0.3075, 0.93%)
		12CYS	28	33.42	(0.0000, 0.00%)	(0.2009, 0.60%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1444, 0.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2121, 0.63%)	(0.3077, 0.92%)
		12SER	28	33.22	(0.2485, 0.75%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0633, 0.19%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1497, 0.45%)	(0.2517, 0.76%)
		12VAL	28	33.35	(0.0000, 0.00%)	(0.2591, 0.78%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1429, 0.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2721, 0.82%)	(0.3863, 1.16%)
		13ASP	28	33.45	(0.0000, 0.00%)	(0.1194, 0.36%)	(0.0526, 0.16%)	(0.0341, 0.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1651, 0.49%)	(0.2078, 0.62%)

\* SD, %CV

실험실 간 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 정밀도(재현성)를 평가하였습니다. 세 곳의 다른 실험실(테스트 기관)이 사용되었습니다. 이 시험에서는 재현성 시험에 대해 동일한 검사 패널을 사용했습니다. 각 사이트, 실험실 조건은 RGQ 기기, 작업자, KRAS 키트 로트, 22 일간 비연속으로 사이트당 총 88 회 실행을 산출하기 위한 하루당 실행 횟수에 따라 달랐습니다.

올바른 돌연변이 판정 비율은 표 33 에 보고되어 있습니다. 정량적 정밀도 값은 표 33 에 나와 있습니다. KRAS 키트의 총 재현성은 표 34 의 총 횟수(SD, CV%) 열에 나와 있습니다.

표 33. 모든 기관에서의 올바른 돌연변이 판정 비율

그룹화 변수		비율		양측 95% 신뢰 한계	
검체 수준	분석	분수	백분율	하한	상한
2xLOD	12ALA	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12ARG*	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12ASP	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12CYS	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12SER*	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	12VAL	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
	13ASP*	84/84	100.00%	95.70%	100.00%
LOD	12ALA	118/120	98.33%	94.11%	99.80%
	12ARG	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	12ASP	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	12CYS	120/120	99.17%	95.44%	99.98%
	12SER*	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	12VAL	120/120	100.00%	96.97%	100.00%
	13ASP*	118/120	98.33%	94.11%	99.80%
WT	전체	82/84	97.62%	91.66%	99.71%

\* FFPE 세포주로 대표됨

표 34. SD 및 %CV 에 대한 분산 성분 - 재현성

분석 변수	검체 수준	분석	관찰 수	평균	기관간*	기관 내 검사일간*	기관 내 실험 N 간*	기관 내 Rgg 간*	검사일 키트 로트 간*	검사일 작업자 간*	잔류*	총계(SD, CV%)
펠타 Cr	2xLOD	12ALA	84	5.48	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1669, 3.05%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1287, 2.35%)	(0.1679, 3.07%)	(0.2640, 4.82%)
		12ARG	84	4.81	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1172, 2.43%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2729, 5.67%)	(0.2967, 6.16%)
		12ASP	84	4.57	(0.0000, 0.00%)	(0.0943, 2.06%)	(0.1457, 3.19%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0600, 1.31%)	(0.1718, 3.76%)	(0.1565, 3.43%)	(0.2854, 6.25%)
		12CYS	84	5.61	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2060, 3.67%)	(0.0264, 0.47%)	(0.0698, 1.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1671, 2.98%)	(0.2728, 4.87%)
		12SER	84	5.34	(0.0000, 0.00%)	(0.1362, 2.55%)	(0.1669, 3.13%)	(0.1527, 2.86%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2020, 3.79%)	(0.2382, 4.46%)	(0.3902, 7.31%)
		12VAL	84	4.13	(0.0874, 2.11%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1677, 4.06%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0869, 2.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2711, 6.56%)	(0.3359, 8.12%)
		13ASP	84	5.22	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2161, 4.14%)	(0.2712, 5.20%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1930, 3.70%)	(0.2275, 4.36%)	(0.4279, 8.20%)
LOD	1xLOD	12ALA	119	6.33	(0.0000, 0.00%)	(0.0410, 0.65%)	(0.1207, 1.91%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0247, 0.39%)	(0.2640, 4.17%)	(0.2936, 4.64%)
		12ARG	120	5.42	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1797, 3.31%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1872, 3.45%)	(0.2590, 4.78%)
		12ASP	120	4.66	(0.1183, 2.54%)	(0.0646, 1.38%)	(0.2121, 4.55%)	(0.0261, 0.56%)	(0.0217, 0.46%)	(0.0440, 0.94%)	(0.1455, 3.12%)	(0.2862, 6.14%)
		12CYS	120	6.54	(0.0000, 0.00%)	(0.0132, 0.20%)	(0.1775, 2.72%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1621, 2.48%)	(0.1708, 2.61%)	(0.4202, 6.43%)	(0.4981, 7.62%)
		12SER	120	6.28	(0.0000, 0.00%)	(0.0824, 1.31%)	(0.2271, 3.62%)	(0.0775, 1.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2383, 3.80%)	(0.3164, 5.04%)	(0.4570, 7.28%)
		12VAL	120	5.05	(0.0315, 0.62%)	(0.1648, 3.26%)	(0.0955, 1.89%)	(0.0703, 1.39%)	(0.0320, 0.63%)	(0.0795, 1.57%)	(0.2120, 4.20%)	(0.2965, 5.87%)
		13ASP	118	6.17	(0.0000, 0.00%)	(0.1673, 2.71%)	(0.1987, 3.22%)	(0.2332, 3.78%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0843, 1.37%)	(0.3075, 4.99%)	(0.4488, 7.28%)

\*\* SD, %CV

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

표 34. SD 및 %CV 에 대한 분산 성분 - 재현성(계속)

		본서 편수	검체 수준	본서	관찰 수	평균	기반 간*	기관 내 검사원 간*	검사원 수행 시간*	검사원 Rgt 간*	검사원 키트 로트 간*	검사원 작업자 간*	잔차*	총계
복합 C:	ZLOD	12ALA	84	32.13	(0.1578, 0.49%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2509, 0.78%)	(0.0745, 0.23%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1249, 0.39%)	(0.1362, 0.42%)	(0.3390, 1.06%)		
		12ARG	84	31.61	(0.0882, 0.28%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2430, 0.77%)	(0.1339, 0.42%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2604, 0.82%)	(0.3828, 1.21%)		
		12ASP	84	31.24	(0.1655, 0.53%)	(0.0391, 0.13%)	(0.2178, 0.70%)	(0.0600, 0.19%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2052, 0.66%)	(0.1426, 0.46%)	(0.3542, 1.13%)		
		12CYS	84	32.15	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2836, 0.88%)	(0.0852, 0.26%)	(0.0940, 0.29%)	(0.1658, 0.52%)	(0.1318, 0.41%)	(0.3636, 1.13%)		
		12SER	84	32.14	(0.1457, 0.45%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2659, 0.83%)	(0.1807, 0.56%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2715, 0.84%)	(0.1783, 0.55%)	(0.4554, 1.42%)		
		12VAL	84	30.69	(0.0646, 0.21%)	(0.0480, 0.16%)	(0.2124, 0.69%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1031, 0.34%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2000, 0.65%)	(0.3143, 1.02%)		
		13ASP	84	32.12	(0.2111, 0.66%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3218, 1.00%)	(0.2966, 0.92%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1743, 0.54%)	(0.1980, 0.62%)	(0.5184, 1.61%)		
		12ALA	119	32.93	(0.0000, 0.00%)	(0.1524, 0.46%)	(0.1821, 0.55%)	(0.1048, 0.32%)	(0.0757, 0.23%)	(0.1007, 0.31%)	(0.2526, 0.77%)	(0.3721, 1.13%)		
12ARG	120	31.98	(0.0000, 0.00%)	(0.0743, 0.23%)	(0.1936, 0.61%)	(0.1262, 0.39%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1332, 0.42%)	(0.1619, 0.51%)	(0.3096, 0.97%)				
12ASP	120	31.06	(0.1880, 0.61%)	(0.1184, 0.38%)	(0.1681, 0.54%)	(0.1033, 0.33%)	(0.1171, 0.38%)	(0.1481, 0.48%)	(0.1333, 0.43%)	(0.3511, 1.13%)				
12CYS	120	33.19	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2513, 0.76%)	(0.0776, 0.23%)	(0.2128, 0.64%)	(0.1427, 0.43%)	(0.2712, 0.82%)	(0.4401, 1.33%)				
12SER	120	33.13	(0.2194, 0.66%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2433, 0.73%)	(0.1263, 0.38%)	(0.1470, 0.44%)	(0.1973, 0.60%)	(0.2052, 0.62%)	(0.4437, 1.34%)				
12VAL	120	31.65	(0.0000, 0.00%)	(0.1254, 0.40%)	(0.1645, 0.52%)	(0.1307, 0.41%)	(0.1271, 0.40%)	(0.0976, 0.31%)	(0.1792, 0.57%)	(0.3159, 1.00%)				
13ASP	118	33.08	(0.0000, 0.00%)	(0.1789, 0.54%)	(0.1661, 0.50%)	(0.3569, 1.08%)	(0.0649, 0.20%)	(0.1565, 0.47%)	(0.2588, 0.78%)	(0.4894, 1.48%)				

\*\* SD, %CV

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

표 34. SD 및 %CV 에 대한 분산 성분 - 재현성(계속)

보정 팩 C	복제 횟수	검체 수준	분산	관찰 수	평균	기관 간*	기관 내 검사원 간*	검사원 수행 시간*	검사원 Rgt 간*	검사원 키트 로트 간*	검사원 작업자 간*	잔차*	총계
ZAO	12ALA	84	<b>33.25</b>	(0.0706, 0.21%)	(0.0399, 0.12%)	(0.1314, 0.40%)	(0.1303, 0.39%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1124, 0.34%)	(0.1913, 0.58%)	(0.2883, 0.87%)		
	12ARG	84	<b>33.07</b>	(0.0000, 0.00%)	(0.1406, 0.43%)	(0.1353, 0.41%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2024, 0.61%)	(0.1262, 0.38%)	(0.2831, 0.86%)	(0.4016, 1.21%)		
	12ASP	84	<b>32.98</b>	(0.0000, 0.00%)	(0.0480, 0.15%)	(0.1706, 0.52%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0797, 0.24%)	(0.1795, 0.54%)	(0.2616, 0.79%)		
	12CYS	84	<b>33.20</b>	(0.0000, 0.00%)	(0.0976, 0.29%)	(0.1781, 0.54%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1454, 0.44%)	(0.1723, 0.52%)	(0.2939, 0.89%)		
	12SER	84	<b>32.91</b>	(0.0000, 0.00%)	(0.1101, 0.33%)	(0.0549, 0.17%)	(0.0669, 0.20%)	(0.0677, 0.21%)	(0.1186, 0.36%)	(0.2274, 0.69%)	(0.2916, 0.89%)		
	12VAL	84	<b>33.17</b>	(0.0688, 0.21%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1896, 0.57%)	(0.0937, 0.28%)	(0.1140, 0.34%)	(0.1311, 0.40%)	(0.2605, 0.79%)	(0.3768, 1.14%)		
	13ASP	84	<b>33.10</b>	(0.0000, 0.00%)	(0.0482, 0.15%)	(0.2035, 0.61%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0466, 0.14%)	(0.1460, 0.44%)	(0.1688, 0.51%)	(0.3019, 0.91%)		
LOD	12ALA	119	<b>33.33</b>	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2108, 0.63%)	(0.0820, 0.25%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1443, 0.43%)	(0.2253, 0.68%)	(0.3411, 1.02%)		
	12ARG	120	<b>33.15</b>	(0.1092, 0.33%)	(0.0537, 0.16%)	(0.1605, 0.48%)	(0.0507, 0.15%)	(0.2157, 0.65%)	(0.1276, 0.39%)	(0.2180, 0.66%)	(0.3749, 1.13%)		
	12ASP	120	<b>32.96</b>	(0.0000, 0.00%)	(0.0832, 0.25%)	(0.2022, 0.61%)	(0.0864, 0.26%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1117, 0.34%)	(0.2223, 0.67%)	(0.3343, 1.01%)		
	12CYS	120	<b>33.26</b>	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2232, 0.67%)	(0.1691, 0.51%)	(0.0789, 0.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2097, 0.63%)	(0.3516, 1.06%)		
	12SER	120	<b>33.01</b>	(0.1573, 0.48%)	(0.0716, 0.22%)	(0.2134, 0.65%)	(0.0951, 0.29%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0784, 0.24%)	(0.1689, 0.51%)	(0.3263, 0.99%)		
	12VAL	120	<b>33.25</b>	(0.1519, 0.46%)	(0.1960, 0.59%)	(0.1272, 0.38%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1298, 0.39%)	(0.0553, 0.17%)	(0.2162, 0.65%)	(0.3487, 1.05%)		
	13ASP	118	<b>33.16</b>	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1768, 0.53%)	(0.0998, 0.30%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1973, 0.59%)	(0.2802, 0.84%)		

\*\* SD, %CV

다음 페이지에서 표 계속

이전 페이지로부터 표 계속

표 34. SD 및 %CV 에 대한 분산 성분 - 재현성(계속)

분석 번호	검체 수준	분석	관찰 수	평균	기관 간*	기관 내 검사원 간*	검사원 수행 시간*	검사원 Rgt 간*	검사원 키트 로트 간*	검사원 작업자 간*	잔차*	총계
WT	12ALA	84	33.44	(0.1257, 0.38%)	(0.0961, 0.29%)	(0.1845, 0.55%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2083, 0.62%)	(0.3104, 0.93%)	
	12ARG	84	33.37	(0.1191, 0.36%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1869, 0.56%)	(0.1321, 0.40%)	(0.2529, 0.76%)	(0.1205, 0.36%)	(0.2132, 0.64%)	(0.4217, 1.26%)	
	12ASP	84	33.16	(0.0574, 0.17%)	(0.0738, 0.22%)	(0.2162, 0.65%)	(0.0563, 0.17%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1844, 0.56%)	(0.2997, 0.90%)	
	12CYS	84	33.42	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1964, 0.59%)	(0.0720, 0.22%)	(0.1311, 0.39%)	(0.0262, 0.08%)	(0.2258, 0.68%)	(0.3287, 0.98%)	
	12SER	84	33.20	(0.0812, 0.24%)	(0.1331, 0.40%)	(0.1734, 0.52%)	(0.0329, 0.10%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2009, 0.61%)	(0.1923, 0.58%)	(0.3535, 1.06%)	
	12VAL	84	33.41	(0.0000, 0.00%)	(0.0695, 0.21%)	(0.2046, 0.61%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1708, 0.51%)	(0.1437, 0.43%)	(0.2339, 0.70%)	(0.3799, 1.14%)	
	13ASP	84	33.46	(0.0000, 0.00%)	(0.0613, 0.18%)	(0.1802, 0.54%)	(0.0744, 0.22%)	(0.0073, 0.02%)	(0.0969, 0.29%)	(0.1790, 0.53%)	(0.2816, 0.84%)	



## 분석 정확도(임상 검체 사용)

검증된 Droplet Digital PCR(ddPCR) 방법과 비교하여 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 돌연변이 검출에서의 일치율을 입증하는 연구가 수행되었습니다. ddPCR 및 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 둘 다에서 결과를 보인 총 319 개의 검체를 분석하여 양성 일치율(Positive Percent Agreement, PPA), 음성 일치율(Negative Percent Agreement, NPA) 및 전체 일치율(Overall Percent Agreement, OPA)을 평가했습니다.

분석에 사용된 319 개의 검체는 Amgen 임상 연구 20170543 의 임상 검체와 입수한 비소세포폐암 검체가 조합되어 있었습니다. 두 방법 모두, G12C 이외의 결과를 반환한 검체가 이 분석에 대해 돌연변이 음성인 것으로 간주되었습니다. 319 개의 검체 중 5 개가 ddPCR 로 유효하지 않았습니다.

상응하는 양측 95% 신뢰 구간(Confidence Interval, CI)과 함께 OPA, NPA, PPA 가 표 35 에 요약되어 있습니다. OPA 는 97.45%였습니다. 결과 분석은 표 36 에 요약되어 있습니다.

표 35. KRAS kit 대 ddPCR 의 OPA, PPA, NPA(양측 95% 신뢰 구간)

그룹화 변수	비율	양측 95% 신뢰 한계		
		분수	백분율	하한
전체 일치율(OPA)	306 / 314	97.45%	95.04%	98.89%
양성 일치율(PPA)	149 / 150	99.33%	96.34%	99.98%
음성 일치율(NPA)	157 / 164	95.73%	91.40%	98.27%

표 36. 2x2 빈도 표 KRAS 키트 대 ddPCR

빈도	ddPCR G12C 결과			
	G12C	G12C 미검출	무효	총계
G12C	149	7	4	160
G12C 미검출	1	157	1	159
총계	150	164	5	319

## 비특이적 증폭

이 연구의 목적은 KRAS 키트 작동 범위 내 투입 DNA 최고 농도를 가진 야생형 검체에서 배경 증폭 수준을 평가하는 것이었습니다. 높은 DNA 투입 수준에서 임상 야생형인 60 개 복제물 모두의 비특이적 증폭으로부터 관찰된  $\Delta C_T$  값은 반응 혼합물 컷오프 값을 초과했습니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 60 개 야생형 복제물을 모두 No Mutation Detected(돌연변이 검출되지 않음)(야생형)으로 올바르게 식별했습니다.

## 투입 DNA 의 영향

DNA 투입 수준은 검체의 증폭 가능한 KRAS DNA(돌연변이 및 야생형 모두) 총량입니다. 이는 대조 반응의  $C_T$  값으로 결정됩니다. 여러 다른 총 DNA 수준의 검체는 동일한 비율의 돌연변이 DNA 를 포함하고 있으며, 측정된  $\Delta C_T$  값(즉, 돌연변이 반응과 대조 반응 간  $C_T$  값의 차이)는 여전히 일관되게 유지될 것이므로 검체 돌연변이 결과는 DNA 투입 수준에 의존적이거나 그 영향을 받지 않을 것으로 예상됩니다. 이 연구는 2 개의 파트로 구성되었습니다.

파트 1 은 투입 DNA 수준이  $\Delta C_T$  값에 미치는 영향을 설명하기 위해 설계되었습니다. 아홉 개의 FFPE 비소세포폐암 검체(4 개 세포주 및 5 개 임상)에서 추출한 DNA 가 이 연구에서 사용되었습니다. 검체를 약 20.00~21.00 $C_T$ 의 대조 반응  $C_T$  값으로 희석했고 이로부터, 6 개 복제물에 충분한 각 돌연변이의 DNA 풀을 약 32.00~33.00 $C_T$ 의  $C_T$  값에 해당하는 4 개 지점에 걸쳐 10 배로 연속적으로 희석했습니다(표 37).

표 37.  $\Delta C_T$  값의 투입 DNA 수준에 대한 연구를 위한 희석 시리즈

희석 계수	최초 풀	x10	x100	x1000	x10000
		(희석 1)	(희석 2)	(희석 3)	(희석 4)
예상	약	약	약	약	약
대조물질 CT 값	20.00~21.00 CT	23.00~24.00 CT	26.00~27.00 CT	29.00~30.00 CT	32.00~33.00 CT

이 범위는 검체의 DNA 투입 범위(21.92~32.00C<sub>T</sub>의 대조 반응 C<sub>T</sub>)에 걸치도록 설계되었고, 허용 DNA 농도보다 높은 희석 지점 한 개와 허용 DNA 농도보다 낮은 희석 지점 한 개를 포함합니다. 각 돌연변이에 대한 5 개의 DNA 투입 수준은 모두 대조 반응 혼합물 및 해당 돌연변이 반응 혼합물을 사용하여 단일 PCR 실행에서 테스트했습니다.

대조물질 C<sub>T</sub> 작동 범위 내 희석물 전반에 걸쳐 각 돌연변이 유형에 대한  $\Delta C_T$  값을 보여주는 선형 회귀 그래프가 생성되었습니다. 대조물질 C<sub>T</sub> 작동 범위 내 3 개 희석물에 대한 선형 회귀 선과 해당 양측 95% 신뢰 한계가 반복성 및 재현성 연구에서 계산된 대로 재현성에 대해 평균  $\pm 1.96x$  표준 편차 내에 있었으므로 연구의 파트 1 에 대한 연구 허용 기준이 모든 돌연변이에 대해 충족되었습니다. 모든 분석에 대해 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 작동 범위에서  $\Delta C_T$  값이 일관되게 나타나 DNA 투입 수준이 검체 돌연변이 판정에 영향을 미치지 않음을 보여줍니다.

연구의 파트 2 는 높은 DNA 투입 수준(약 23.00C<sub>T</sub>의 대조 반응)에서 다양한 돌연변이 백분율로 검체를 테스트하여 증폭 효율에 대한 돌연변이 양성 검체 연속 희석의 영향을 평가하기 위해 설계되었습니다. 임상 FFPE 비소세포폐암 및 FFPE 세포주 검체 풀의 DNA 를 약 22.00~23.00C<sub>T</sub>의 대조 반응 C<sub>T</sub> 값에 해당하는 광학 농도로 희석했습니다. 돌연변이 DNA 를 정규화된 야생형 DNA 가 되도록 2 배로 연속적으로 희석하여 다양한 돌연변이 백분율(100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% 돌연변이 백분율을 목표로 함)의 돌연변이 DNA 검체 당 5 개의 희석 시리즈를 생성했습니다.

표 38 은 각 분석에 대한 모든 증폭 효율을 요약합니다. 검체에 있는 돌연변이 DNA 와 비교한 야생형 DNA 의 증폭 효율은  $\Delta C_T$  값에 영향을 미치지 않았으므로 돌연변이 판정도 영향을 받지 않았습니다.

표 38. 돌연변이 분석의 증폭 효율

검체	증폭 효율
12ALA	0.921
12ASP	1.034
12ARG	0.916
12CYS	0.988
12SER	1.047
12VAL	1.082
13ASP	1.028*

\* 분석에서 이상값을 제외하고 이상값을 포함하여 계산한 값 증폭 효율 = 1.085

### 비특이적 증폭/교차 반응/배타성: 돌연변이 양성 KRAS DNA

대조 반응  $C_T$ 가 약 23 이 되도록 각 FFPE 세포주로부터 DNA 검체를 준비하여 고농도의 투입 DNA 를 가진 돌연변이 검체를 모든 반응 혼합물에 대해 테스트했습니다. 각 돌연변이 검체의 여섯 개의 복제본을 평가했습니다. 검체의 돌연변이 백분율은 세포주 DNA 의 돌연변이체 백분율에 의해 결정되었습니다. 평균  $\Delta C_T$  값이 표 39 에 표시되어 있으며, 돌연변이 반응 간에 교차 반응이 있음을 보여줍니다. 12ALA 돌연변이는 증폭되었으며 12CYS, 12SER, 12VAL 반응에 대한  $\Delta C_T$  임계값보다 낮은  $\Delta C_T$  값을 생성했습니다. 12VAL 돌연변이는 증폭되었으며, 12ALA 반응의  $\Delta C_T$  임계값보다 낮은  $\Delta C_T$  값을 생성했습니다. 12CYS 돌연변이는 증폭되었으며, 12ARG 반응의  $\Delta C_T$  임계값보다 낮은  $\Delta C_T$  값을 생성했습니다. 모든 사례에서 테스트 결과는 서로 짝을 이루는 돌연변이 반응에서 돌연변이 판정이 정확했음을 보여줍니다(즉, 최저  $\Delta C_T$  값이 올바른 돌연변이 판정임). 다른 모든 테스트 사례는 검출되지 않았거나  $\Delta C_T$  임계값 밖에 있었습니다.

표 39. 교차 반응 비소세포폐암

검체	컷오프	분석						
		12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
12ALA	8	1.31	12.80	-	5.01	2.26	5.57	12.65
12ASP	6.6	12.61	1.66	-	-	-	10.30	12.69
12ARG	8	12.98	11.08	0.81	11.24	-	12.66	12.62
12CYS	8	-	12.22	7.84	0.56	-	13.06	11.84
12SER	8	-	12.87	13.21	-	1.93	13.25	12.93
12VAL	7.5	5.93	14.29	-	-	13.14	0.45	12.39
13ASP	7.5	-	-	-	-	-	-	2.02

### 검체 처리 변동성

동일한 임상 검체 분석 시 여러 다른 실험실에서 동일한 결과를 생성하였음을 입증하기 위해 연구를 수행했습니다. 이 연구에서는 FFPE 세포주 및 임상 FFPE 비소세포폐암 검체를 조합하여 사용했습니다. 열세 개의 임상 FFPE 비소세포폐암 검체를 사용했으며, 12ASP 용 세 개, 12CYS 용 세 개, 12VAL 돌연변이용 네 개(총 10 개 돌연변이 검체) + 야생형 검체 세 개였습니다. 돌연변이 12ALA, 12ARG, 12SER, 13ASP 에 대해 양성인 네 개의 FFPE 세포주 검체를 사용했습니다. 검체를 눈가림하여 돌연변이 상태가 세 개 테스트 사이트 각각의 작업자에게 알려지지 않도록 했습니다. 세 개의 기관 각각에서는 돌연변이와 야생형당 20 개의 FFPE 절편 배치(즉, 10 쌍)에서 DNA 추출을 수행했습니다. 세 개의 사이트에서 총 314 회의 추출을 수행했습니다. 3 개의 개별 테스트 기관에서의 모든 검체 준비는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용하여 테스트했을 때 일곱 개의 돌연변이 및 야생형 검체 각각에 대해 올바른 돌연변이 판정을 제공했습니다. 일곱 개의 돌연변이 및 야생형 검체 각각에 대한 전체 판정은 100% 정확하여 KRAS Kit 를 사용한 DNA 추출 절차 및 돌연변이 검출에 대한 사이트 간 일관성을 입증했습니다.

이전 연구에서 이 돌연변이들을 대표하는 세포주 검체를 사용한 것처럼 12ALA, 12ARG, 12SER 및 13ASP 돌연변이를 대표하는 임상 FFPE 임상 비소세포폐암 검체를 사용하여 추가 검체 처리 연구를 수행했습니다. 이 추가 연구는 이전 연구와 동일한 연구 설계를 따랐습니다. 세 개의 개별 테스트 기관에서의 12ALA, 12ARG, 13ASP 돌연변이 검체에 대한 모든 검체 준비는 KRAS Kit 를 사용하여 테스트했을 때 올바른 돌연변이 판정을 제공했습니다. 이러한 검체에 대한 전체 올바른 판정은 100%였습니다. 12SER 돌연변이에 대한 검체 준비는 세 개의 개별 테스트 기관에서 28/30(93.33%와 동등한 올바른 판정 백분율)의 올바른 돌연변이 판정의 빈도를 제공했습니다. 이런 결과는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용하여 테스트를 수행하는 데 사용되는 DNA 추출 절차 및 검체 처리 작업 흐름의 일관성을 보여줍니다.

## 로트 상호 교환성

이 연구의 목적은 추출에 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 및 KRAS 돌연변이 분석에 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 여러 다른 로트로 사용 시 테스트한 검체의 검체 돌연변이 상태에 영향이 없음을 입증하는 것이었습니다. 각 키트의 세 로트를 사용하여 FFPE 비소세포폐암 검체를 검사했으며, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 와 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 다른 로트를 사용해도 검사된 검체의 돌연변이 상태에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인했습니다. 스물네(24) 개의 비소세포폐암 검체(*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 검출된 일곱 개의 돌연변이에 대해 각 세 개 + 세 개의 야생형 검체)가 연구에서 사용되었습니다. 각 검체는 세 개 로트의 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 를 사용하여 추출했습니다. 모든 DNA 추출은 RGQ 기기의 동일한 PCR 실행 내에서 각각 세 개 로트의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용하여 테스트했습니다.

$\Delta C_T$  값(돌연변이 반응과 대조 반응 간  $C_T$  값의 차이) 및 돌연변이 판정은 여러 다른 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 를 사용하여 추출한 모든 테스트 검체에 대해 수집했고 서로 다른 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용하여 테스트했습니다. "전체 비율에 대해 돌연변이 판정의 95% 이상이 정확해야 한다"는 허용 기준은 각 돌연변이와 야생형이 100% 정확하게 판정됨으로써 충족되었습니다.

## FFPE 절편의 안정성

이 연구의 주요 목표는 어두운 곳에서 상온에 보관 시 절제 FFPE 비소세포폐암 검체로 준비한 절편이 안정적임을 입증하는 것이었습니다. 다섯 개의 KRAS 돌연변이 양성 임상 FFPE 비소세포폐암 검체(돌연변이 12ALA, 12ASP, 12CYS, 12VAL, 13ASP 각각에 대해 한 개)와 한 개의 KRAS 야생형 검체로부터 획득한 검체 절편을 절단하여 필요할 때까지 보관했습니다. 75 주에 걸쳐 다섯 개 지점에서 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용하여 절편을 테스트했습니다. 모든 검체가 모든 지점에서 올바른 돌연변이 상태 판정을 제공했습니다. 이 연구는 FFPE 절편이 상온에서 최소 70 주 동안 안정적임을 입증했습니다.

이 두 번째 연구는 어두운 곳에서 상온에 보관 시 FFPE 비소세포폐암 FNA 검체로 준비한 절편이 안정적임을 입증하기 위해 수행되었습니다.

이 연구에서는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 검출된 일곱 개의 KRAS 돌연변이에 대해 야생형인 FNA 검체를 사용했습니다. 열 개의 KRAS 야생형 검체로부터 획득한 절편을 사용했습니다. 이러한 검체는 한 개 로트의 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 를 사용하여 추출했습니다. DNA 를 추출하여 T0 에서 테스트한 다음 T1(T0+52 주), T2, T3 에서 테스트했으며, 이 작업은 T1 이후 추가 여덟 주에 걸쳐 수행되었습니다. 이 연구 중에 획득한 결과는 올바른 조건에서 보관 시 FFPE 비소세포폐암 FNA 검체가 최소 56 주 동안 안정적이라는 증거를 제공합니다.

## 간섭 물질

이 연구는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용하여 테스트를 수행할 때 위양성 또는 위음성 결과를 생성할 잠재적 간섭 물질의 존재를 입증하기 위해 설계되었습니다. DNA 추출 절차에서 여덟(8)개의 잠재적 간섭 물질이 확인되었고 파라핀 왁스, 자일렌, 에탄올, Buffer ATL, 단백질분해효소 K, Buffer AL, Buffer AW1 및 Buffer AW2 였습니다. 각 물질은 여덟 개의 FFPE 세포주에서 추출한 DNA 를 사용하여 테스트했으며, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 검출된 각 일곱 개의 돌연변이 및 야생형 검체를 대표했습니다. 돌연변이 검체는 검출 한계의 약 세 배(3xLOD)에 해당하는 수준에서 테스트했습니다. 두 분석물질 모두(돌연변이



및 야생형 검체)에 세 개의 다른 수준(최고 예상 교차 오염(1x), 최고 예상 교차 오염의 열 배(10x), 최고 예상 교차 오염의 백 배(100x))로 각 여덟 개의 잠재적 간섭 물질을 스파이크했습니다. 음성 대조물질 역할을 할 수 있도록, 두 분석물질 모두 DNA 추출에서 최종 용출 완충액인 Buffer ATE 로 스파이크했습니다. 연구는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에 교차 오염을 발생시킬 수 있는 FFPE DNA 추출 키트에서 확인된 물질이 간섭 물질 1x 수준에서 분석 성능에 어떠한 부정적인 영향도 미치지 않았으며, 항상 올바른 돌연변이 판정을 제공했고, 간섭 물질이 테스트한 조건의 검체 대부분(58/64 조건, 1x 수준)에 대해 평균  $\Delta C_T$  차이에 통계적으로 유의한 영향을 미치지 않았음을 입증했습니다. 통계적으로 유의미한 차이를 보인 여섯 개 검체의 경우, 각 검체의 평균에서 관찰된 차이는 연구 허용 기준인  $\pm 2 \times SD$ (재현성 연구에서 가져온 SD 추정치) 이내였습니다.

헤모글로빈(Hb)이 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 에 미치는 영향을 평가하기 위해 추가 연구를 수행했습니다. 이 연구에서는 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL, 12CYS, 13ASP 돌연변이에 대해 조달된 임상 절제 검체를 사용했습니다. 돌연변이의 희귀성으로 인해 12SER 임상 검체는 평가하지 않았습니다. 임상 KRAS 야생형 FFPE 검체는 연구 검체 세트에 통합하여 돌연변이 음성 상태인 검체에서의 잠재적 간섭을 평가했습니다. 테스트 검체는 두 가지 다른 농도의 Hb(최고 예상 교차 오염의 절반(0.5x) 및 최고 예상 교차 오염(1x))로 스파이크했습니다. 권장 테스트 농도(1x)는 CLSI EP07-A2 에서 2g/L 로 선택되었습니다. 이 연구는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용한 12ASP, 12ARG, 12VAL, 12CYS 및 13ASP 돌연변이의 검출이 잠재적 간섭 물질 헤모글로빈의 영향을 받지 않음을 입증했습니다. 그러나 KRAS 키트를 사용한 12ALA 돌연변이의 검출은 0.50 $\mu$ g/ $\mu$ L Hb 이상의 농도에서 영향을 받습니다.

## 보호대역 연구

보호대역 연구의 목적은 KRAS 키트의 강건성을 확립하는 것이었습니다. 돌연변이 보고에 미치는 잠재적 영향에 대해 변화를 평가했습니다. KRAS 키트의 강건성을 평가하기 위해 다음 연구를 수행했습니다.

### 다양한 단백질분해효소 K 분해 시간

이 연구의 목적은 다양한 단백질분해효소 K 분해 시간(50, 55, 60, 65, 70 분)에 대해 *therascreen* KRAS RGQ PCR 시스템의 강건성을 입증하는 보호대역 연구 데이터를 제공하는 것이었습니다. KRAS 키트로 검출된 각 일곱 개의 돌연변이와 함께 한 개의 야생형(Wild Type, WT)을 대표하는 여덟 개의 비소세포폐암(Non-Small Cell Lung Cancer, NSCLC) 검체(네 개 FFPE 세포주 및 네 개 임상 FFPE 비소세포폐암 검체)를 FFPE 추출 Kit 를 사용하여 추출했고 한 개 로트의 KRAS Kit NSCLC 을 사용하여 테스트했습니다(6 개 복제물). 검체의 DNA 투입 수준은 KRAS Kit 대조 반응 혼합물을 사용하여 측정했습니다. 돌연변이 검체는 대조 반응 혼합물 및 관련 돌연변이 반응 혼합물을 사용하여 테스트했고 WT 검체는 KRAS 키트의 여덟 개 반응을 모두 사용하여 테스트했습니다.  $\Delta C_T$  값(돌연변이 반응과 대조 반응 간  $FAM C_T$  값 차이) 및 모든 검체에 대한 돌연변이 판정을 각 분해 시점에 획득했습니다.

55 분, 60 분, 65 분의 여러 다른 단백질분해효소 K 분해 시점에 모든 검체가 100% 올바른 돌연변이 판정으로 판정되었고, KRAS 시스템의 강건성을 입증했습니다. 전반적으로 다양한 단백질분해효소 K 분해 시간(50 분~70 분)은 KRAS NSCLC 시스템의 성능에 유의한 영향을 미치지 않았습니다. 전체 연구의 경우, 238/239 개의 유효 검체가 정확한 돌연변이 판정을 제공했고 한 개의 유효 WT 복제물이 70 분에 12ASP 돌연변이 결과를 제공했습니다. 이 검체의 다른 복제물 다섯 개는 모두 예상된 WT 판정을 제공했으므로 조사를 개시하지 않았습니다.

12ARG 돌연변이를 대표하는 데 최장 세포주를 사용한 초기 연구에서의 결함을 설명하기 위해 12ARG 돌연변이(인간 폐 세포주 FFPE 검체 사용)를 평가하는 추가 연구도 수행했습니다. KRAS 키트로 검출된 12ARG 돌연변이를 대표했던 FFPE 세포주 검체를 이 연구에서 테스트했습니다. 위에 설명된 연구와 비슷하게 55 분, 60 분, 65 분, 70 분 동안 처리된 검체를 평가했습니다. 모든 반응 복제물(144 개)에서 올바른 판정이 나왔습니다.

## 용적 허용범위에 대한 보호대역 연구

이 연구의 목적은 피펫팅 용량에 변동에 대한 *therascreen* KRAS Kit의 허용범위를 결정하는 것이었습니다. 이 연구에서는 세포주를 사용했습니다. 이 연구에서는 여덟 개의 FFPE 세포주 검체(12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 13ASP 및 WT), 양성 대조물질(PC) 및 템플릿 없는 대조물질(NTC)을 사용했습니다. KRAS Kit의 각 PCR 성분의 부피(즉, 각 반응 혼합물, 검체 또는 *Taq* 중합효소)는 최대 약  $\pm 20\%$ 까지 개별적 및 점증적으로 달랐으나 기타 모든 성분은 키트에 대한 표준 용량으로 사용되었습니다. 각 변수가 테스트 조건(Test Condition, TC)으로 간주되었습니다. 각 실행은 피펫팅 용량만 제외하고 표준 방식으로 설정되었습니다. 각 실행에 사용된 시약 용량이 다양하였으므로 총 23 개의 테스트 조건이 분석되었습니다. 이 보호대역 연구는 *therascreen* KRAS RGQ PCR System이 12ASP 이외의 다른 모든 분석에 대해 최대 약  $\pm 20\%$ 까지 다양한 피펫팅 용량에서 강건함을 입증했습니다. KRAS Kit의 각 PCR 성분의 용량은 개별적 및 점증적으로 변화했지만 기타 모든 성분은 표준 용량으로 사용했을 때, 돌연변이 판정에 변화가 없었고 모든 평균  $\Delta C_T$ 의 차이는 12ASP 이외의 다른 모든 분석에 대해 반복성 및 재현성에서  $\pm 2$  배의 관찰된 중간 정밀도 내에 있었습니다.  $-21\%$  *Taq*에 대한 용적 허용범위 수준에서 12ASP 분석으로 얻은 결과는 허용 기준을 통과하지 못했습니다. 12ASP 검체는  $\pm 8\%$  용적 허용범위의 허용 기준을 충족했으므로 이 반응에 대해 이 수준으로 설정했습니다.

12ARG 돌연변이를 대표하는 데 최장 세포주를 사용한 초기 연구에서의 결함을 설명하기 위해 12ARG 돌연변이(인간 폐 세포주 FFPE 검체 사용)를 평가하는 추가 보호대역 연구도 수행했습니다. KRAS 키트로 검출된 12ARG 돌연변이를 대표했던 FFPE 세포주 검체를 이 연구에서 테스트했습니다. 검체는 23 개의 테스트 조건 모두를 사용해서 3 회 반복 테스트했습니다. 위양성 또는 위음성 결과를 초래할 가능성이 가장 높은 조건을 다시 만들기 위해, 여러 성분의 용량(반응 혼합물, *Taq*, 검체)을 동시에 변경했습니다. 연구의 허용 기준은 여러 다른 PCR 성분 수준 간 평균 델타  $C_T$  값의 차이가 0 과 크게 다르지 않거나 추정치 반복성 및 재현성 연구 중에 산출된 중간 정밀도 값의 두 배 이하여야 한다는 것이었습니다. 모든 결과가 이러한 요구 사항을 충족했습니다. 이 보호대역 연구는 KRAS Kit가 피펫팅 오류로 인한 최대  $\pm 20\%$ 의 용량 허용범위 차이를 견디기에 충분히 강건함을 입증했습니다(다른 모든 인자가 일정할 때).

## 임상적 성능

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 KRAS 유전자의 코돈 12 와 13 에서 7 가지의 KRAS 돌연변이를 특이적으로 검출하도록 만들어졌습니다. 이것은 이들 코돈에서 야생형 서열을 특정적으로 검출하도록 만들어지지 않았습니다. 테스트 결과는 "[mutation name] Detected"([변이 이름] 검출) 및 "No Mutation Detected"(돌연변이 검출되지 않음)로 보고됩니다. 아래에 제시된 임상 연구들에서 KRAS 돌연변이 양성 결과는 종양 조직이 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에 의해 검출된 7 가지 돌연변이(G12A, G12D, G12R, G12C, G12S, G12V, G13D) 중 하나 이상에 대하여 양성인 환자들입니다. KRAS 돌연변이 음성(야생형)은 종양 조직이 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 검출된 7 가지 돌연변이에 대하여 음성인 환자를 말합니다(즉, 검체가 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 동정되지 않은 돌연변이를 KRAS 유전자에 갖고 있을 수 있음).

## Erbixux(세특시맵)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구

Erbixux(세특시맵)를 사용한 치료를 위해 환자를 선택할 수 있도록 하는 동반 진단 테스트로서의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 임상적 유용성을 지지하기 위한 데이터를 생성하기 위해 한 건의 임상적 성능 연구가 수행되었습니다. Erbixux(세특시맵)의 안전성과 효과는 CA225025 연구에서 입증되었습니다. CA225025 는 이전에 치료된 EGFR 발현 재발성 전이성 결장직장암(metastatic CRC, mCRC)를 가진 572 명의 환자에서 수행된 다기관, 공개 라벨, 무작위 배정 임상 시험이었습니다. 환자들은 Erbixux(세특시맵) + 최선의 지지 치료(Best Supportive Care, BSC) 또는 BSC 만을 받도록 무작위(1:1) 배정되었습니다. Erbixux(세특시맵)는 처음에 400mg/m<sup>2</sup>로 투여되었으며, 질병 진행이나 용납할 수 없는 독성이 나타날 때까지 매주 250mg/m<sup>2</sup> 씩 투여했습니다.

572 명의 무작위 배정 환자의 연령(중양값)은 63 세였고, 남성은 64%, 백인은 89%였으며, 77%는 베이스라인 ECOG 활동 상태가 0~1 이었습니다. 인구 통계학 및 베이스라인 특징은 치료군 간에 유사했습니다. 모든 환자는 이리노테칸(irinotecan) 포함 요법과 옥살리플라틴(oxaliplatin) 포함 요법을 포함한 이전 치료를 받고 진행을 보였습니다.

453/572 명(79%)의 환자에서 KRAS 돌연변이 상태를 확인할 수 있었습니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 평가했을 때 245 명(54%)의 환자는 KRAS 돌연변이 양성 종양이었고, 208 명(46%)은 KRAS 돌연변이 음성 종양이었습니다.

이 연구의 주된 성과 척도는 전체 생존 기간(Overall Survival, OS)이었습니다. KRAS 돌연변이 음성(야생형) 집단의 경우, 생존 기간(중앙값)(95% CI)은 Erbitux(세특시맵) + BSC 치료군이 8.6(7.0, 10.3)개월, BSC 치료군이 5.0(4.3, 5.7)개월이었습니다. BSC 대비 Erbitux(세특시맵) + BSC 의 OS 위험비는 0.63 이었습니다. 95% 신뢰 구간(Confidence Interval, CI)은 (0.47, 0.84)였습니다.

KRAS 돌연변이 양성 집단의 경우, 생존 기간(중앙값)은 Erbitux(세특시맵) + BSC 치료군이 4.8(3.9, 5.6)개월, BSC 치료군이 4.6(3.6, 4.9)개월이었습니다. 위험비는 0.91 이었으며, 95% CI(0.67, 1.24)였습니다. 결과는 표 40 과 그림 1 에 나와 있습니다.

**표 40. 이전에 치료된 EGFR 발현 전이성 결장직장암(모두 무작위 배정 및 KRAS 상태)에서의 전체 생존 기간**

	야생형					
	모두 무작위 배정		KRAS 돌연변이 음성		KRAS 돌연변이 양성	
	Erbitux+BSC N=287	BSC N=285	Erbitux+BSC N=117	BSC N=128	Erbitux+BSC N=108	BSC N=100
중앙값(개월) (95% CI)	6.1 (5.4, 6.7)	4.6 (4.2, 4.9)	8.6 (7.0, 10.3)	5.0 (4.3, 5.7)	4.8 (3.9, 5.6)	4.6 (3.6, 4.9)
위험비 (95% CI)	0.77 (0.64, 0.92)		0.63 (0.47, 0.84)		0.91 (0.67, 1.24)	
p-값*	0.0046		-		-	

\* 층화 로그 순위 검정 기반.

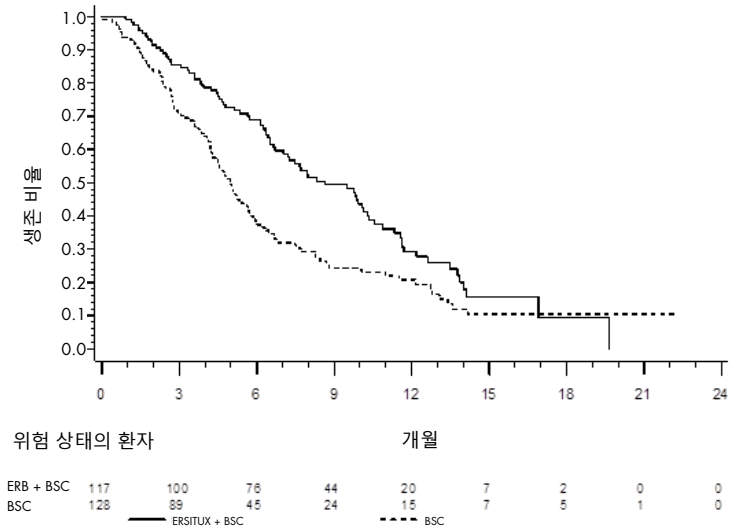


그림 1. KRAS 돌연변이 음성(야생형) 전이성 결장직장암 환자의 전체 생존 기간에 관한 카플란-마이어 곡선.

6 개월 및 12 개월에서 카플란-마이어 추정치에 기초한 전체 생존율은 KRAS 야생형 하위 집단에서 Erbitux(세톡시맵)+BSC 치료군이 BSC 치료군에 비해 더 높았습니다. 이런 우위는 KRAS 돌연변이 하위 집단에서는 관찰되지 않았습니다.

### Vectibix(파니투무맵)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구

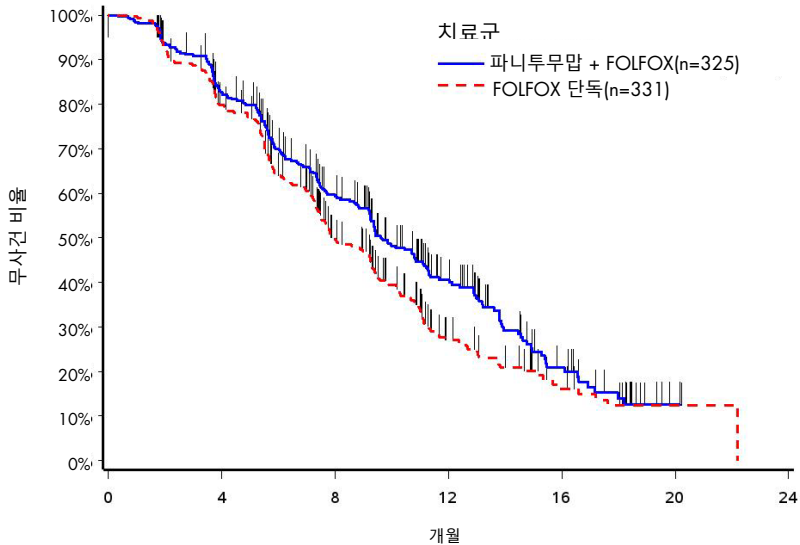
Vectibix(파니투무맵)로 치료할 환자 파악에 도움이 되는 동반 진단 테스트로서 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 의 임상적 유용성을 뒷받침하는 데이터를 생성하기 위해 한 건의 임상적 성능 연구가 수행되었습니다. 이 연구의 목적은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 결정된 KRAS 돌연변이 상태를 Vectibix(파니투무맵) 치료의 이점을 누릴 수 있는 전이성 결장직장암 환자를 선택하는 데 사용할 수 있는지 평가하는 것이었습니다. 임상 시험 20050203 은 다기관, 전향적, 공개 라벨, 무작위 배정 3 상 연구로, 이전에 치료 받지 않은 재발성 전이성 결장직장암 환자에서 옥살리플라틴, 5-플루오로우라실(5-FU), 루코보린(FOLFOX)과 조합한 파니투무맵의 효능을 FOLFOX 단독 요법과 비교 평가했습니다.

20050203 연구에 참여한 환자들의 보관된 종양 검체를 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 검사하여 두 개의 하위 그룹을 식별했습니다. KRAS 종양 유전자의 엑손 2 의 코돈 12 와 13 에 7 가지의 KRAS 돌연변이 중 최소 하나가 있는가 또는 전혀 없는가에 따라 KRAS 돌연변이 양성(돌연변이 KRAS)과 KRAS 돌연변이 음성(야생형 KRAS)입니다. 후향적 분석에서 연구 20050203 의 효능 데이터를 KRAS 하위군을 기준으로 계층화했습니다. KRAS 분석의 주 목적은 KRAS 돌연변이 종양 환자에 비해 KRAS 야생형 종양 환자에서 FOLFOX 단독 요법에 비해 Vectibix(파니투무맙) + FOLFOX 가 PFS 의 전반적인 개선이 훨씬 더 크게 나타났는지 평가하는 것이었습니다.

미리 지정된 일차 효능 평가 항목은 영상에 대한 독립적 종양 맹검 평가에 의해 평가된 야생형 KRAS 전이성 결장직장암 환자군(n = 656)에서의 무진행 생존 기간(Progression-Free Survival, PFS)이었습니다. 다른 주요 효능 평가 항목은 OS 및 ORR 이었습니다. 야생형 KRAS 전이성 결장직장암 환자에게서의 효능 결과가 표 41 과 그림 2 에 나와 있습니다.

**표 41. 야생형 KRAS 전이성 결장직장암 환자에게서의 효능 결과**

		PFS			
야생형 KRAS 모집단	중양값(개월) (95% CI)	위험비 (95% CI)	p-값	ORR (95% CI)	
파니투무맙 + FOLFOX N=325	9.6 (9.2, 11.1)	0.80 (0.66, 0.97)	0.02	54% (48%, 59%)	
FOLFOX 단독 N=331	8.0 (7.5, 9.3)			47% (41%, 52%)	



위험 상태의 환자:	325	254	156	73	22	1	0
파니투무맙 + FOLFFOX	331	242	127	41	16	2	0
FOLFFOX 단독							

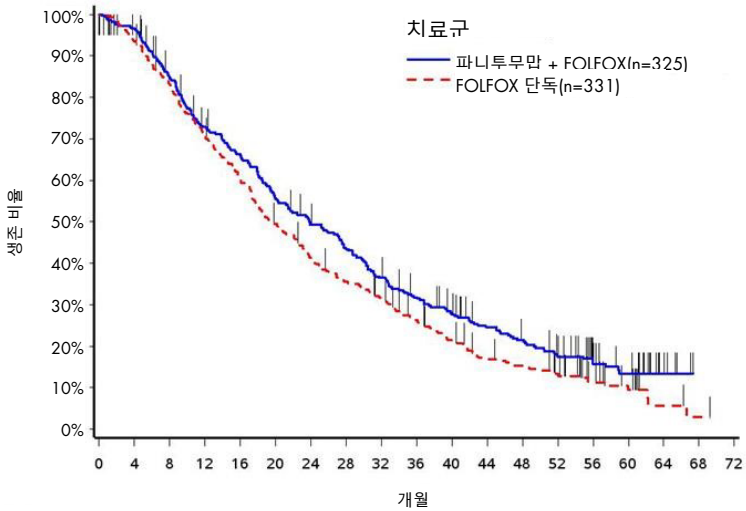
그림 2. 야생형 KRAS 전이성 결장직장암 환자의 무진행 생존 기간(PFS)에 대한 카플란-마이어 곡선.

KRAS 돌연변이 중양 환자들 중에서 Vectibix(파니투무맙) + FOLFFOX 를 투여한 221 명의 중양 PFS 는 7.3 개월(95% CI: 6.3, 8.0)이었으며, FOLFFOX 를 단독 투여한 219 명의 중양 PFS 는 8.8 개월(95% CI: 7.7, 9.4)이었습니다(HR = 1.29, 95% CI: 1.04, 1.62). 중양 OS 는 Vectibix(파니투무맙) + FOLFFOX 를 투여한 환자들이 15.5 개월(95% CI: 13.1, 17.6)이었으며, FOLFFOX 를 단독 투여한 환자들은 19.3 개월(95% CI: 16.5, 21.8)이었습니다(HR = 1.24, 95% CI: 0.98, 1.57).

야생형 KRAS 전이성 결장직장암 환자의 82%에서의 이벤트를 기반으로 업데이트된 정보를 사용한 OS 탐색 분석에서 FOLFFOX 단독 요법과 비교하여 Vectibix(파니투무맙) + FOLFFOX 병용 요법의 치료 효과를 추정했습니다. Vectibix(파니투무맙) + FOLFFOX 를 병용 투여한 야생형 KRAS 야생형 결장직장암 환자 325 명의 중양 OS 는 23.8 개월(95% CI: 20.0,



27.7)이었으며, FOLFOX 를 단독 투여한 331 명의 환자의 중앙 OS 는 19.4 개월(95% CI: 17.4, 22.6)이었습니다(HR = 0.83, 95% CI: 0.70, 0.98). 결과는 그림 3 에 나와 있습니다.



위험 상태의 환자:

파니투무맙 + FOLFOX  
FOLFOX 단독

325	310	266	227	205	172	151	132	111	94	78	63	54	42	25	17	6	0	0
331	304	267	226	191	157	129	111	96	77	61	45	40	32	17	10	3	1	0

그림 3. 야생형 KRAS 전이성 결장직장암 환자의 전체 생존 기간(OS)에 대한 카플란-마이어 곡선.

## LUMAKRAS™(소토라십)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구

LUMAKRAS(소토라십)을 사용한 치료를 위한 비소세포폐암 환자의 파악에 도움이 되는 동반 진단 테스트로서의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 임상적 유효성을 입증하기 위해 한 건의 임상적 성능 연구가 수행되었습니다. 이 연구의 목적은 *therascreen* KRAS RGQ PCR sKit로 결정된 G12C 돌연변이 상태를 LUMAKRAS(소토라십) 치료의 이점을 누릴 수 있는 진행성 비소세포폐암 환자를 선택하는 데 사용할 수 있는지 평가하는 것이었습니다. 임상시험 20170543은 KRAS G12C 돌연변이를 가진 진행성 고형종양 성인 시험대상자에서 LUMAKRAS(소토라십)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위해 설계된 진행 중인 공개, 다기관, 제 1/2 상 연구입니다. 이 연구의 비소세포폐암 제 2 상 부분에 대한 일차 분석에서 획득한 데이터가 동반 진단 테스트로서 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 임상적 유효성을 지지하기 위해 사용되었습니다. 현지 실험실 결과에서 KRAS G12C 돌연변이 비소세포폐암으로 평가된 시험대상자에게 등록이 제한되었고, 이는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 사용한 중앙 테스트로 확인되었습니다.

이 연구의 비소세포폐암 제 2 상 부분의 일차 평가 변수는 Response Evaluation Criteria in Solid Tumors(RECIST) 버전 1.1로 평가한 종양 객관적 반응률(Objective Response Rate, ORR), KRAS G12C 돌연변이 진행성 종양이 있는 시험대상자에서 단독 요법으로서 LUMAKRAS(소토라십)의 기준을 평가하는 것이었습니다.

총 126 명의 비소세포폐암 환자 중 124 명의 시험 대상자가 전체 분석군에 포함되었습니다. 두 명의 시험대상자가 눈가림 상태의 독립적 중앙 검토(Blinded Independent Centralized Review, BICR)에 따라  $\geq 1$  개의 측정 가능한 병변이 없었기 때문에 제외되었습니다. 컴퓨터 단층촬영 또는 자기공명영상으로 측정했고 BICR 실험실에서 RECIST 1.1에 따라 KRAS G12C 돌연변이 비소세포폐암 시험대상자에 대해 평가한 ORR(전체 반응 + 부분 반응)의 일차 평가 변수는 36%(45/124 명의 시험대상자, 95% CI: 28~45%)였으며, 두(2)명의 시험대상자(2%)가 완전 반응을 달성했고 43 명의 시험대상자(35%)가 부분 반응을 달성했다고 평가했습니다. 카플란-마이어 방법의 반응 지속 기간(Duration Of Response, DOR) 중앙값은 10 개월이었습니다(범위: 1.3+, 11.1).

## Krazati®(아다그라시브)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구

KRAS G12C 돌연변이 검출 테스트 결과를 기반으로 Krazati(아다그라시브)를 사용하여 치료할 비소세포폐암 환자를 식별하는 데 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 동반 진단으로 사용하는 경우 이 키트의 임상 효능을 입증하기 위한 가교 연구를 수행했습니다. 이 결과는 임상시험 849-001 의 코호트 A 에서 관찰된 임상적 효능과 비교되었습니다. 임상 효능은 KRAS G12C 돌연변이 검출, KRAS G12C 돌연변이 미검출, KRAS G12C 돌연변이 미평가 시험대상자에 대한 ORR 을 각각 측정하여 평가했습니다.

임상시험 849-001 은 KRAS G12C 돌연변이가 있는 진행성 고형종양 환자를 대상으로 한 Krazati(아다그라시브)의 1/2 상 다중 확장 코호트 시험이었습니다. 이 임상시험의 일차 목적은 KRAS G12C 돌연변이가 있는 진행성 악성 고형종양 환자를 대상으로 Krazati(아다그라시브)의 안전성과 내약성의 특징을 표현하고 Krazati(아다그라시브)의 약동학을 평가하는 것이었습니다. 코호트 A 는 이전에 백금 기반 요법과 면역 체크포인트 억제제로 치료를 받은 KRAS G12C 돌연변이가 있는 진행성 비소세포폐암 환자를 등록했습니다. 효능 평가의 일차 중점은 RECIST 버전 1.1 에 따른 ORR 이었습니다.

다중 임상시험 분석(Clinical Trial Assays, CTA)에 의해 등록된 코호트 A 시험대상자 총 116 명 중 12 명은 KRAS G12C 테스트에 보내지 않았는데, 이는 테스트하기에 종양이 충분하지 않아 후속 분석에 포함되지 않았기 때문입니다. 코호트 A 검체를 테스트하는 것 외에도 가교 연구의 일환으로 조달한 임상 KRAS G12C 음성 시료 114 개를 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 테스트했습니다. 고유한 시험대상자 총 218 명(코호트 A 에서 104 명 및 조달 114 명)의 FFPE 조직 시료를 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 KRAS G12C 테스트를 수행하도록 중앙 실험실로 보냈습니다.

두 개의 시료는 동일한 조달 시험대상자로부터 얻은 것이므로 총 219 개 시료의 KRAS G12C 돌연변이 상태를 테스트했습니다. 코호트 A 의 검체 세 개에는 종양이 없거나 테스트할 검체가 충분하지 않았습니다. 테스트 가능한 검체 216 개 중 210 개에서 평가 가능한 결과가 나왔습니다. 고유 시험대상자 218 명 중 209 명에게서 평가 가능한 결과가 나왔습니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로 테스트했을 때 조달된 임상 KRAS G12C 음성 시료 중 KRAS G12C 양성으로 확인된 시료는 없었습니다.

임상 가교 연구를 기반으로 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit(CDx)와 임상 시험 등록 분석(CTA) 간 양성 일치율(PPA)과 음성 일치율(NPA)을 계산했습니다(PPA: 88.78%, NPA: 100%)(표 42). NPA 100%는 의도된 사용 모집단에서 CDx 로 테스트한 KRAS G12C 돌연변이 양성 환자의 최종 예상 약효(ORR)가 849-001 임상시험의 코호트 A 일차 효능 모집단에서 관찰한 CDx 양성 환자의 예상 약효와 동일함을 나타냅니다.

**표 42. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit(CDx)와 임상시험 등록 분석(CTA) 간 일치율**

	CTA 양성, n	CTA 음성, n	총계
CDx 양성, n	87	0	87
CDx 음성, n	11	111	122
총계	98	111	209
양성 일치율[95% CI <sup>(1)</sup> ]		88.78% (80.80%, 94.26%)	
음성 일치율[95% CI <sup>(1)</sup> ]		100.00% (96.73%, 100%)	

<sup>(1)</sup>95% CI 는 직접확률법(클로퍼-피어슨)으로 계산됨

누락된 *therascreen* KRAS G12C 테스트 결과에 대한 임상 효능 추정치의 견고성을 평가하는 민감도 분석을 다양한 대체 방법을 사용하여 수행했습니다. 기기의 의도된 사용 모집단에서 *therascreen* KRAS G12C 돌연변이 양성 시험대상자의 임상 효능(ORR)은 관찰 및 귀속 결과를 기반으로 다양한 가정 시나리오에 따라 추정되었습니다. 이 민감도 분석에서는 예상 임상 효능의 견고성을 입증했습니다.

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 Krazati(아다그라시브)를 사용한 치료를 위해 KRAS G12C 돌연변이 검출로 환자를 식별하는 데 효능이 있는 것으로 입증되었습니다. 측정 가능한 질병이 있는 KRAS G12C 돌연변이 검출 환자의 일차 평가 변수인 ORR 은 43%(36/83, 95% CI: (33%, 55%))로, 표준 치료에서 23%로 보고된 가정 응답률을 초과하고 연구 수용 기준을 충족했습니다.

Erbix, Vectibix, LUMAKRAS, Krazatiindications 에 관한 자세한 정보는 [www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm) 에 있는 최신 의약품 라벨을 참고하십시오.

## 참고 문헌

1. Hilger, R.A., Scheulen, M.E., Strumberg, D. (2002) The Ras-Raf-MEK-ERK pathway in the treatment of cancer. *Onkologie* **25**, 511.
2. Bachireddy, P., Bendapudi, P.K., Felsher, D.W. (2005) Getting at MYC through RAS. *Clin. Cancer Res.* **11**, 4278.
3. Benvenuti, S., et al. (2007) Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-epidermal growth factor receptor antibody therapies. *Cancer Res.* **67**, 2643.
4. Neumann, J., Zeindl-Eberhart, E., Kirchner, T., Jung, A. Epub 2009 Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol. Res. Pract.* **205**, 858.
5. Di Fiore, F., et al. (2007). Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br. J. Cancer* **96**, 1166.
6. Bokemeyer, C., et al., (2008) K-RAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J. Clin. Oncol.* **26** (May 20 suppl; abstr 4000).
7. Van Cutsem, E., et al. (2008) K-RAS status and efficacy in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with FOLFIRI with or without cetuximab: The CRYSTAL experience. *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 2).

8. Tejpar, S., et al. (2008) Relationship of efficacy with K-RAS status (wild type versus mutant) in patients with irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer (mCRC), treated with irinotecan (q2w) and escalating doses of cetuximab (q1w): The EVEREST experience (preliminary data). *J. Clin. Oncol.* **26**, (May 20 suppl; abstr 4001).
9. Amado, R.G., et al. (2008) Wild-type KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer: Results from a phase III trial of panitumumab compared to best supportive care. *J. Clin Oncol.* **26**,1626.
10. Freeman, D.J. et al. (2008) Association of K-ras mutational status and clinical outcomes in patients with metastatic colorectal cancer receiving panitumumab alone. *Clin. Colorectal Cancer* **7**,184.
11. Freeman, D., et al. (2007) Association of somatic KRAS gene mutations and clinical outcome in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC) receiving panitumumab monotherapy. *Eur. J. Cancer* **5**, 239.
12. Douillard, J.Y., et al. (2010) Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: The PRIME study. *J. Clin. Oncol.* **28**, 4697.
13. Peeters, M., et al. (2010) Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* **28**, 4706.
14. De Roock, W., et al (2007). KRAS mutations preclude tumor shrinkage of colorectal cancers treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* **25**, 4132.

15. Arbour, K.C., et al. (2018). Effects of Co-occurring Genomic Alterations on Outcomes in Patients with KRAS-Mutant Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res.* **24**(2): 334-340.
16. Newton, C.R., et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* **17**, 2503.
17. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* **17**, 804.
18. Thelwell, N., et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* **28**, 3752.
19. Catalog of Somatic Mutations in Cancer [www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic).
20. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline*. CLSI Document EP17-A. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
21. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). *User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP12-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).
22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2004). *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods: Approved Guideline*, 2nd ed. CLSI Document EP5-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly NCCLS).

# 기호

포장물 및 라벨에 다음과 같은 기호가 있을 수 있습니다.

기호	기호 정의
	체외 진단용 의료 기기
	카탈로그 번호
	제조업체
	물품 번호
Rn	R 은 사용 지침(안내서)의 개정 버전을 나타내며 n 은 개정 버전 번호입니다
	로트 번호
	국제 거래 단위 번호
	사용 기한
 <24>	24 개 반응에 충분한 시약이 들어 있습니다



## 기호

## 기호 정의

---

**COMP**

구성품(즉, 내용물 목록)

**CONT**

내용물

**NUM**

수량(즉, 바이알, 병)



온도 제한



사용 지침 참조



직사광선을 피할 것

# 부록: Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 의 설치

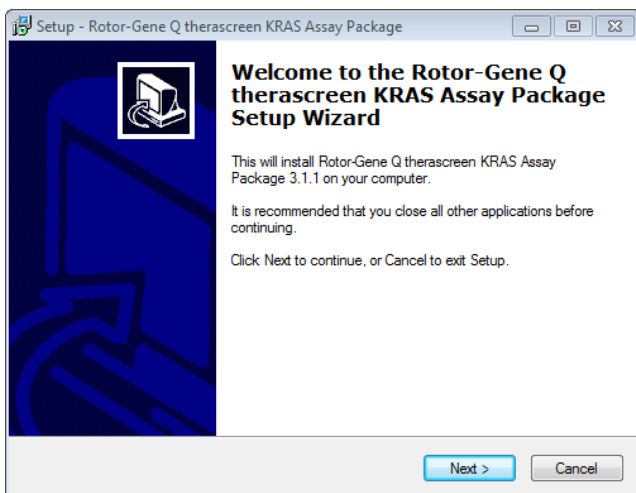
*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 는 72-Well Rotor 를 사용하는 Rotor Gene Q MDx (US) 기기와 함께 사용하도록 만들어졌습니다. Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 는 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 에서 별도로 다운로드할 수 있습니다.

**참고:** Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 는 Rotor-Gene Q 소프트웨어 버전 2.3.1 에서만 작동합니다. *therascreen* KRAS Assay Package 를 설치하기 전에 Rotor-Gene Q 소프트웨어의 최신 버전이 설치되어 있는지 확인하십시오.

이 패키지에는 "*therascreen* KRAS QC Locked Template"(therascreen KRAS QC 잠금 템플릿) 및 "*therascreen* KRAS Locked Template"(therascreen KRAS 잠금 템플릿)이 포함되어 있습니다. 이 분석 패키지에는 또한 실험을 기록하는 데 사용할 수 있는 인쇄 가능한 플레이트 맵과 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 를 사용한 FFPE 검체 준비, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용한 DNA 검체 평가 및 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 를 사용한 KRAS 돌연변이 검출을 위한 PCR 프로토콜을 정의한 실행 템플릿도 포함되어 있습니다.

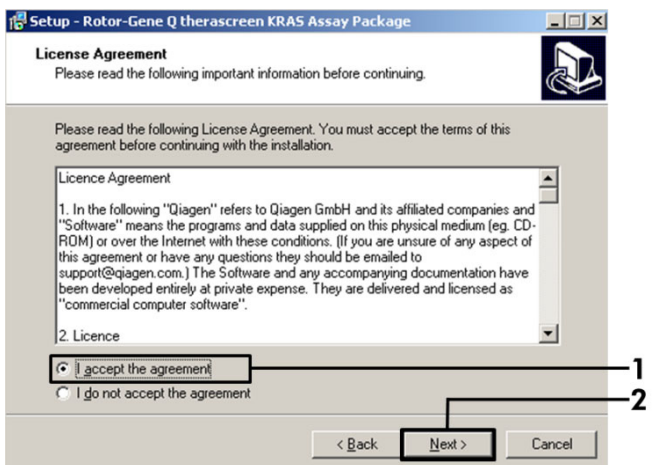
다음 절차에 따라 *therascreen* KRAS Assay Package 를 설치합니다.

1. [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 에서 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS RGQ Assay Package 버전 3.1.1 을 다운로드합니다.
2. 바이러스가 없는 이동식 저장소를 사용하여 Rotor-Gene Q MDx 기기에 연결된 노트북으로 Assay Package 를 전송합니다.
3. **therascreen\_KRAS\_Assay\_Package\_3.1.1.exe** 를 두 번 클릭하여 설치를 시작합니다. 설정 마법사가 나타납니다.



4. Next(다음)를 클릭하여 계속합니다.

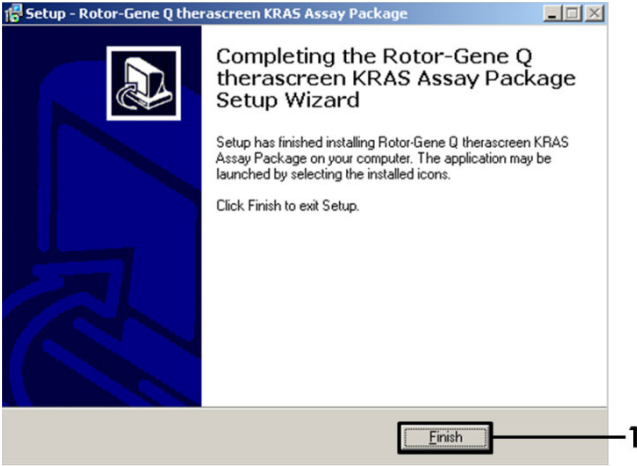
License Agreement(라이선스 계약) 대화상자가 열립니다.



5. License Agreement(라이선스 계약) 상자의 라이선스 계약을 읽고 I accept the agreement(계약에 동의함)(1) 문장에 체크 표시합니다.

6. **Next**(다음)(2)를 클릭하여 계속합니다.

템플릿 설정이 자동으로 시작되고 최종 **Setup**(설정) 대화상자가 표시됩니다.



7. **Finish**(종료)(1)를 클릭하여 설정 마법사를 종료합니다.

8. 컴퓨터를 재시작합니다.

**thetascreen KRAS QC Locked Template**(thetascreen KRAS QC 잠금 템플릿) 및 **thetascreen KRAS Locked Template**(thetascreen KRAS 잠금 템플릿)의 바로 가기가 자동으로 생성되어 바탕 화면에 표시됩니다.

## 주문 정보

제품	내용물	카탈로그 번호
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)	24 회 반응분: 1 대조 분석, 7 돌연변이 분석, 양성 대조 물질, 물, Taq DNA 중합효소	870021
Rotor-Gene Q <i>therascreen</i> KRAS Assay Package 3.1.1 CD	<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit 및 QIAGEN Rotor-Gene Q MDx (US) 기기와 함께 사용할 수 있는 소프트웨어 프로토콜 패키지(Rotor-Gene Q 소프트웨어 버전 2.3 과 호환됨)	9023818
<b>Rotor-Gene Q MDx 및 부속장치</b>		
Rotor-Gene Q MDx Platform (US)	실시간 PCR 사이클러, 노트북 컴퓨터, 소프트웨어, 부속장치, 1 년 보증(부품 및 인건비)	9002035
Rotor-Gene Q MDx System (US)	실시간 PCR 사이클러, 노트북 컴퓨터, 소프트웨어, 부속장치, 1 년 보증(부품 및 인건비), 설치 및 교육	9002036
Loading Block 72 x 0.1 ml Tubes	72 x 0.1ml 튜브의 단일 채널 피펫을 사용한 수동 반응 설정을 위한 알루미늄 블록	9018901
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (250)	1,000 회 반응을 위한 250 개 스트립(4 개 튜브) 및 캡	981103

제품	내용물	카탈로그 번호
Strip Tubes and Caps, 0.1 ml (2500)	10,000 회 반응을 위한 10 x 250 개 스트립(4 개 튜브) 및 캡	981106
<b>관련 제품</b>		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue KRAS Kit (50)	DNA 준비 50 회분: QIAamp MinElute® Columns, 단백질효소 K, 완충액, 채집 Tubes (2 ml)	60404

최신 라이선스 정보 및 제품별 면책 사항은 각 QIAGEN 키트 안내서 또는 사용 설명서를 참고하십시오. QIAGEN 키트 안내서와 사용 설명서는 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 에서 확인할 수 있으며, 또는 QIAGEN 기술 서비스 또는 현지 유통업체에 요청할 수 있습니다.

# 문서 개정 이력

## 날짜

## 변경 사항

R12

개정판 12 는 사용되지 않았음

R13, 2023 년 1 월

*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit(CDx)와 임상시험 등록 분석(CTA) 간 일치율에 대한 추가 표를 포함하도록 임상 결과 섹션 업데이트  
제시된 상품명과 일치하도록 IFU 를 통해 MRTX849 를 Krazati 로 변경  
P110027/S014 의 일부로 승인된 IFU 에서 실수로 삭제된 NSCLC 및 CRC SAMPLE\_INT\_CTRL\_FAIL 전용 플래그를 희석 단계에 다시 추가

R14 2023 년 8 월

비소세포페암 적응증에 대한 플래그 관련 조치와 관련하여 참고 사항에 플래그 해석 표에 대한 참조를 추가

희석 단계 조치를 제거하기 위해 결정직장암 플래그 SAMPLE\_INT\_CTRL\_FAIL 에 대한 조치를 업데이트함

해석의 모호성을 해소하기 위해 비소세포페암 플래그 SAMPLE\_INT\_CTRL\_FAIL 에 대한 동작을 업데이트함

12ARG 및 12ASP 검체 데이터 할당에 대한 라벨링 오류를 수정하기 위해 표 18 업데이트

1 페이지와 문서 개정 내역 섹션에서 캡처된 안내서 개정 번호가 본 안내서 개정판 13 에서 잘못 표기되었습니다. 이는 이후 문서 개정 내역 섹션의 이번 개정(R14)에서 업데이트되었습니다.

**therascreen®KRAS RGQ PCR Kit 에 관한 제한적 라이선스 계약**

본 제품의 구매자 또는 사용자는 본 제품을 사용하면 다음 약관에 동의하는 것으로 간주됩니다.

1. 본 제품은 오직 이 사용 지침(안내서)에 따라 키트에 포함된 구성품과 함께만 사용해야 합니다. QIAGEN 은 이 사용 지침(안내서) 및 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 에서 볼 수 있는 추가 프로토콜에 설명된 경우를 제외하고, 이 키트에 포함된 구성 요소를 이 키트에 포함되지 않은 구성 요소와 함께 사용하거나 통합할 수 있는 해당 지적재산권하의 어떤 라이선스도 허여하지 않습니다.
2. 명시적으로 설명한 라이선스 이외에 QIAGEN 은 본 키트 및/또는 본 키트의 사용이 제 3 자의 권한을 침해하지 않음을 보증하지 않습니다.
3. 본 키트 및 해당 구성품은 일회용으로 라이선스가 부여되며 재사용, 리퍼비시 또는 재판매할 수 없습니다.
4. QIAGEN 은 명시적으로 명시된 라이선스 이외에 명시적이든 암묵적이든 다른 모든 라이선스를 분명하게 부인합니다.
5. 키트 구매자 및 사용자는 위에서 금한 행위를 유도하거나 조장할 수 있는 어떠한 단계도 취하거나 이를 허용하지 않는 데 동의합니다. QIAGEN 은 모든 법정에서 이 제한적 라이선스 계약의 금지를 주장할 수 있으며, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 및/또는 그것의 구성 요소와 관련된 이 제한적 라이선스 계약 및/또는 그 구성요소의 지적재산권을 주장하기 위한 조치로 변호사 비용을 포함하여 모든 조사 및 법정 비용을 회수할 것입니다.

라이선스 조항의 업데이트는 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com) 을 참조하십시오.

상표: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*®(QIAGEN 그룹); Erbitux®(ImClone LLC., Eli Lilly and Company 의 전액 출자 회사); Vectibix®(Immunex Corp.), FAM™, HEX™(Life Technologies, Inc.) LUMAKRAS™, KRAZATI®.

이 제품을 구매함으로써 특정 ROCHE 특허에 따라 구매자에게 사람을 대상으로 한 시험관 내 진단 서비스 제공 용도로만 사용할 수 있는 권리가 부여됩니다.

이 계약에 따라 구매에 따른 특정 사용권 이외에 어떠한 일반적 특허 또는 다른 라이선스는 허여되지 않습니다.

1132967KO 08-2023 HB-1257-014 © 2023 QIAGEN, 모든 권한 보유.



주문 [www.qiagen.com/shop](http://www.qiagen.com/shop) | 기술 지원팀 [support.qiagen.com](mailto:support.qiagen.com) | 웹사이트 [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)