



개정 01, 2026년 6월

ipsogen[®] IDH1 RGQ PCR Kit

사용 설명서

IVD

체외 진단용

R

처방 전용

Rotor-Gene Q[®] MDx 기기용

QIAamp[®] DSP DNA Blood Mini Kit용

본 사용 설명서는 다음에 적용됩니다.



REF

버전

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit

샘플 24개

675233

버전 1



QIAGEN GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, GERMANY

목차

1. 용도	4
2. 대상 사용자	5
3. 설명 및 원리	6
3.1. 요약 및 설명	6
3.2. 절차의 원리	7
3.3. 플랫폼 및 소프트웨어	10
4. 제공 품목	12
4.1. 키트 내용물	12
4.2. 키트 구성품	12
5. 필요하지만 제공되지 않는 품목	15
5.1. 추가 시약	15
5.2. 소모품	15
5.3. 장비	15
6. 경고 및 사전 주의 사항	17
6.1. 경고	17
6.2. 안전성 정보	17
6.3. 예방 조치	18
7. 폐기	20
8. 보관 및 취급	21
8.1. 시약 보관 및 취급	21
8.2. 시료 보관 및 취급	22
9. 프로토콜: 검체 준비	24
10. 프로토콜: IDH1 돌연변이 검출	27
10.1. 시작하기 전에 해야 할 일	28
11. 결과 해석	47
12. 제한 사항	53
13. 성능 특징	55
13.1. 분석 성능	55
13.2. 임상적 성능	64

13.3. 새로 진단된 AML에서 아자시티딘과 병용한 TIBSOVO 치료 시 ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit의 임상적 유용성/효능	67
13.4. 임상적 일치도	69
13.5. 임상적 효능	69
14. 참고 문헌	73
15. 문제 해결 가이드	74
16. 기호	75
17. 연락처 정보	77
18. 주문 정보	78
19. 문서 개정 이력	80

1. 용도

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 급성 골수성 백혈병(AML) 환자의 K2-EDTA 튜브에서 채취한 신선 또는 냉동 인간 골수 흡인 시료에서 추출한 유전체 DNA를 사용하여 5가지 IDH1 돌연변이(R132C, R132H, R132G, R132S 및 R132L)를 코딩하는 단일 염기 변이(SNV)를 검출하기 위한 정성적 Real-time PCR 분석법입니다.

이 검사는 IDH1 돌연변이 검출 결과를 바탕으로 TIBSOVO®(이보시데닙) 치료에 적합할 수 있는 AML 환자를 식별하도록 임상의를 돕는 동반 진단 기기로 사용하도록 고안되었습니다.

K2-EDTA 튜브에 채취한 신선 또는 냉동 인간 골수 흡인 시료는 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit를 사용하여 수동으로 처리합니다.

QIAGEN® Rotor-Gene Q MDx 기기는 자동 증폭 및 검출에 사용됩니다.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 체외 진단용으로 사용하도록 고안되었습니다.

2. 대상 사용자

QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit(카탈로그 번호 61104)를 사용하여 마이크로 원심분리 절차에 따라 유전체 DNA를 수동으로 분리 및 정제하는 데 사용합니다.

본 제품은 전문적인 검사실 환경에서 교육을 받은 직원만 사용해야 합니다.

3. 설명 및 원리

3.1. 요약 및 설명

이소시트르산 탈수소효소 1은 인간의 2번 염색체에 위치한 IDH1 유전자에 의해 암호화되는 효소입니다. 야생형(wild type) 이소시트레이트 탈수소효소는 이소시트레이트의 산화적 탈탄산화 반응을 촉매하여 2-옥소글루타레이트를 생성합니다. IDH1의 R132에서 IDH1 핫스팟 돌연변이는 D-2-하이드록시글루타레이트(2HG) 생성을 초래하는 기능 이득 돌연변이로 이어집니다(1). 2HG는 유전자 전사 조절 불량 및 세포 분화 차단으로 이어지는 DNA 및 히스톤 과메틸화에 관여하는 종양대사산물입니다(2, 3). IDH1 돌연변이는 AML(약 15~25%)을 포함한 혈액 악성 종양에서 나타납니다(4).

ipsogen® IDH1 RGQ PCR Kit는 IDH1 유전자의 코돈 132 내 5가지 특정 돌연변이를 검출하고 식별하기 위한 분석법입니다(표 1).

표 1. 돌연변이 및 COSMIC 개체 목록

돌연변이	염기 변화	COSMIC ID*
R132H	395G>A	COSV61615239
R132C	394C>T	COSV61615256
R132S	394C>A	COSV61615649
R132G	394C>G	COSV61615456
R132L	395G>T	COSV61615420

* COSMIC ID는 *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer* (7)에서 인용되었습니다
(<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>).

3.2. 절차의 원리

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 골수 흡인물(BMA) 시료에서 추출한 유전체 DNA(gDNA) 내 5 가지 IDH1 돌연변이를 선택적 증폭을 통해 검출하는 원리를 기반으로 합니다. 특정적인 정방향 및 역방향 프라이머 그리고 프로브 세트의 사용에 기반하여 대립 유전자 특이적 기술을 사용하여 표적 IDH1 돌연변이를 정확하고 높은 재현성으로 검출할 수 있습니다. 돌연변이 특이적 프라이머가 표적 DNA에 선별적으로 결합하여 PCR 반응에서 연장과 증폭을 촉진합니다.

결과 보고는 완전히 자동화되어 있습니다. 실행 대조와 샘플 결과가 모두 유효하고 분석 대상 증폭이 미리 정해진 컷오프 임계값 이하인 경우, 보고서에 각 샘플에서 검출된 IDH1 돌연변이가 표시됩니다.

3.2.1. DNA 정제

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 마이크로 원심분리기를 이용한 유전체 DNA의 수동 분리 및 정제 절차에 따라 QIAamp® DSP DNA Blood Mini Kit를 사용하여 BMA 샘플에서 추출한 DNA와 함께 사용하도록 검증되었습니다. 다른 DNA 추출 제품을 사용하지 마십시오. 또한 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit로 DNA를 추출할 때 QIAcube® 또는 진공 시스템을 사용하지 마십시오.

QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit 수동 마이크로 원심분리기 절차는 4단계로 구성되어 있습니다. 샘플을 고온 및 변성 조건에서 일차로 용해합니다. 용해는 QIAGEN® Protease(QP) 및 용해 완충액(AL)이 있는 상태에서 수행됩니다. 그런 다음 각 용해물을 QIAamp Mini 스핀 컬럼에 로딩하면, 원심력에 의해 용해물이 통과하면서 유전체 DNA가 실리카 막에 흡착됩니다. 유전체 DNA가 QIAamp Mini 스핀 컬럼 막에 결합된 상태에서도 세척 완충액을 사용하여 오염물질을 효율적으로 제거할 수 있습니다. 마지막으로, 유전체 DNA는 200µl 용출 완충액(AE)를 사용하여 QIAamp Mini 스핀 컬럼 막으로부터 용출됩니다. 용출된 DNA는 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit와 함께 사용할 준비가 되었습니다.

3.2.2. Real-time PCR

Real-time PCR을 사용하면 엔드포인트 PCR과 달리 PCR 증폭 과정의 종료 시점이 아닌 지수기 (exponential phase) 동안 반응 생성물을 검출할 수 있습니다. 이는 검사 특이성을 높이고 검사 프로세스 수행에 필요한 시간을 단축합니다.

이 분석법은 TaqMan® 프로브를 이용한 Real-time PCR 올리고뉴클레오타이드 가수분해 반응 원리를 활용합니다. 각 표적 염기 서열을 검출하기 위해 세 가지 유형의 올리고뉴클레오타이드가 사용됩니다. 즉, 표적 서열의 상류 및 하류 서열에 상보적이며 PCR 앰플리콘을 형성하는 한 쌍의 일반 PCR 프라이머와, 정확한 표적 서열에 상보적이며 형광 보고자 염료와 형광 소광제를 모두 근접하게 포함하는 프로브 분자가 사용됩니다.

PCR 중에 관심 있는 표적 서열이 존재하면 올리고뉴클레오타이드 프로브가 해당 서열에 어닐링되고, PCR 프라이머는 프로브 결합 영역의 상류 및 하류에 있는 상보적 서열에 어닐링됩니다. 반응의 프라이머 연장 단계에서 *Thermus aquaticus*(Taq) DNA 중합효소의 5'에서 3' 방향 엑소뉴클레아제 활성이 프로브 올리고뉴클레오타이드를 절단하여 형광 보고자와 소광제 분자를 모두 분리합니다. 이 분자들이 각자로부터 용액 내로 확산되면서, 보고자에 대한 소광제의 영향이 감소하여 검출 가능한 형광도가 증가합니다. 이 과정은 모든 PCR 주기에서 발생하며 산물의 기하급수적인 축적을 방해하지 않습니다(그림 1).

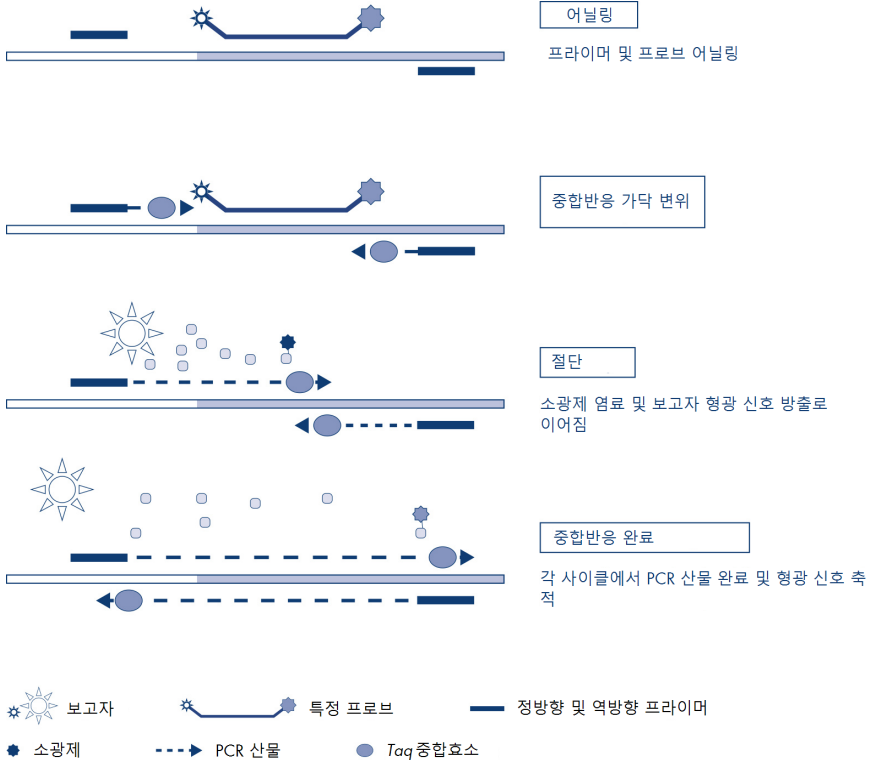


그림 1. TaqMan 실시간 반응 원리.

프라이머와 프로브 모두에 상보적인 표적 염기서열이 반응 내에 존재하는 경우에만 형광도 신호의 증가가 검출됩니다. 표적 서열이 없으면 프로브 절단이 일어나지 않고 형광 보고자와 소광제의 해리가 발생하지 않으므로 형광의 증가가 관찰되지 않습니다.

미리 결정된 임계값 이상의 형광 신호를 검출하는 데 필요한 PCR 사이클 수를 사이클 임계값 (Ct)이라고 하며, 이는 반응 시작 시 존재하는 표적의 양에 정비례하므로 검사에 대한 민감도 한계를 설정할 수 있습니다.

각 IDH1 돌연변이 분석에는 돌연변이를 포함하는 DNA 서열에 선택적으로 결합되는 대립유전자 특이적 프라이머가 포함되어 있습니다. 대립유전자 특이적 프라이머(allele-specific primer)의 3' 말단에 불일치(예: 야생형(wild type) 서열 또는 다른 돌연변이가 있는 경우)가 있으면 프라이머 연장 효율이 감소하여 지정된 돌연변이에 대한 특이성이 증가합니다.

PCR 차단제를 사용하면 IDH1 R132 돌연변이에 대한 특이성이 더욱 높아집니다. 야생형(wild type) DNA 서열과 상보적인 올리고뉴클레오타이드가 PCR 반응 혼합물에 포함되어 있습니다. 야생형(wild type) DNA가 존재하는 경우, 올리고뉴클레오타이드 차단제(blocker)가 DNA에 선택적으로 하이브리드화되어 돌연변이 대립유전자 특이 프라이머에 의한 야생형 서열의 인식을 억제합니다.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit에는 QIAGEN Taq DNA Polymerase의 변형된 형태인 HotStarTaq® DNA Polymerase가 포함되어 있습니다. 이는 비활성 상태로 제공되며 상온에서 효소 활성이 없습니다. 따라서 반응 설정 단계 및 첫 번째 변성 단계 중에 잘못 프라이밍된 산물 및 프라이머-이합체 생성이 방지됩니다. 그러므로 PCR 인공물에 의한 반응물질의 경쟁이 생기지 않아 높은 PCR 특이성이 가능해집니다. 효소는 반응 시작 시 95°C에서 15분간의 배양 단계를 통해 활성화됩니다. 핫스타트(hot start)로 실온에서 반응이 신속하고 편리하게 설정될 수 있습니다.

3.3. 플랫폼 및 소프트웨어

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 특히 다음과 함께 사용하도록 설계되었습니다.

- Rotor-Gene® Q MDx Platform* (카탈로그 번호 9002035), 다음이 설치된 개인용 컴퓨터로 작동:
 - Rotor-Gene AssayManager® v2.1(버전 2.1.1 이상) 소프트웨어 (카탈로그 번호 9024203-US)

*사용하기 전에 제조업체의 권장 사항에 따라 기기를 점검 및 캘리브레이션하십시오.

- Gamma MDx Plug-in 버전 1.0(이상)(카탈로그 번호 9025512)
- *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile ("AP_ipsogen_IDH1_BMA_MDx_V1_0_x.iap" 여기서 $x \geq 0$)

참고: *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile은 Rotor-Gene AssayManager v2.1 이상 버전 과만 호환됩니다.

Rotor-Gene Q MDx 기기, Rotor-Gene AssayManager v2.1 Core Application 소프트웨어 또는 Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma MDx Plug-in 소프트웨어에 관한 정보는 해당 개별 사용자 설명서를 참조하십시오.

Rotor-Gene Q MDx 기기는 사용자 설명서에 나와 있는 요건에 따라 유지관리해야 합니다.

중요: 사용하기 전에 제조업체의 권장 사항에 따라 기기를 점검하고 보정했는지 확인하십시오.

4. 제공 품목

4.1. 키트 내용물

<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit 카탈로그 번호 검사 수		675233 24	
시약	캡 색상	튜브 ID	용량
IDH1 Reaction Mix 1 (IDH1 반응 혼합물 1)	녹색	IDH1 Mix 1 (IDH1 혼합물 1)	950 μ L
IDH1 Reaction Mix 2 (IDH1 반응 혼합물 2)	보라색	IDH1 Mix 2 (IDH1 혼합물 2)	950 μ L
IDH1 Positive Control (IDH1 양성 대조물질)	빨간색	PC	120 μ L
Taq DNA Polymerase	박하색	Taq	85 μ L
Water for NTC(NTC용 물)	흰색	NTC	1.9mL
샘플 희석용 물	흰색	Dil.	1.9mL

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit와 함께 제공되는 액세서리는 없습니다.

4.2. 키트 구성품

시약	중요/활성/반응성 성분	농도 범위
	표적 특이적 올리고뉴클레오타이드: 프라이머	0.1~1 μ M
IDH1 Reaction Mix 1 그리고 IDH1 Reaction Mix 2 (IDH1 반응 혼합물 2)	표적 특이적 올리고뉴클레오타이드: 형광단 표지 검출 프로브	0.1~1 μ M
	IDH1 올리고뉴클레오타이드 PCR 차단제	0.1~2 μ M
	데옥시뉴클레오타이드 삼인산(dNTP)	<1 mM

시약	중요/활성/반응성 성분	농도 범위
IDH1 Positive Control (IDH1 양성 대조물질)	표적 특정 서열을 포함하는 DNA 플라스미드	<100,000 copies/ μ L
Taq DNA Polymerase	Taq DNA Polymerase	1~10개 단위

참고: 이 기기에는 측정에 영향을 줄 수 있는 추가 구성 요소가 포함되어 있습니다.

4.2.1. 반응 혼합물

IDH1 Reaction Mix 1 (IDH1 반응 혼합물 1) 및 IDH1 Reaction Mix 2 (IDH1 반응 혼합물 2)에는 표 1에 보고된 IDH1 돌연변이를 검출하는 PCR 반응을 수행하기 위한 시약이 포함되어 있습니다.

각 반응 혼합물은 아래에 설명된 대로 대 반응도 증폭시킵니다.

4.2.2. 대조 반응

대조 반응은 정방향 및 역방향 프라이머와 표지된 프로브를 사용하여 보존된 비IDH1 염기서열의 증폭을 검출합니다. 대조 반응은 적절한 수준의 증폭 가능한 DNA가 샘플에 존재하는지를 결정하는 데 사용되며, 돌연변이 상태를 결정하는 분석적 계산의 한 요소입니다.

대조 타겟은 샘플을 IDH1 돌연변이 검출 또는 돌연변이 미검출로 정의하고 DNA 로딩 대조군으로 활용하는 데 사용됩니다. 반응 튜브에 충분한 양의 DNA가 첨가된 경우, 모든 샘플은 사전 정의된 Ct 범위 내의 대조 반응에서 신호를 나타냅니다.

4.2.3. IDH1 Positive Control(IDH1 양성 대조물질)

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit에는 IDH1 양성 대조물질도 포함되어 있습니다. 양성 대조물질은 키트에 의해 검출되는 각 돌연변이를 나타내는 DNA 플라스미드의 혼합물입니다. 양성 대조물질의 검출은 키트의 각 반응 혼합물의 적절한 기능 여부를 확인해 줍니다.

4.2.4. Negative Control(음성 대조물질)

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit에는 "무주형 대조물질" 반응에 사용되는 무주형 대조물질용 핵산분해효소 무함유 물(튜브 NTC)이 포함되어 있습니다. 템플릿 없는 대조물질은 음성 대조물질로 사용되며, 분석 설정 중의 잠재적인 오염을 평가합니다.

4.2.5. Taq DNA Polymerase

Taq DNA 중합효소는 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit에서 사용하는 중합효소 연쇄 반응용 효소입니다.

4.2.6. 샘플 희석용 물

필요한 경우, *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit에 사용하기에 농도가 너무 높은 gDNA를 희석하기 위해 핵산분해효소 무함유 물이 들어 있는 추가 튜브를 사용합니다.

5. 필요하지만 제공되지 않는 품목

5.1. 추가 시약

- QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit(카탈로그 번호 61104, "DNA 정제" 섹션 참조)
- DNAZap™ PCR 분해 용액 또는 동등한 세척 용액
- Distel High Level Laboratory Disinfectant(Distel 고농도 실험실 소독제) 및 이소프로필 알코올(Isopropyl Alcohol, IPA) 세척액 또는 이와 동등한 세척액

5.2. 소모품

- Strip Tubes and Caps (0.1ml)(스트립 튜브 및 캡(0.1ml)), 72-Well Rotor용(카탈로그 번호 981103 또는 981106)
- 마스터 혼합액 준비용 탈핵산분해효소, 낮은 DNA 결합 마이크로 원심분리기 튜브
- 에어로졸 막이 있는 탈핵산분해효소 피펫 팁

5.3. 장비

- "플랫폼 및 소프트웨어" 페이지의 10페이지에 설명된 플랫폼 및 소프트웨어
- 유성펜
- 검체 준비용 전용 피펫*(조절 가능)
- PCR 마스터 혼합물 준비 전용 피펫*(조절식)
- 템플릿 DNA 분주 전용 피펫*(조절식)
- 1.5mL 튜브용 로터 포함 실험대용 원심분리기*

*사용하기 전에 제조업체의 권장 사항에 따라 기기를 점검하고 보정했는지 확인하십시오.

- 37°C 및 56°C에서 배양이 가능한 Thermomixer*, 가열 궤도형 인큐베이터*, 가열 블록* 또는 수조*
- 로딩 블록 72 × 0.1mL 튜브, 수동 반응 준비용 알루미늄 블록 (카탈로그 번호 9018901)
- 72-Well Rotor, 0.1mL 스트립 튜브 및 캡 고정용, 반응 부피: 10~50µL; Locking Ring 72-Well Rotor가 필요함
- Locking Ring 72-Well Rotor, 72-Well Rotor에서 스트립 튜브 및 캡 0.1mL를 고정하기 위한 용도(카탈로그 번호 9018904)
- 분광광도 정량화 장비*
- 실험대 교반기

*사용하기 전에 제조업체의 권장 사항에 따라 기기를 점검하고 보정했는지 확인하십시오.

6. 경고 및 사전 주의 사항

해당 기기와 관련하여 중대한 사건이 발생한 경우, 제조업체 및/또는 그 공인 대리인, 사용자 및/또는 환자가 거주하는 지역의 규제 기관에 보고하려면 해당 지역의 규정을 참고해야 할 수 있습니다.

6.1. 경고

체외 진단용입니다.

Rotor-Gene Q MDx Platform 기기와 함께 사용.

마이크로 원심분리기 절차에 의한 유전체 DNA의 수동 분리 및 정제를 통해 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit와 함께 사용.

6.2. 안전성 정보

화학물질로 작업할 때는 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참고하시기 바랍니다. 이 문서는 www.qiagen.com/safety에서 편리하고 간결한 PDF 형식으로 온라인으로 제공되며, 여기에서 각 QIAGEN 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS를 검색, 확인 및 인쇄할 수 있습니다.

- 시료 및 샘플은 감염 가능성이 있습니다. 샘플 및 분석 폐기물 처리 현지 안전 절차를 따르십시오.
- Rotor-Gene Q MDx 기기에 관한 안전성 정보는 기기와 함께 제공된 사용자 설명서를 참고하십시오.
- QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit(카탈로그 번호 61104)에 대한 안전성 정보는 *QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit 안내서*를 참조하십시오.

6.2.1. 비상 정보

CHEMTREC

미국 및 캐나다 외부: +1 703-527-3887

6.3. 예방 조치

사용자는 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit를 사용할 때 항상 다음 주의 사항을 준수해야 합니다.

Taq DNA Polymerase



함유 성분: 에톡실화 노닐페놀 장기적인 영향에 의해 수생 생물에 유독함 환경에 방출되지 않게 하십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 유출물을 수거하십시오. 현지, 지역, 국가 및 국제 규정에 따라 승인된 시설에 내용물/용기를 폐기하십시오.

- 본 검사는 K2-EDTA 튜브에 채취한 골수 흡인 시료용입니다.
- 모든 화학 물질과 생물학적 물질은 잠재적으로 위험합니다. 시료 및 샘플은 감염 가능성이 있으며 생물학적 유해물질로 취급해야 합니다.
- 샘플 및 분석 폐기물을 현지 안전 절차에 따라 폐기하십시오.
- *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit용 시약은 최적으로 희석되어 있습니다. 시약을 추가로 희석하면 성능 저하를 야기할 수 있으므로 추가로 희석하지 마십시오. 25 μ L 미만 부피의 반응액 (반응 혼합물 + 샘플)을 사용하지 마십시오.
- *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 모든 시약은 *ipsogen*IDH1 RGQ PCR Kit에서 제공되는 검사에 사용하도록 특별히 제조되었습니다.
- *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit에서 제공되는 모든 시약은 동일한 *ipsogen*IDH1 RGQ PCR Kit에서 제공되는 다른 시약과 함께만 사용하도록 되어 있습니다. 성능에 영향을 줄 수 있으므로 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 내에서 또는 여러 *ipsogen*IDH1 RGQ PCR Kit 간에 시약을 대체하여 사용하지 마십시오.

- *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit에서 제공되는 Taq DNA 중합효소(튜브 Taq)만 사용하십시오. 동일하거나 다른 유형의 다른 키트에 들어 있는 Taq DNA 중합효소 또는 다른 공급업체의 Taq DNA 중합효소로 대체하지 마십시오.
- 추가적인 경고, 주의 사항 및 절차는 *Rotor-Gene Q MDx Platform 사용자 설명서*를 참조하십시오.
- 설치 절차 및 설치 장소 요구 사항에 따라 Rotor-Gene Q MDx 기기를 설치하십시오.
- 유효 기간이 만료되거나 부적절하게 보관된 구성품은 사용하지 마십시오.
- 대조물질 및 반응액 혼합 시약이 양성 대조물질 시약에 들어 있는 합성 물질로 오염되지 않도록 각별히 주의하십시오.
- 샘플 간에 교차 오염이 생기지 않도록 각별히 주의하십시오. 각 샘플을 추가한 후 신속하게 튜브 캡을 닫으십시오.
- 분석 준비를 위해 사용하기 전에 로딩 블록을 철저히 소독하십시오. 마스터 혼합물 DNAZap PCR 분해 용액 사용 후 Distel High Level Laboratory Disinfectant(Distel 고농도 실험실 소독제) 및 IPA 세척액 사용이 권장됩니다. 사용 전에 로딩 블록이 반드시 건조되어 있어야 합니다.
- 반응 혼합물을 설정하고 양성 대조물질 시약을 첨가할 때 개별 전용 피펫을 사용하십시오.
- 양성 대조물질 첨가에 사용한 구역이 아닌 다른 구역에서 반응 혼합물을 준비하고 분주하십시오.
- 반응 혼합물 시약 내 포함된 형광 표지 분자는 빛에 민감합니다. 광 표백을 방지하기 위해 대조물질 및 반응 혼합물 시약을 빛으로부터 보호하십시오.
- 실행이 끝날 때까지 Rotor-Gene Q MDx 기기를 열지 마십시오.
- 실행이 끝날 때까지 Rotor-Gene Q 튜브를 열지 마십시오. 실행 도중 오류가 발생한 경우에는 Rotor-Gene Q MDx 기기 내 샘플을 폐기해야 하며 다시 검사해서는 안 됩니다.

- 잘못된 샘플 도입, 로딩 오류 및 피펫팅 오류가 생기지 않도록 올바른 샘플 검사를 실행하도록 주의를 기울여야 합니다.
- 대조군 및 샘플에 대한 플래그 발생을 최소화하려면 다음을 포함하되 이에 국한되지 않는 *ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit 사용 설명서*를 엄격히 준수해야 합니다.
 - 시약을 올바르게 혼합해야 하며, 분석 준비 중 각 혼합 단계에서 이를 반드시 확인해야 합니다.

7. 폐기

샘플 및 분석 폐기물을 현지 안전 절차에 따라 폐기하십시오.

8. 보관 및 취급

8.1. 시약 보관 및 취급

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 드라이아이스 상태로 배송되며, 도착 시 반드시 냉동 상태여야 합니다. 도착 시 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit가 냉동 상태가 아니거나, 운송 중 외부 포장에 개봉되었거나, 배송물에 패킹 노트 또는 시약이 포함되어 있지 않은 경우 QIAGEN 기술 지원 부 또는 현지 대리점에 문의하십시오(www.qiagen.com 방문).

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 수령 즉시 $-30^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 의 정온 냉동고에 보관해야 합니다. 광퇴색 및 성능 저하를 방지하기 위해 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit를 차광 보관해야 합니다. 지정된 조건에서 보관할 경우, *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit는 외부 포장에 인쇄된 유효 기간까지 안정적입니다.

이러한 조건에서, *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit를 처음 사용하기 전까지, 라벨에 별도로 명시되지 않는 한 구성품은 성능 및 품질 저하 없이 11개월 동안 안정적입니다.

해동과 동결을 반복해서는 안 됩니다. 최대 90일 이내에 동결-해동 주기를 최대 3회 초과하지 마십시오. 시약은 사용하기 전 최소 30분 동안 실온($15\sim 25^{\circ}\text{C}$)에서 해동해야 합니다. 시약은 꺼낸 후 4시간 이내에 냉동고에 다시 넣어야 합니다.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit의 시약은 최적으로 희석되어 있으며, *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 사용 설명서(본 문서)의 지침에 따라 분석에 사용하기 전 추가적인 정제나 처리가 필요하지 않습니다.

참고: 모든 구성품의 상자와 라벨에 인쇄된 유효 기간 및 보관 조건에 유의해야 합니다. 유효 기간이 만료되거나 부적절하게 보관된 구성품은 사용하지 마십시오.

8.1.1. 사용 중 안정성

명시된 사양을 벗어나는 조건에서 보관되었거나, 포장에 손상이 있었거나, 기타 열화 또는 오작동의 징후가 보이는 경우에는 사용하지 마십시오.

개봉한 시약은 원래의 포장 상태로 $-30^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 에서 90일 동안 또는 포장에 기재된 유효기간 중 더 빠른 날짜까지 보관할 수 있습니다.

8.2. 시료 보관 및 취급

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 K2-EDTA 튜브에 채취한 신선 또는 냉동 인간 골수 흡인물(BMA) 시료와 함께 사용됩니다.

모든 샘플을 잠재적으로 유해한 것으로 취급해야 합니다. 샘플 및 분석 폐기물을 현지 안전 절차에 따라 폐기하십시오.

8.2.1. 시료 채취 및 보관

골수 흡인 샘플은 제조업체의 권장 사항에 따라 K2-EDTA 튜브에 채취해야 합니다. 시료는 ISO 20658:2023에 따라 운송되어야 하며, 시료 품질을 보장하기 위해 이 섹션 아래에 설명된 보관 조건(최대 동결-해동 주기 포함)을 준수해야 합니다. DNA는 검사 전에 추출한 후 보관할 수 있습니다.

시료의 권장 보관 조건은 아래 설명과 같습니다.

- 냉장 시 2~8°C에서 최대 7일간 보관 가능합니다.
- 냉동 시 BMA 시료는 -30°C ~ -15°C에서 최대 9주간 보관 가능합니다. 냉동-해동 주기는 최대 2회를 초과하지 마십시오.

gDNA의 권장 보관 조건은 아래 설명과 같습니다.

- 냉장 시 2~8°C에서 최대 2주간 보관 가능합니다.
- 냉동 시 -30°C ~ -15°C에서 최대 9주간 보관 가능합니다.

8.2.2. 샘플 내 간섭 물질

골수 흡인 샘플 내의 물질은 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 성능에 영향을 미칠 수 있습니다.

잠재적인 간섭 물질의 영향을 평가했습니다. 자세한 내용과 테스트한 물질 목록은 “성능 특징” 섹션을 참조하십시오. 다음 약제에서 간섭이 관찰되었습니다. 시타라빈, 데시타빈, 에토포시드, 이다루비신염산염, 다우노루비신염산염, 아자시티딘 및 트리글리세라이드.

9. 프로토콜: 검체 준비

시작 전 중요 사항

- “경고 및 사전 주의 사항”을 읽으십시오.
- 제공되지는 않으나 필요한 모든 물품이 준비되어 있는지 확인하십시오("필요하지만 제공되지 않는 품목" 페이지의 15페이지 참조).
- 모든 시약과 소모품이 올바르게 보관되어 있으며 유효 기간 내에 있는지 확인하십시오.
- 모든 장비가 제조업체 권장 사항에 따라 점검 및 보정되었는지 확인하십시오.

DNA 정제

DNA 정제는 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit 안내서의 수동 마이크로 원심분리 추출 프로토콜 지침에 따라 수행해야 합니다.

참고: 추출 시 200µL의 BMA를 사용하십시오. 추출 전에 샘플이 잘 섞였는지 확인하십시오 (예: 뒤집어서 혼합).

참고: DNA는 200µL의 용출 완충액(AE)으로 용출해야 합니다.

참고: ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 수동 마이크로 원심분리 추출 프로토콜을 사용하는 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit와 함께 사용하도록 개발되었습니다. 최적의 성능을 보장하기 위해 다른 추출 제품, 프로토콜 및/또는 자동화 시스템의 사용은 허용되지 않습니다.

DNA 정량화 및 정규화

골수 흡인 샘플에서 추출한 gDNA는 해당 실험실의 절차에 따라 정량화(예: 분광광도 정량 기기 사용)해야 합니다.

참고: 정량화 기기를 보정할 때 올바른 용출 완충액을 사용했는지 확인하십시오.

- 측정 농도가 1ng/μL 이상 6ng/μL 이하인 경우, 샘플 정규화가 필요하지 않습니다.
- 측정된 농도가 1ng/μL 미만인 경우 샘플을 재추출해야 합니다.
- 측정 농도가 6ng/μL를 초과하는 경우, 공식에 따라 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit에 제공된 희석용 물을 사용하여 샘플을 5ng/μL로 희석해야 합니다.

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

설명

- C_i : 추출된 gDNA의 초기 농도
- C_f : 목표 최종 농도 = 5ng/μL
- V_f : *ipsogen* IDH1 RGQ PCR 실행에 필요한 최종 용량(즉, 10μL + 피펫팅 오류에 대비한 추가 용량)
- V_i : *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit에 제공된 희석용 물로 피펫팅 및 희석할 추출된 gDNA의 초기 용량

참고: 추출된 gDNA에 추가할 물의 양 = $V_f - V_i$

참고: 필요한 경우 제공된 희석용 물 튜브를 사용하여 샘플을 희석하십시오.

계산 예시

- 예를 들어, gDNA 농도가 20ng/μL로 측정된 경우 gDNA에 추가할 부피는 아래와 같이 결정할 수 있습니다.
 - $C_i = 20\text{ng}/\mu\text{L}$ [또는 측정된 값]
 - $C_f = 5\text{ng}/\mu\text{L}$ [고정값]
 - $V_f = 15\mu\text{L}$ [PCR 반응을 위해 여유분을 포함한 충분한 부피]
 - V_i 는 다음과 같이 계산됩니다.

$$20 \text{ ng}/\mu\text{L} \times V_i = 5 \text{ ng}/\mu\text{L} \times 15 \mu\text{L}$$

$$V_i = \frac{5 \times 15}{20} = 3.75 \mu\text{L}$$

- 추가할 물의 부피는 다음과 같이 계산됩니다.

$$\text{첨가할 물의 양} = V_f - V_i = 15 - 3.75 = 11.2560 \mu\text{L}$$

적절한 튜브에 희석용 물 11.25μL를 분주합니다. 3.75μL의 gDNA 샘플을 추가한 다음 철저히 혼합합니다.

10. 프로토콜: IDH1 돌연변이 검출

시작 전 중요 사항

- “경고 및 사전 주의 사항”의 내용을 읽으십시오.
- 제공되지는 않으나 필요한 모든 물품이 준비되어 있는지 확인하십시오("필요하지만 제공되지 않는 품목" 페이지의 15페이지 참조).
- 모든 시약과 소모품이 올바르게 보관되어 있으며 유효 기간 내에 있는지 확인하십시오.
- 프로토콜을 시작하기 전에 Rotor-Gene Q MDx 기기에 대해 숙지하십시오. 자세한 내용은 기기, Rotor-Gene AssayManager v2.1 및 Gamma MDx Plug-in 사용자 설명서를 참조하십시오.
- 모든 장비가
에 따라 점검 및 보정되었는지 확인하십시오. 제조업체 권장 사항.
- 효소가 비활성화될 수 있으므로 Taq DNA 중합효소(Taq)를 볼텍싱하지 마십시오.
- 팁에 효소가 과도하게 묻지 않도록 피펫 팁을 액체 표면 바로 아래에 위치시켜 Taq DNA 중합효소(Taq)를 피펫팅하십시오.
- 시작하기 전에 Configuration 탭에서 다음 설정을 구성해야 합니다 (그림 2 및 그림 3).



그림 2. “Run has to be released before starting approval”(승인 시작 전 실행을 해제해야 함) 및 “Release of run has to be signed”(실행 해제에 서명해야 함) 확인란이 선택되어 있지 않은지 확인하십시오.

Work list

Format of generated work list names
 WL_20110513_0430

User-definable section
 WL

☒ Date
☒ Time
☐ Operator

☒ Enable processing of unclear samples
☒ Enable checksum for LIMS import

Closed mode	UDT mode
☐ Material number required	☐ Material number required
☒ Valid expiry date required	☐ Valid expiry date required
☒ Lot number required	☐ Lot number required

그림 3. “Material number required”(자재 번호 필요)가 선택되어 있지 않은지 확인하십시오.

10.1. 시작하기 전에 해야 할 일

- 매번 사용하기 전에 Taq DNA 중합효소(Taq) 및 샘플을 제외한 모든 시약을 실온(15~25°C)에서 최소 30분 동안 해동하십시오. 5~12초간 불텍싱하여 혼합한 다음, 짧게 원심분리하여 튜브 바닥으로 내용물을 모으십시오. 해동을 시작한 후 4시간 이내에 IDH1 반응 혼합물, PC 및 NTC를 냉동고(-30°C ~ -15°C)에 다시 넣으십시오.

참고: 시약이 완전히 해동된 후에만 Taq DNA 중합효소(Taq)를 꺼내십시오.

- 검사할 샘플이 완전히 해동되고 잘 혼합되었는지 확인하십시오.
- 필요한 소프트웨어를 모두 다운로드하여 설치하십시오. 소프트웨어 설치에 대한 자세한 내용은 다음 페이지의 Gamma MDx Plug-in 설치 및 분석항목 프로파일 가져오기를 참조하십시오.
 - Rotor-Gene AssayManager v2.1(버전 2.1.1 이상) 소프트웨어
(카탈로그 번호 9024203-US)

- Rotor-Gene AssayManager Gamma MDx Plug-in v1.0 이상
- ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile

10.1.1. Gamma MDx Plug-in 설치 및 분석항목 프로파일 가져오기

Rotor-Gene AssayManager v2.1 핵심 소프트웨어 설치에 대한 자세한 내용은 *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application 사용자 설명서*를 참조하십시오.

Gamma Plug-in 및 분석항목 프로파일의 설치 및 가져오기에 대한 자세한 내용은 *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application 사용자 설명서*에 설명되어 있습니다.

1. QIAGEN 웹사이트(www.qiagen.com)에서 Gamma MDx Plug-in을 다운로드하십시오.
2. RGAM_V2_1_Gamma_MDx_Plug-in.Installation.v1_0_x.msi 파일을 더블 클릭하고(여기서 x는 ≥ 0) 설치 지침에 따라 설치 프로세스를 시작하십시오. 이 프로세스에 대한 자세한 설명은 *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application 사용자 설명서*의 “Installing Plug-ins”(플러그인 설치) 섹션을 참조하십시오.
3. 플러그인을 성공적으로 설치한 후, Rotor-Gene AssayManager v2.1 소프트웨어에 대한 관리자 권한 소유자가 다음과 같이 최신 분석항목 프로파일 버전을 가져와야 합니다.
 - a. 아래 아이콘을 클릭하여 Rotor-Gene AssayManager v2.1 소프트웨어를 실행하십시오.



다음 창이 열립니다.

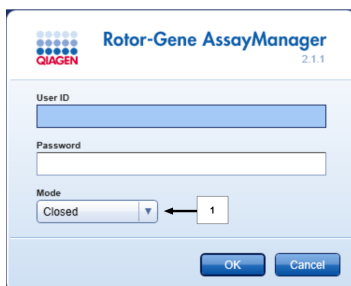
The image shows the login window for Rotor-Gene AssayManager V2.1.1. The window has a light blue background. At the top left is the Qiagen logo, and at the top right is the text "Rotor-Gene AssayManager 2.1.1". Below this, there are three input fields: "User ID" (a blue box), "Password" (a white box), and "Mode" (a dropdown menu). The "Mode" dropdown is currently set to "Closed", and there is a small box with the number "1" and an arrow pointing to it. At the bottom right, there are two buttons: "OK" and "Cancel".

그림 4. Rotor-Gene AssayManager V2.1.

- b. 사용자 ID와 비밀번호를 사용하여 Rotor-Gene AssayManager v2.1 소프트웨어에 로그인하십시오. "Closed" (폐쇄) 모드를 변경하지 마십시오. **OK** (확인)를 클릭하십시오. 다음 창이 열립니다.

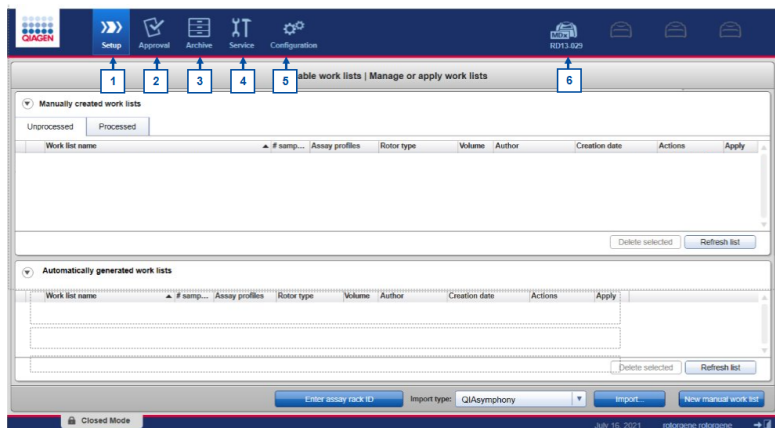


그림 5. Rotor-Gene AssayManager v2.1.1: 1: Setup(설정) 탭. 이 탭을 사용하면 작업을 관리하거나 적용할 수 있습니다. 2: Approval(승인) 탭. 이 탭을 사용하면 이전 실험을 찾을 수 있습니다. 3: Archive(아카이브) 탭. 이 탭을 사용하면 이미 승인된 이전 실험을 찾을 수 있습니다. 4: Service(서비스) 탭. 이 탭에서는 소프트웨어에서 생성된 각 파일의 감사 추적이 보고됩니다. 5: Configuration(설정) 탭. 이 탭을 사용하면 모든 소프트웨어 매개변수를 구성할 수 있습니다. 6: Rotor-Gene Q(RGQ) 아이콘.



- c. 구성 환경을 선택하십시오.
- d. **Assay Profiles**(분석항목 프로필) 탭을 선택하십시오.
- e. **Import**(가져오기)를 클릭하십시오.
- f. 대화 상자에서 가져올 분석항목 프로필을 선택한 다음 **Open**(열기)을 클릭하십시오.
- g. 분석항목 프로필을 성공적으로 가져온 후에는 "Setup"(설정) 환경에서 사용할 수 있습니다.

참고: 동일한 버전의 분석항목 프로필을 두 번 가져올 수는 없습니다.

10.1.2. 절차

1. Taq DNA 중합효소(Taq)를 제외한 모든 시약을 사용 전 최소 30분에서 최대 2시간 동안 실온(15~25°C)에서 해동하십시오.

참고: 시약이 완전히 해동된 후에만 Taq DNA 중합효소(Taq)를 꺼내십시오.

참고: 해동 과정을 시작한 후 4시간 이내에 IDH1 반응 혼합물, PC 및 NTC를 냉동고 (-30°C ~ -15°C)에 다시 넣으십시오.

참고: 마스터 혼합물을 준비한 후 즉시 IDH1 반응 혼합물과 Taq를 냉동고 (-30°C ~ -15°C)에 다시 넣는 것이 좋습니다.

2. 국소적인 농도 차이를 방지하기 위해 Taq를 제외한 모든 시약을 5~12초 동안 볼텍싱하여 혼합하십시오.

염 농도를 균질화한 다음 짧게 원심분리하여 튜브 바닥에 내용물을 모으십시오.

참고: Taq DNA 중합효소(Taq)는 볼텍싱하지 않아야 합니다.

참고: PCR 설정 시작부터 실행 시작까지의 총 시간은 2시간을 초과하지 않아야 합니다.

3. 표 3 및 표 4에 명시된 부피에 따라 DNA 샘플, 양성 대조물질 반응 1개 및 무주형 대조물질 반응 1개에 필요한 충분한 양의 마스터 혼합물(IDH1 반응 혼합물 및 Taq DNA 중합효소[Taq])을 준비하십시오.

참고: PCR 설정 시 충분한 여유량을 확보할 수 있도록 $n + 2$ 개의 추가 샘플용 시약을 포함하십시오.

참고: *ipsogen* IDH1 RGQ PCR 키트 사용 시 최적의 샘플 수를 사용하는 최대 실행 횟수는 실행당 8개의 샘플로 구성된 3번의 실행입니다.

참고: 마스터 혼합물에는 샘플과 대조물질을 제외한 PCR에 필요한 모든 구성 요소가 포함되어 있습니다.

4. 마스터 혼합물을 준비한 후 즉시 IDH1 반응 혼합물과 Taq를 냉동실(-30°C ~ -15°C)에 다시 보관하십시오.

표 2. 72-Well Rotor가 장착된 Rotor-Gene Q MDx 기기의 반응 횟수

샘플	반응
IDH1 마스터 혼합물 1 사용	
24개의 gDNA 샘플	24개 반응
양성 대조물질(PC)	1 반응
무주형 대조물질(NTC)	1 반응
IDH1 마스터 혼합물 2 사용	
24개의 gDNA 샘플	24개 반응
양성 대조물질(PC)	1 반응
무주형 대조물질(NTC)	1 반응

표 3. IDH1 마스터 혼합물 1(MM1)*의 준비

구성 요소	양
IDH1 반응 혼합물 1	$19.6\mu\text{L} \times (n + 2)^*$
Taq DNA 중합효소(Taq)	$0.4\mu\text{L} \times (n + 2)^*$
총 부피	20.0μL/반응

* n = 반응 수(검체 + 대조물질). 마스터 혼합물을 준비할 때, PCR 설정 시 충분한 여유량을 확보할 수 있도록 샘플 2개 분량(n + 2)을 추가로 준비하십시오.

표 4. IDH1 마스터 혼합물 2(MM2)* 준비하기

구성 요소	양
IDH1 반응 혼합물 2	$19.6\mu\text{L} \times (n + 2)^*$
Taq DNA 중합효소(Taq)	$0.4\mu\text{L} \times (n + 2)^*$
총 부피	20.0 μL /반응

* n = 반응 수(샘플 + 대조물질). 마스터 혼합물을 준비할 때, PCR 설정 시 충분한 여유량을 확보할 수 있도록 샘플 2개 분량(n + 2)을 추가로 준비하십시오.

- 5. 볼텍싱을 5~12초간 실시하여 마스터 혼합물을 충분히 혼합한 다음, 짧게 원심분리하여 튜브 바닥으로 내용물을 모으십시오.
- 6. 표 5의 레이아웃에 따라 적절한 수의 0.1mL PCR 스트립 튜브를 로딩 블록에 배치하십시오.

참고: PCR 반응 설정이 완료될 때까지 PCR 튜브를 로딩 블록에 그대로 두십시오. 이렇게 하면 PCR 설정 중 오류가 발생할 가능성이 줄어듭니다.

- 7. 각 0.1mL PCR 스트립 튜브(제공되지 않음)에 즉시 20 μL 의 마스터 혼합물을 첨가하십시오.

참고: MM1과 MM2를 교차 행에 첨가하십시오.

참고: 튜브의 캡을 닫지 마십시오. 필요할 때까지 캡은 플라스틱 용기에 남겨 둡니다.

- 8. 즉시 5 μL 의 무주형 대조물질(NTC)용 물을 무주형 대조물질 튜브(PCR 튜브 번호 3 및 4)에 추가하십시오.

참고: NTC에는 반드시 무주형 대조물질(NTC)용 물 튜브를 사용해야 합니다. 샘플 희석용 물 튜브를 NTC로 사용해서는 안 됩니다.

- 9. NTC가 포함된 튜브(PCR 튜브 번호 3 및 4)의 캡을 닫으십시오.

표 5. 로딩 블록의 샘플 테스트 레이아웃(숫자는 로딩 블록의 위치를 나타내며 최종 로터 위치를 나타냄)

Mix

PC MM1 (1)	샘플 3 MM1 (9)	샘플 7 MM1 (17)	샘플 11 MM1 (25)	샘플 15 MM1 (33)	샘플 19 MM1 (41)	샘플 23 MM1 (49)	-	-
PC MM2 (2)	샘플 3 MM2 (10)	샘플 7 MM2 (18)	샘플 11 MM2 (26)	샘플 15 MM2 (34)	샘플 19 MM2 (42)	샘플 23 MM2 (50)	-	-
NTC MM1 (3)	샘플 4 MM1 (11)	샘플 8 MM1 (19)	샘플 12 MM1 (27)	샘플 16 MM1 (35)	샘플 20 MM1 (43)	샘플 24 MM1 (51)	-	-
NTC MM2 (4)	샘플 4 MM2 (12)	샘플 8 MM2 (20)	샘플 12 MM2 (28)	샘플 16 MM2 (36)	샘플 20 MM2 (44)	샘플 24 MM2 (52)	-	-
샘플 1 MM1 (5)	샘플 5 MM1 (13)	샘플 9 MM1 (21)	샘플 13 MM1 (29)	샘플 17 MM1 (37)	샘플 21 MM1 (45)	-	-	-
샘플 1 MM2 (6)	샘플 5 MM2 (14)	샘플 9 MM2 (22)	샘플 13 MM2 (30)	샘플 17 MM2 (38)	샘플 21 MM2 (46)	-	-	-
샘플 2 MM1 (7)	샘플 6 MM1 (15)	샘플 10 MM1 (23)	샘플 14 MM1 (31)	샘플 18 MM1 (39)	샘플 22 MM1 (47)	-	-	-
샘플 2 MM2 (8)	샘플 6 MM2 (16)	샘플 10 MM2 (24)	샘플 14 MM2 (32)	샘플 18 MM2 (40)	샘플 22 MM2 (48)	-	-	-

- 10. 각 샘플을 5µl씩 샘플 튜브에 분주합니다(예: PCR 튜브 번호 5–52).
- 11. 샘플이 들어 있는 튜브의 캡을 닫으십시오.
- 12. 양성 대조물질 튜브(PCR 튜브 번호 1 및 2)에 5µl의 IDH1 양성 대조물질(PC)을 분주하십시오.
- 13. PC가 들어 있는 튜브의 캡을 닫으십시오.
- 14. 유성 매직을 사용하여 튜브 캡에 Rotor-Gene Q MDx 기기에 튜브를 로드하는 방향을 표시하십시오.

15. 모든 PCR 튜브의 캡을 닫은 후, 샘플 튜브의 충전 레벨을 육안으로 점검하여 모든 튜브에 샘플이 추가되었는지 확인하십시오.
16. PCR 스트립 튜브를 72-Well Rotor의 적절한 위치에 장착하십시오(표 5). 로터가 완전히 채워지지 않은 경우, 로터의 모든 빈 위치를 캡이 씌워진 빈 튜브로 채워야 합니다.
17. 72-Well Rotor를 Rotor-Gene Q MDx 기기에 즉시 장착하십시오. 잠금 링(Rotor-Gene Q MDx 기기 부속품)이 로터 상단에 위치하여 실행 중 튜브를 고정하도록 하십시오.

IDH1 돌연변이 분석 실행 수행

1. *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit는 Rotor-Gene Q MDx 기기에서 실행해야 합니다. 사용하기 전에 Rotor-Gene AssayManager 소프트웨어 v2.1 및 Gamma Plug-in을 설치해야 합니다.
2. Rotor-Gene AssayManager v2.1 핵심 소프트웨어와 Gamma MDx Plug-in에는 각각 별도의 사용자 설명서가 있습니다. 설치 지침은 *Rotor-Gene AssayManager v2.1 MDx Core Application* 사용자 설명서의 “Installing Rotor-Gene AssayManager v2.1” 및 “Installing plug-ins” 섹션을 참조하십시오.
3. 사용하기 전에 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 분석 항목 프로필을 Rotor-Gene AssayManager로 가져와야 합니다. 지침은 “Gamma MDx Plug-in 설치 및 분석항목 프로필 가져오기” 섹션을 참조하십시오. 분석항목 프로필에는 PCR을 실행하는 데 필요한 모든 매개변수가 포함되어 있으며 자동 분석 및 결과 해석을 수행합니다.
4. Rotor-Gene AssayManager에서 생성하는 실행 보고서를 보려면 PDF 뷰어가 설치되어 있어야 합니다.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 소프트웨어를 사용한 IDH1 돌연변이 분석 설정 지침이 다음에 나와 있습니다. 보다 구체적인 지침은 해당 사용자 설명서를 참조하십시오.

5. 바탕화면 아이콘(그림 6)을 더블 클릭하여 Rotor-Gene AssayManager v2.1 소프트웨어를 여십시오.



그림 6. Rotor-Gene AssayManager 바탕화면 아이콘

6. Rotor-Gene AssayManager 로그인 화면(그림 7)에서 사용자 ID와 비밀번호를 입력하고 **Closed** 모드를 선택한 후 **OK**(확인)를 클릭합니다. 그러면 Rotor-Gene AssayManager 메인 창이 열립니다.

QIAGEN Rotor-Gene AssayManager 2.1.1.1

User ID

Password

Mode
Closed

OK Cancel

그림 7. Rotor-Gene AssayManager 로그인 화면.

7. 메인 창에서 **New manual work list**(새 수동 작업 목록)를 선택하여 새 작업 목록(그림 8, 상자 1로 표시됨)을 만듭니다.

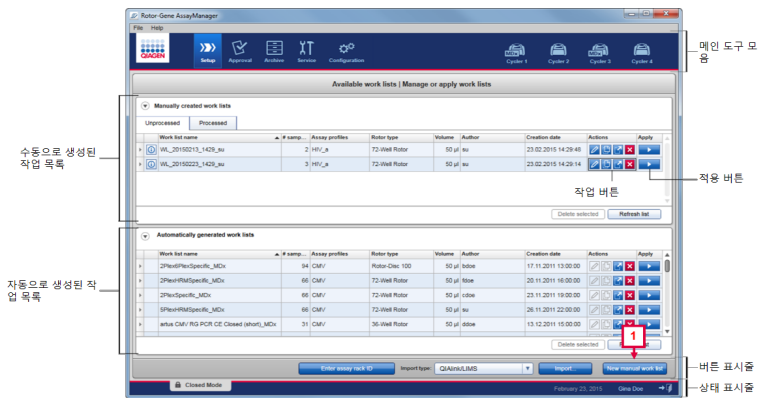


그림 8. Rotor-Gene AssayManager 메인 창. 상자 1은 New manual work list 버튼을 나타냅니다.

8. IDH1 실행을 수행하려면 **Assays**(분석) 탭이 선택되어 있는지 확인하십시오. “Available assay profiles” (사용 가능한 분석항목 프로필) 창(그림 9, 상자 1로 표시됨)에서 **ipsogen_IDH1_BMA_MDX** 분석항목 프로필을 클릭하고 **파란색 화살표**를 클릭하여 분석항목 프로필을 선택합니다(그림 9, 상자 2로 표시됨). 필요한 경우 마우스 포인터를 분석항목 프로필 위로 옮기면 이름 전체가 나옵니다. 이제 분석항목 프로필이 “Selected assay profiles”(선택된 분석항목 프로필) 창에 나타나야 합니다(그림 9).

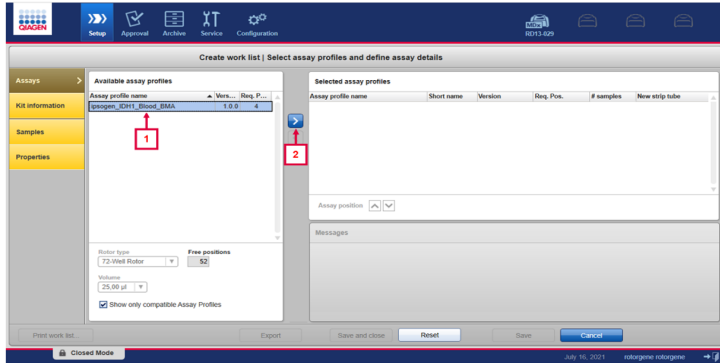


그림 9. “Create work list”(작업 목록 생성) 창. 상자 1은 선택할 분석항목 프로필을 나타냅니다. 상자 2는 선택한 분석항목 프로필을 지정하는 방법을 나타냅니다.

9. “Selected assay profiles” 창(그림 10, 상자 1로 표시됨)에서 테스트할 샘플 수(대조군 제외)를 입력합니다. 다음으로 **Samples**(샘플) 탭을 클릭하여 “sample information”(샘플 정보)(그림 10, 상자 2로 표시됨)를 입력합니다.

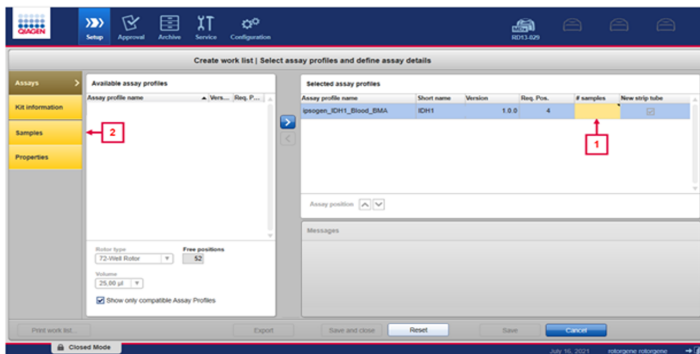


그림 10. “Assays” 탭의 “Create work list”(작업 목록 생성) 창. 상자 1은 샘플 수를 추가할 위치를 나타냅니다. 상자 2는 Samples 탭을 나타냅니다.

10. “Sample ID”(샘플 ID) 열에 샘플 이름을 입력합니다(그림 11, 상자 1로 표시됨). 주석이 있는 경우 “Comments”(주석) 열에 입력합니다. 다음으로 **Properties**(속성) 탭(그림 11, 상자 2로 표시됨)을 클릭합니다.

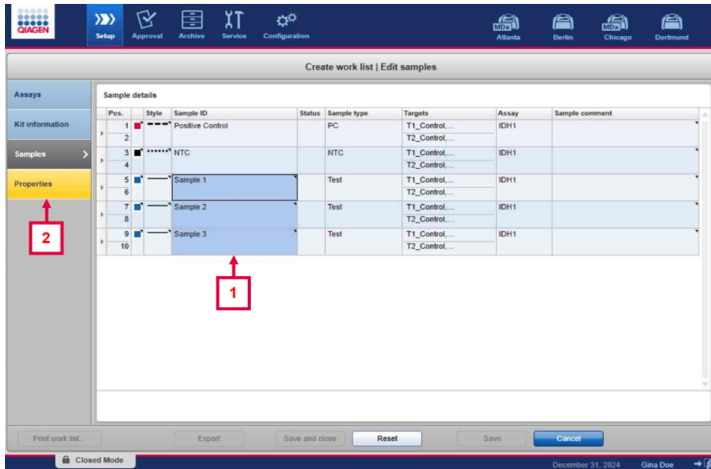


그림 11. “Samples” 탭의 “Create work list”(작업 목록 생성) 창. 상자 1은 샘플 ID 열을 나타냅니다. 상자 2는 속성 탭을 나타냅니다.

11. “Work list name”(작업 목록 이름) 텍스트 상자에 작업 목록 이름을 입력하고 “work list is complete”(작업 목록 완료)(적용 가능) 상자에 체크 표시합니다(그림 12, 상자 1 및 상자 2로 표시됨). **Apply** (적용)를 클릭하여 작업 목록을 적용합니다(그림 12, 상자 3으로 표시됨).

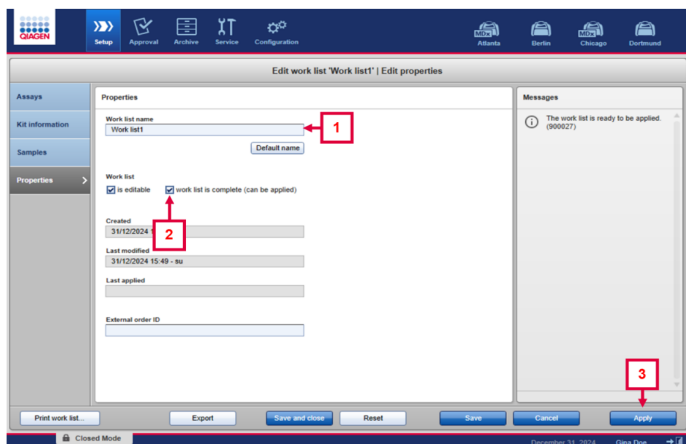


그림 12. “Properties” 탭의 “Create work list”(작업 목록 생성) 창. 상자 1은 작업 목록 이름을 입력하는 위치를 나타냅니다. 상자 2는 “worklist complete”(작업 목록 완료) 확인란을 나타냅니다. 상자 3은 Apply 버튼을 나타냅니다.

12. “Experiment name”(실험 이름) 텍스트 상자(그림 13, 상자 1로 표시됨)에 실험 이름을 입력합니다. 올바른 사이클러가 선택되었는지, “Ring attached”(링 부착됨) 확인란이 선택되었는지 확인합니다(그림 13, 상자 2 및 3으로 표시됨). 진행하려면 **Start run**(실행 시작)을 클릭합니다(그림 13, 상자 4로 표시됨).

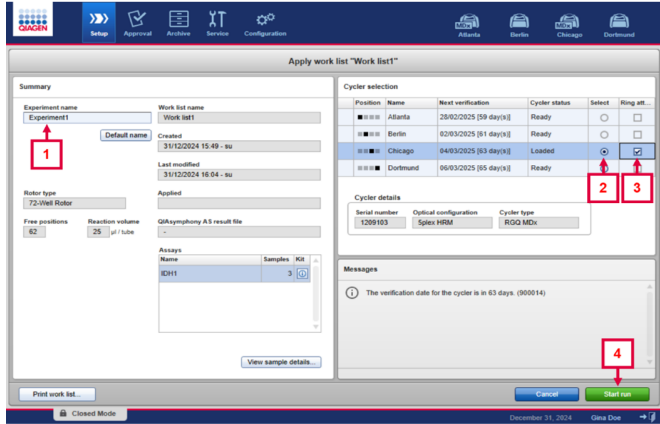


그림 13. “Apply work list”(작업 목록 적용) 창. 상자 1은 실험 이름을 추가하는 위치를 나타냅니다. 상자 2 및 3은 올바른 사이클러를 선택하고 링이 장착되었는지 확인하는 위치를 나타냅니다. 상자 4는 Start run 버튼을 나타냅니다.

13. 완료되면 **Finish run**(실행 완료)를 클릭하여 실행을 해제하고 승인합니다(그림 14, 상자 1로 표시됨).

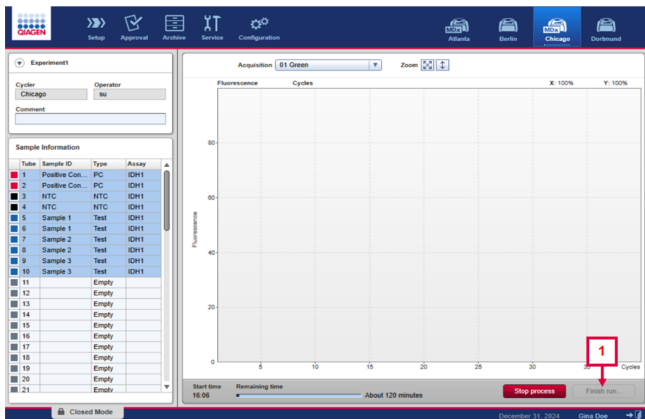


그림 14. “Cycler Environment”(사이클러 환경) 창의 예시입니다. 상자 1은 Finish run 버튼을 나타냅니다.

14. 실행 정보 및 IDH1 분석 결과를 보려면 **Release and go to approval**(그림 15)을 클릭하십시오. 이렇게 하면 또한 다음 실행에 대한 준비를 할 수 있도록 Rotor-Gene Q MDx 기기를 해제합니다.

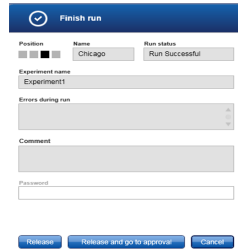


그림 15. “Finish Run” 대화상자.

15. ipsogen_IDH1_BMA_MDx 분석항목 프로필에는 자동 분석 및 샘플 분석과 결과 해석에 대한 모든 규칙이 포함되어 있습니다. 그에 따라 소프트웨어가 샘플의 유효성 또는 무효성을 평가하고 자동으로 통제합니다.

참고: 분석 결과 해석에 대한 자세한 내용은 “결과 해석” 섹션을 참조하십시오.

16. 처리된 데이터, 실험 정보, 분석 및 감사 추적 정보는 “Plots and information”(플롯 및 정보) 창에서 확인할 수 있습니다. 분석 결과는 Assay results(분석 결과) 창에서 찾아 볼 수 있습니다. 양성 대조물질 및 무주형 대조물질 결과가 허용 범위 내에 있으면 “Overall sample result”(전체 샘플 결과) 옆에 “valid”(유효)(그림 16)가 보고되고, 그렇지 않으면 “INVALID”(유효하지 않음) 결과가 나타납니다(그림 17).

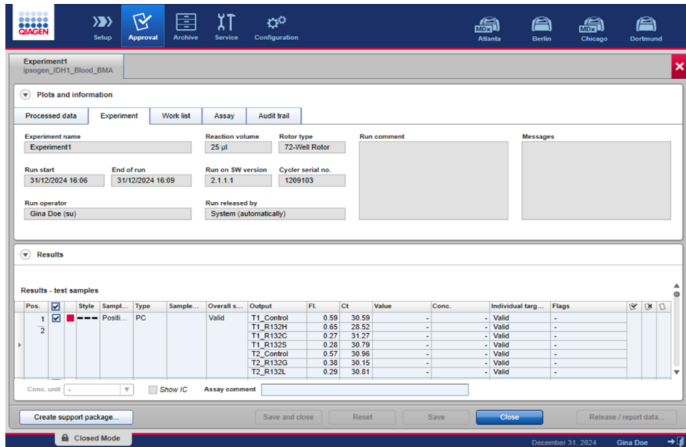


그림 16. 유효한 “Assay Results” 창.

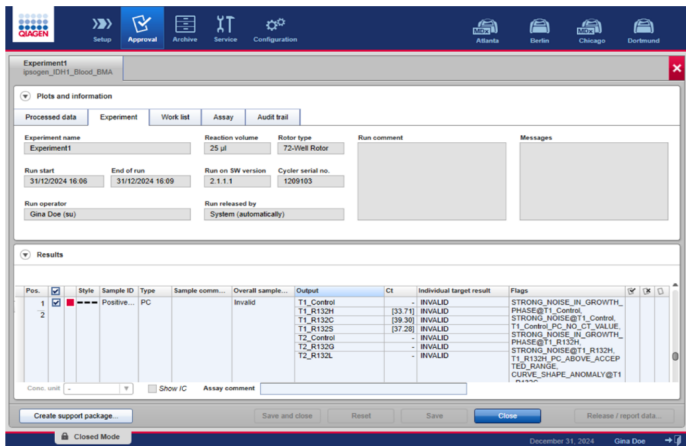


그림 17. 유효하지 않은 “Assay Results” 창.

17. 샘플 대조물질 결과가 허용 범위 내에 있는 경우 “Overall sample result” 열에 “No Mutation Detected”(돌연변이 미검출) 또는 “IDH1 Mutation Detected”(IDH1 돌연변이 검출)(그림 18)가 보고됩니다. 이는 샘플 DNA 농도가 돌연변이 분석에 적합함을 나타냅니다.

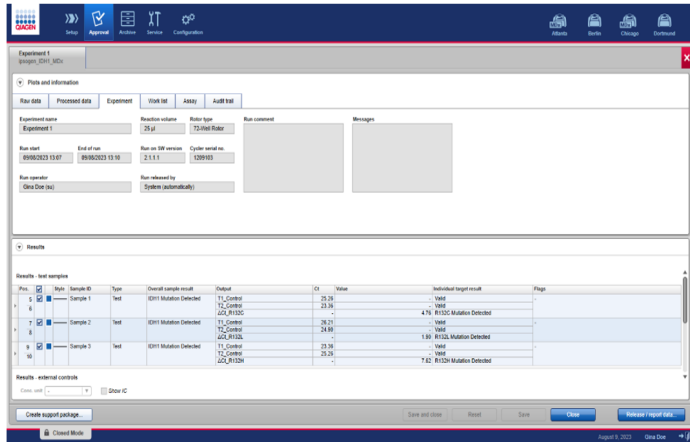


그림 18. Sample results window(샘플 결과 창).

18. **확인**을 클릭하여 실험을 아카이브에 저장하고 LIMS 출력 및 실행 보고서를 생성합니다 (그림 19). 실행 보고서와 LIMS 내보내기는 기본 보고서 디렉터리에 저장됩니다. 기본 디렉터리는 “Configuration”(구성) 탭의 데이터 내보내기 디렉터리에서 찾을 수 있습니다.

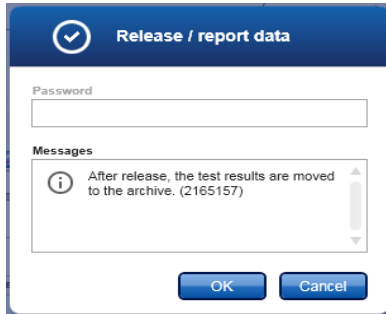


그림 19. "Release/report data"(데이터 해제/보고) 대화상자.

19. "Status of release"(릴리스 상태) 대화상자가 나타납니다. **OK**(확인)을 클릭하여 수락합니다(그림 20).

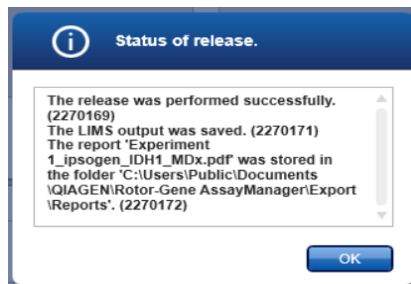


그림 20. "Status of release" 대화상자.

20. 이제 해제된 실험을 "Archive"(보관함) 환경에서 검색할 수 있습니다. 실험을 찾으려면 **Archive** 탭을 클릭하고 필요한 검색 기준을 입력하십시오.

11. 결과 해석

분석 및 돌연변이 판정은 런이 완료되면 Rotor-Gene AssayManager v2.1 (Rotor-Gene AssayManager v2.1) 소프트웨어에서 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile(분석항목 프로파일)을 사용하여 자동으로 수행되며, 별도의 수동 해석이 필요하지 않습니다.

다음 정보는 분석 및 돌연변이 호출이 어떻게 이루어지는지 설명합니다.

분석 및 돌연변이 판정

특정 반응의 형광이 *ipsogen_IDH1_BMA_MDX* Assay Profile(분석항목 프로파일)에 의해 제공된 사전 정의된 임계값을 초과하는 PCR 사이클을 C_t 값으로 정의합니다. C_t 값은 특정 주입 DNA의 양을 나타냅니다. 낮은 C_t 값은 더 높은 주입 DNA 수준을 나타내고 높은 C_t 값은 더 낮은 주입 DNA 수준을 나타냅니다. 각 IDH1 돌연변이 분석에 대해 다음 방정식을 사용하여 ΔC_t 값을 결정하기 위한 계산을 수행합니다.

$$\Delta C_t = [\text{mutation assay } C_t \text{ value}] - [\text{control assay } C_t \text{ value}]$$

미리 결정된 분석 C_t 및 ΔC_t 값을 기반으로 *ipsogen_IDH1_BMAMDX* Assay Profile(분석항목 프로파일)은 DNA 샘플의 돌연변이 상태를 정성적으로 결정하고 샘플에 지정된 IDH1 돌연변이가 하나 이상 포함되어 있는지 여부를 보고합니다.

대조군(PC, NTC, Sample Control(샘플 대조군))을 평가하여 허용 가능한 C_t 값을 충족하는지, 반응이 성공적으로 수행되었는지 확인합니다.

C_t 값이 허용 범위를 벗어나면 “INVALID” 결과를 얻게 되며 하나 이상의 플래그가 보고됩니다. 자세한 내용은 다음 페이지의 “*ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 분석항목 프로파일 플래그”를 참조하십시오. 예를 들어, 샘플 대조군 C_t가 허용 범위 미만인 경우 이는 DNA 투입량이 너무 높음을 의미하며 샘플을 희석해야 합니다.

참고: 샘플 또는 실행이 유효하지 않은 경우 IDH1 돌연변이 상태는 보고되지 않습니다.

Rotor-Gene AssayManager v2.1 소프트웨어(Rotor-Gene AssayManager v2.1 software)는 해당 분석항목 프로필에 정의된 정규화, 샘플 및 분석 규칙과 같은 핵심 분석 알고리즘에 따라 모든 관련 분석 결과를 결합하여 각 타겟에 대한 결과를 결정합니다.

개별 샘플에 대해 다음과 같은 결과가 지정될 수 있습니다.

- IDH1 Mutation Detected
- No Mutation Detected
- INVALID: Rotor-Gene AssayManager v2.1 소프트웨어(Rotor-Gene AssayManager v2.1 software) 분석 중 타겟 결과를 “INVALID”로 설정하도록 정의된 하나 이상의 플래그가 샘플에 할당된 경우입니다.

참고: 실행 중에 오류가 발생한 경우, Rotor-Gene Q MDx 기기에 있는 샘플을 폐기해야 하며 재검사해서는 안 됩니다.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit 분석항목 프로필 플래그

이 ipsogen_IDH1_BMA_MDx Assay Profile(분석항목 프로필)에만 국한되지 않는 Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma MDx Plug-in 관련 플래그는 표 6에 나열되어 있습니다.

표 6. Rotor-Gene AssayManager v2.1 Gamma MDx Plug-in 관련 플래그

플래그	설명	조치
ANALYSIS_FAILED	분석이 실패했기 때문에 분석항목이 무효로 설정되었습니다.	QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
ASSAY_INVALID	하나 이상의 외부 대조물질이 무효이기 때문에 샘플이 무효입니다.	실행을 반복합니다. 표 7의 내용을 참조하십시오.
CONSECUTIVE_FAULT	이 표적의 계산에 사용된 표적이 무효입니다.	추가 작업이 필요하지 않습니다.

플래그	설명	조치
CURVE_SHAPE_ANOMALY	원시 데이터 증폭 곡선이 이 분석항목에 대해 확립된 동작을 벗어나는 형태를 보입니다. 잘못된 결과 또는 결과 해석 오류 가능성이 높습니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
FLAT_BUMP	증폭 곡선은 이 분석항목에 대하여 확립된 동작을 벗어나 평평한 돌출부와 같은 형태를 보입니다. 결과가 부정확하거나 결과 해석이 잘못될(예: 잘못된 Ct 값 결정) 가능성이 높습니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
MULTIPLE_THRESHOLD_CROSSING	증폭 곡선이 임계치를 두 번 이상 교차합니다. 명확한 Ct 값을 결정할 수 없습니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
NO_BASELINE	초기 기준선을 찾을 수 없습니다. 차후 분석을 실시할 수 없습니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
OTHER_TARGET_INVALID	동일한 샘플에 대한 또 다른 표적이 무효입니다.	추가 작업이 필요하지 않습니다.
RUN_FAILED	사이클러 또는 사이클러 연결상의 문제로 인해 무효 분석항목이 무효로 설정되었습니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
RUN_STOPPED	실행이 수동으로 중단되었기 때문에 무효 분석항목이 무효로 설정되었습니다.	실행을 반복합니다.
SATURATION	증폭 곡선의 변곡점 이전에 원시 데이터 형광도가 크게 포화되고 있습니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
SPIKE	증폭 곡선에서 원시 데이터 형광의 스파이크가 감지되었으나, Ct가 결정되는 영역 밖에서 감지되었습니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
SPIKE_CLOSE_TO_CT	증폭 곡선의 Ct 근처에서 스파이크가 감지되었습니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.

플래그	설명	조치
STEEP_BASELINE	증폭 곡선에서 원시 데이터 형광도에 대한 기준선의 급격한 증가가 검출됩니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
STRONG_BASELINE_DIP	증폭 곡선에서 원시 데이터 형광도에 대한 기준선의 급격한 감소가 검출됩니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
STRONG_NOISE	증폭 곡선의 성장 단계 밖에서 강력한 잡음이 검출됩니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
STRONG_NOISE_IN_GROWTH_PHASE	증폭 곡선의 성장(기하급수적) 단계에서 강력한 잡음이 검출됩니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.
WAVY_BASE_FLUORESCENCE	증폭 곡선에서 원시 데이터 형광도에 대한 파형 기준선이 검출됩니다.	재검사합니다. 재검사 중 이 플래그가 발생하면 QIAGEN 기술 지원팀에 문의하십시오.

표 7 및 표 8에는 ipsogen_IDH1_BMA_MDx 분석항목 프로파일에서 생성될 수 있는 플래그와 그 의미 및 취해야 할 조치가 나열되어 있습니다.

플래그 이름은 키트의 해당 구성품, 해당 샘플 또는 대조 및 실패 모드에 대한 정보를 제공하도록 지어졌습니다.

예:

T1_Control_PC_NO_CT_VALUE = 양성 대조물질(Positive Control, PC), 튜브 1에 대한 대조군 분석에 Ct 값이 없음

“문제 해결 가이드” 섹션도 참조하십시오.

표 7. PC 및 NTC용 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR 키트 분석항목 프로파일에서 사용하는 소프트웨어 플래그

플래그	의미	조치
T1_<target>_PC_NO_CT_VALUE 또는 T2_<target>_PC_NO_CT_VALUE	무효한 실행. PC의 Ct 값이 없습니다.	실행을 반복합니다.
T1_<target>_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE 또는 T2_<target>_PC_ABOVE_ACCEPTED_RANGE	무효한 실행. PC가 사양 범위를 초과합니다.	실행을 반복합니다.
T1_<target>_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE 또는 T2_<target>_PC_BELOW_ACCEPTED_RANGE	무효한 실행. PC가 사양 범위 미만입니다.	실행을 반복합니다.
T1_<target>_ NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE 또는 T2_<target>_NTC_UNEXPECTED_CT_VALUE	무효한 실행. NTC에서 Ct 값이 검출되었습니다.	실행을 반복합니다.

표 8. 샘플용 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit Assay Profile(분석항목 프로파일)에서 사용하는 소프트웨어 플래그

플래그	의미	조치
T1_Control_DNA_ INPUT_TOO_HIGH 또는 T2_Control_DNA_ INPUT_TOO_HIGH	무효한 샘플. 샘플 대조군 Ct 값이 컨트롤 작동 범위 미만입니다.	DNA 정량화 및 정규화를 반복하십시오. 재검사 후에도 대조군 Ct 값이 여전히 유효하지 않으면 샘플을 다시 추출하십시오. 재추출 및 두 차례의 추가 검사 후에도 대조군 Ct 값이 유효하지 않은 경우, 해당 샘플은 돌연변이 상태 불확정으로 보고해야 합니다.
T1_Control_ABOVE_ ACCEPTED_RANGE 또는 T2_Control_ABOVE_ ACCEPTED_RANGE	무효한 샘플. 샘플 대조군 Ct 값이 대조군 작동 범위를 초과함.	DNA 정량화 및 정규화를 반복하십시오. 재검사 후에도 대조군 Ct 값이 여전히 유효하지 않으면 샘플을 다시 추출하십시오. 재추출 및 두 차례의 추가 검사 후에도 대조군 Ct 값이 유효하지 않은 경우, 해당 샘플은 돌연변이 상태 불확정으로 보고해야 합니다.

플래그	의미	조치
T1_Control_NO_CT_ VALUE 또는 T2_Control_NO_CT_ VALUE	무효한 샘플. 샘플에 Ct 값이 없습니다.	DNA 정량화 및 정규화를 반복하십시오. 재검사 후에도 대조군 Ct 값이 여전히 유효하지 않으면 샘플을 다시 추출하십시오. 재추출 및 두 차례의 추가 검사 후에도 대조군 Ct 값이 유효하지 않은 경우, 해당 샘플은 돌연변이 상태 불확정으로 보고해야 합니다.

참고: 재검사한 샘플이 반복 시 다른 이유로 유효하지 않은 경우에도 여전히 두 번째 반복으로 분류되며 샘플 재추출을 수행해야 합니다. 재검사 및 재추출 절차는 그림 21을 참조하십시오.

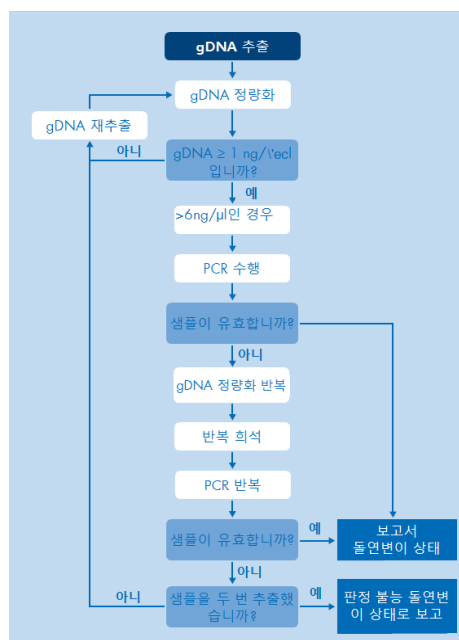


그림 21. 샘플 재검사 절차 순서도

12. 제한 사항

돌연변이의 검출은 샘플의 무결성과 시료에 존재하는 증폭 가능한 DNA의 양에 따라 달라집니다.

이 검사는 IDH1 유전자의 코돈 132 내에서 발생하는 다섯 가지 돌연변이를 감지하도록 설계되었습니다. 결과가 No Mutation Detected로 보고되는 샘플은 이 분석으로 검출되지 않는 IDH1 돌연변이를 포함하고 있을 수 있습니다.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 절차를 사용합니다. 모든 PCR 절차에 서와 마찬가지로 샘플이 검사 환경의 외부 DNA 소스나 양성 대조물질의 DNA로 오염될 수 있습니다. 샘플 및 반응 혼합물 시약이 오염되지 않도록 주의하십시오.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 K2-EDTA 튜브에 채취된 골수 흡인 샘플에만 사용해야 합니다.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit에만 사용해야 합니다.

최적의 결과를 얻으려면 *ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit 안내서*를 엄격히 준수해야 합니다. 본 안내서에 설명되어 있는 지침 외의 방법으로 시약을 희석하는 것은 권장되지 않으며, 그럴 경우 성능이 저하됩니다.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 동일한 키트 로트의 모든 반응 성분을 함께 사용하는 경우에만 사용할 수 있습니다.

이 제품은 Rotor-Gene Q MDx 기기에서만 사용하도록 제작되었습니다.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 정성 검사입니다. 이 검사법은 돌연변이 비율의 정량적 측정을 위한 것이 아닙니다.

분석 절차 중에 미생물 오염이 발생할 경우 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 성능은 알 수 없습니다.

검사 샘플에 시타라빈, 데시타빈, 트리글리세라이드, 에토포시드, 이다루비신염산염, 다우노루비신염산염 또는 아자시티딘이 포함되어 있는 경우 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 성능이 영향을 받을 수 있습니다.

13. 성능 특징

13.1. 분석 성능

13.1.1. 공백 한계

공백 한계(Limit of Blank, LoB)는 CLSI 지침 EP17-A2에서 “공시로 샘플에서 (명시된 확률로) 관찰될 가능성이 있는 최고의 측정 결과”로 정의됩니다. *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 경우, 이는 공백(야생형(wild type), 즉 R132 돌연변이 음성) 샘플에서 상위 95번째 백분위수에 해당하는 데이터 포인트입니다.

LoB는 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 5가지 IDH1 돌연변이 분석 각각에 대한 브레이크스루(breakthrough) 수준을 측정하여 결정되었으며, 여기서 브레이크스루는 DNA 템플릿의 비특이적이고 낮은 수준의 증폭으로 정의됩니다. *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 경우, 이는 돌연변이 프로브가 야생형(wild type) DNA에 비특이적으로 결합하는 것을 의미합니다.

표 9. LoB 결과 요약

IDH1 분석항목	LoB(Ct 값)
R132H	증폭 없음
R132C	증폭 없음
R132S	증폭 없음
R132G	증폭 없음
R132L	증폭 없음

이 분석에 기반하여, 해당 분석법의 LoB는 Ct 값이 없는 것으로 결정되었습니다.

13.1.2. 검출 한계

검출 한계(LoD)는 야생형(wild type) DNA 배경에서 95%의 확률로 검출 가능한 IDH1 R132 돌연변이의 가장 낮은 대립 유전자 빈도로 정의됩니다. R132 돌연변이 세포주 DNA가 스파이크된 야생형(wild type) 임상 BMA 시료에서 유전체 DNA를 추출하고, 이를 야생형(wild type) 임상 BMA 시료에서 추출한 정규화된 DNA로 희석했습니다. 유전체 DNA는 각 분석에 대해 추정된 LoD보다 높거나, 같거나, 낮은 % MAF 수준으로 연속 희석되었습니다.

낮은 DNA 투입량 수준에서 각 % 희석 단계별로 최소 60회의 반복 실험을 3개의 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 로트를 사용하여 수행했습니다. 각 분석의 LoD는 Probit 모델(표 10)을 사용하여 결정되었습니다.

표 10. LoD 결과 요약

IDH1 분석항목	LoD(% MAF)
R132H	1.25
R132C	2.70
R132S	4.70
R132G	3.20
R132L	2.90

LoD는 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 로트의 유효성 범위 전반에서 검증되었습니다.

13.1.3. 분석 컷오프

분석 컷오프는 샘플이 IDH1 R132 돌연변이 양성 또는 음성으로 분류되는지 여부를 결정하는 데 사용되는 특정 ΔC_t 값입니다. 컷오프 이하의 ΔC_t 값이 생성되는 샘플은 R132 돌연변이 양성(즉, R132 돌연변이 검출)으로 분류되고, 컷오프를 초과하는 ΔC_t 값이 생성되는 샘플은 R132 돌연변이 음성(즉, 돌연변이 미검출)으로 분류됩니다. 각 IDH1 돌연변이 특이적 분석 항목에 대한 위음성 및 위양성 비율을 사용하여 각 돌연변이 분석항목에 대한 컷오프 값을

결정하였으며, 이 때 컷오프 이하의 결과는 IDH1 돌연변이 검출됨으로 분류됩니다. *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 내 각 분석의 컷오프는 표 11에 나와 있습니다.

표 11. 분석 컷오프 값 요약

IDH1 분석항목	분석 컷오프(ΔC_t 값)
R132H	14.75
R132C	14.75
R132S	14.75
R132G	14.75
R132L	14.75

13.1.4. 유전체 DNA 투입량 범위

DNA 주입 수준은 대조 반응의 C_t 값에 의해 결정되는 샘플 내 증폭 가능한 DNA의 총량으로 정의됩니다. *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 성능이 대조 반응 작동 범위(CWR)(21.54~25.25 C_t) 전체에서 일관됨을 입증하기 위해, 다양한 DNA 주입량 수준의 7단계 연속 희석(최고 및 최저 수준은 CWR 범위를 벗어남)을 테스트했습니다. 이는 야생형(wild type) 및 5가지 R132 돌연변이 각각(1.5배 LoD에서)과 BMA에 대해 수행되었습니다.

평가는 3개의 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 로트를 사용하여 수행되었으며, DNA 주입량 수준 당 6개의 반복 시료를 테스트했습니다(키트 로트당 2개의 반복 시료). 회귀 분석을 사용하여 데이터를 분석하고 선형 범위를 결정하였습니다. 분석법이 DNA 주입량 범위 전체에서 선형인 것으로 확인되려면, 돌연변이 양성 샘플의 경우 해당 범위 전체에서 ΔC_t 의 변화가 없어야 합니다(즉, 통계적으로 유의미한 선형, 이차 또는 삼차 효과가 없어야 함). 야생형(wild type) 샘플의 경우, 분석법이 DNA 주입량 범위 전체에서 선형인 것으로 확인되려면 희석 수준에 따른 대조군 C_t 에서 통계적으로 유의미한 선형 효과가 있어야 하며, 통계적으로 유의미한 이차 또는 삼차 효과는 없어야 합니다.

검사된 희석에 대한 매개변수 추정치는 모든 샘플에 대해 선형성을 보여주었습니다. 해당 분석을 위해 테스트한 DNA 입력 범위 전반에서 선형 ΔC_t 및 대조군 C_t 범위가 관찰되었습니다.

13.1.5. 측정의 정확도

정밀도

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit의 반복성은 표준 DNA 입력량인 5ng/μL에서 두 가지 돌연변이 수준(1× LoD 및 2× LoD)의 인위적 샘플을 테스트하여 평가하였으며, 표준(5ng/μL) 및 낮은 DNA 입력량(3.5ng/μL) 수준의 야생형(wild type) 샘플은 한 곳의 시험기관(영국 소재)에서 테스트되었습니다. 샘플은 여러 날에 걸쳐 여러 대의 Rotor-Gene Q MDx 기기, 여러 명의 작업자 및 3개 로트의 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit를 사용하여 샘플당 4회 실행으로 3중 테스트를 수행하였으며, 샘플당 총 최소 106회의 반복 테스트(표 12) 결과를 생성했습니다.

표 12. 골수 흡인물 샘플에 대한 분석 반복성*

돌연변이	수준	유효한 결과의 분율	정확한 판정(%)	양측 95% CI 하한
야생형(wild type)	3.5ng/μL	108/108	100.00	96.64
	5ng/μL	106/106	100.00	96.58
R132H	1× LoD	106/108	98.15	93.47
	2× LoD	107/107	100.00	96.61
R132C	1× LoD	105/106	99.06	94.86
	2× LoD	108/108	100.00	96.64
R132S	1× LoD	99/106	93.40	86.87
	2× LoD	108/108	100.00	96.64
R132G	1× LoD	107/108	99.07	94.95
	2× LoD	108/108	100.00	96.64

표 12. 골수 흡인물 샘플에 대한 분석 반복성* (계속)

돌연변이	수준	유효한 결과의 분율	정확한 판정(%)	양측 95% CI 하한
R132L	1× LoD	107/108	99.07	94.95
	2× LoD	108/108	100.00	96.64

* 1× 및 2× LoD에서 각 IDH1 돌연변이에 대한 정확한 판독 수와 양측 95% 신뢰 하한, 그리고 한 곳의 시험기관에서 테스트한 야생형(wild type) 샘플에 대한 결과입니다.

13.1.6. 중간 정밀도

실험실 내 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 정밀도(반복성)를 평가했습니다. 양성 테스트 샘플에 대한 ΔCt 값(돌연변이 반응과 대조 반응 간의 Ct 값 차이) 및 음성 테스트 샘플에 대한 대조 Ct 값의 정밀도는 표 13에 보고되어 있습니다.

표 13. ΔCt 및 대조 Ct의 중간 정밀도*

샘플 유형	분석 변수	표적 돌연변이	분석	N	평균	중간 정밀도 SD(표준 편차)
BMA	ΔCt	R132C	RM1	108	6.17	0.8177
		R132G	RM2	108	7.22	0.6411
		R132H	RM1	107	5.92	0.6161
		R132L	RM2	108	6.54	0.3887
		R132S	RM1	108	7.68	0.5616
	대조군 Ct	WT	RM1	106	23.67	0.0903
			RM2	106	23.72	0.1277

* 2× LoD 돌연변이 양성 샘플에 대한 각 돌연변이 분석의 ΔCt 및 BMA 샘플을 포함하여 5ng/μL DNA 주입 시 WT 샘플에 대한 대조군 Ct의 평균 및 표준편차(중간 정밀도)입니다.

13.1.7. 재현성

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit의 재현성은 표준 DNA 투입량 5ng/μL에서 두 가지 돌연변이 수준(1× LoD 및 2× LoD)의 인위적인 샘플을 테스트하여 평가했으며, 야생형(wild type) 샘플은 표준(5ng/μL) 및 낮은 DNA 투입량(3.5ng/μL) 수준에서 3개 사이트(영국 1개 및 미국 2개)에서 테스트되었습니다. 샘플은 여러 날에 걸쳐 샘플당 6회 실행, Rotor-Gene Q MDx 기기 및 작업자, 그리고 3개 로트의 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit를 사용하여 중복으로 테스트하여 샘플당 최소 총 178개의 반복 실험 결과(표 14)를 생성했습니다.

표 14. 골수 흡인액 샘플에 대한 분석 재현성*

돌연변이	수준	유효한 결과의 분율	정확한 판정(%)	양측 95% CI 하한
야생형(wild type)	3.5ng/μL	179/179	100	97.96
	5ng/μL	178/178	100	97.95
R132H	1× LoD	178/180	98.89	96.04
	2× LoD	179/179	100	97.96
R132C	1× LoD	177/178	99.44	96.91
	2× LoD	179/180	99.44	96.94
R132S	1× LoD	167/178	93.82	89.21
	2× LoD	179/180	99.44	96.94
R132G	1× LoD	179/180	99.44	96.94
	2× LoD	180/180	100	97.97
R132L	1× LoD	179/180	99.44	96.94
	2× LoD	180/180	100	97.97

* 3개 기관에서 테스트한 각 IDH1 돌연변이(1× 및 2× LoD) 및 야생형(wild type) 샘플에 대한 정확한 판독 수와 양측 95% 신뢰 하한.

13.1.8. 로트 상호 교환성

이 연구의 목적은 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit 및 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (IDH1 Kit)의 로트에 관계없이 골수 흡인액(BMA) 내 모든 샘플의 돌연변이 판독 상태가 모든 표적에 대해 일관됨을 입증하는 것이었습니다.

이 연구에서는 키트의 로트 상호 교환성을 평가하기 위해 다섯 개의 돌연변이 샘플(IDH1 키트에서 감지한 각 돌연변이 대상에 대해 하나씩)과 각 샘플 유형별로 1개의 WT 샘플(총 12개 샘플)를 사용했습니다. 각 샘플에 대해 4번의 추출 복제본은 3개의 독립적인 추출 키트 로트를 사용하여 추출되었습니다. 각 반복 시료의 DNA 농도를 정량화한 후 5ng/μL로 표준화했습니다(이미 1~6ng/μL 범위 내에 있지 않은 경우). 각 복제본은 PCR로 평가되었으며, 반응 혼합물당 하나의 복제본이 3개의 독립적인 IDH1 키트 로트를 사용하여 평가되었습니다.

로트 상호 호환성을 검증하기 위해 QIAamp DSP DNA Blood Mini 및 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 로트의 모든 조합에서 각 샘플의 각 표적에 대해 90% 이상의 정확한 판독률이 관찰되어야 했습니다.

모든 표적에서 90% 이상의 정확한 판독률이 관찰되었습니다. 100%(36/36)의 정확한 판독률을 얻었습니다. 이는 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit 및 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 로트 상호 호환성 요건을 충족했습니다.

13.1.9. 교차 오염/분석 캐리오버

이 연구의 목적은 IDH1 돌연변이 양성 샘플을 IDH1 돌연변이 음성(야생형)(wild type) 샘플과 인접하여 검사할 때 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 캐리오버를 평가하는 것이었습니다. 이 조사에서는 추출부터 PCR 증폭까지 전체 IDH1 시스템을 확인하여 샘플 간, 추출 그리고 실행 내 또는 실행 간에 캐리오버가 발생하였는지 조사하였습니다.

이 연구는 돌연변이 양성(R132C 또는 R132L) 및 야생형(wild type) BMA 시료를 사용하여 수행되었습니다. 두 개의 독립적인 샘플 세트를 샘플 교차 오염 위험을 도입하기 위해 고안된 사전 정의된 추출 기질을 따라 추출하였습니다.

6번의 추출물에 걸쳐 추출 교차 오염을 검사했고, 6번의 PCR 실행에 걸쳐 PCR 교차 오염을 검사했습니다. 이는 샘플 교차 오염의 위험을 도입하도록 설계된 실행 매트릭스에 따른 것입니다. 추출 및 PCR 실행은 동일한 작업자(독립적인 샘플 세트당 한 명의 작업자)가 동일한 장비를 사용하여 연속적으로 설정했으며, 이러한 실행 사이에 이 장비를 사용하여 다른 실행을 설정하지 않았으며 각 샘플 세트에 대해 별도의 장비를 사용했습니다. 이 연구 전반에 걸쳐 1개 로트의 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit와 1개 로트의 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit가 사용되었습니다.

총 144개의 야생형(wild type) 복제본을 검사한 결과, R132C 또는 R132L 돌연변이가 감지된 호출을 생성하는 야생형(wild type) 복제본은 없었습니다. 따라서 동일한 DNA 추출 및 실행 설정 절차를 공유하는 돌연변이 양성 샘플에 의한 야생형(wild type) 샘플의 교차 오염이 없음을 보여줍니다.

13.1.10. 시료 취급

이 연구에서는 QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit을 사용하여 DNA 추출 과정 중 샘플 취급 변동성을 평가했습니다. BMA 샘플은 3곳의 독립적인 실험실에서 테스트되었습니다. 3개 기관은 각각 샘플당 4개의 추출물(샘플 12개 - 두 샘플 유형 모두 IDH1 돌연변이 샘플 5개와 야생형(wild type) 샘플 1개)을 처리하여 총 144개의 개별 gDNA 추출물을 얻었습니다.

모든 샘플은 추출 전에 눈가림 처리되었습니다. 각 샘플은 각 기관에서 추출, 정량 및 정규화 과정을 거친 후, QIAGEN Manchester에서 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit를 사용하여 테스트되었습니다.

모든 돌연변이 및 WT 샘플에서 정확한 판독 비율은 100%였으며, 이는 DNA 추출의 분석 전 단계에서 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 재현성과 반복성을 입증합니다.

13.1.11. 간섭 물질(분석 특이도)

본 연구는 외인성 및 내인성 물질이 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 성능에 미치는 영향을 평가하는 것을 목적으로 하였습니다. 이 연구에는 각 간섭 물질과 결합된 골수 흡인물 및 돌연

변이 상태(야생형(wild type), R132H 및 R132G)에 대해 최소 9회의 반복 실험이 포함되었습니다.

DNA 추출 과정에 존재하는 외인성 물질은 DNA 추출 및 정규화 후 gDNA 용출액에 첨가하여 검사했습니다. 잠재적인 외인성 간섭 물질로 검사할 샘플은 샘플로 캐리오버될 간섭 물질의 가능한 최고 수준을 나타내는 농도로 스파이크되었습니다. 검사된 외인성 물질은 다음과 같습니다.

- K2-EDTA
- 용해 완충액
- QIAGEN Protease
- 에탄올
- Buffer AW1
- Buffer AW2

의약품 및 자연 발생 생물학적 물질을 포함한 내인성 물질을 DNA 추출 전 골수 흡인액 샘플에 첨가(spike)했습니다. 테스트 농도는 C_{max} 값(환자 샘플에서 예상되는 물질 농도의 3배) 또는 CLSI EP07-ED3 권장 사항을 기준으로 결정되었습니다. 검사된 내인성 물질은 다음과 같습니다.

- 시타라빈
- 데시타빈
- 에토포사이드
- 이다루비신 염산염
- 다우노루비신 염산염
- 아자시티딘
- 플루다라빈 인산염

- 헤모글로빈
- 비결합 빌리루빈
- 콜레스테롤
- 알부민
- 트리글리세라이드

최대 4개의 외인성 물질 또는 4개의 내인성 물질을 단일 용매를 사용하여 풀링하고, 스파이크된 샘플을 용매만의 대조 샘플과 비교했습니다. 필요한 경우, 간섭 효과가 나타난 풀의 개별 물질을 분리하여 검사했습니다.

시타라빈, 데시타빈, 에토포사이드, 이다루비신염산염, 다우노루비신염산염, 아자시티딘 및 트리글리세라이드는 DNA 투입량이 적은 샘플에서 샘플 유효성 비율을 잠재적으로 감소시킬 수 있는 것으로 나타났으나, 잘못된 결과를 초래하지는 않았습니다.

플루다라빈 인산염, 헤모글로빈, 비공액 빌리루빈, 콜레스테롤, 알부민 및 테스트된 모든 외인성 물질은 허용 기준을 충족하여 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 성능에 유의미한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났습니다.

13.2. 임상적 성능

13.2.1. 진단 민감도 및 특이성

새로 진단된 AML 환자(BMA 샘플 사용, 표 15)를 대상으로 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit (IDH1 Kit)를 차세대 염기서열 분석(NGS) 참조 검사인 Archer VariantPlex Core Myeloid 패널(ICON에서 검증)과 비교했습니다. 전체 진단 민감도는 98.48%(Clopper–Pearson (Exact) Binomial 95% 신뢰 구간(CI): (91.84%, 99.96%))였으며 진단 특이성은 100%(95% CI: (96.11%, 100%))였습니다(표 16).

표 15. 새로 진단된 AML에 대한 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 대 참조 검사(ICON NGS) – 모든 돌연변이에 대한 분석

빈도		참조 검사		
		IDH1 돌연변이 검출 됨	IDH1 돌연변이 검출 안 됨	총계
<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit	IDH1 돌연변이 검출 됨	65	0	65
	IDH1 돌연변이 검출 안 됨	1	93	94
	총계	66	93	159

표 16. 신규 진단된 AML에 대한 진단 민감도 및 특이성 – 모든 돌연변이에 대한 분석

	빈도	임상적 성능	양측 95% CI 하한	양측 95% CI 상한
진단 민감도	65/66	98.48	91.84	99.96
진단 특이성	93/93	100.00	96.11	100.00

임상적 성능 분석은 표 17 및 표 18에 제시된 바와 같이 돌연변이별로도 수행되었습니다.

표 17. *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit 대 신규 진단 AML에 대한 참조 검사(ICON NGS) - 돌연변이별 분석

		참조 검사							
빈도		돌연 변이 미검 출	R132C	R132G	R132H	R132H 및 R132C	R132L	R132S	총계
<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit	돌연변이 미검출	93	1	0	0	0	0	0	94
	R132C	0	39	0	0	0	0	0	39
	R132G	0	0	5	0	0	0	0	5
	R132H	0	0	0	16	0	0	0	16
	R132H 및 R132C	0	0	0	0	1	0	0	1
	R132L	0	0	0	0	0	1	0	1
	R132S	0	0	0	0	0	0	3	3
	총계	93	40	5	16	1	1	3	159

표 18. 신규 진단된 AML에 대한 진단 민감도 및 특이성 - 돌연변이별 분석

돌연변이	진단 민감도	양측 95% CI	진단 특이성	양측 95% CI
R132C	97.6%(40/41)	87.1%, 99.9%	100.00%(118/118)	96.92%, 100.00%
R132G	100.0% (5/5)	47.8%, 100.0%	100.00%(154/154)	97.63%, 100.00%
R132H	100.0% (17/17)	80.5%, 100.0%	100.00%(142/142)	97.44%, 100.00%
R132L	100.0% (1/1)	2.5%, 100.0%	100.00%(158/158)	97.69%, 100.00%
R132S	100.0% (3/3)	29.2%, 100.0%	100.00%(156/156)	97.66%, 100.00%

13.3. 새로 진단된 AML에서 아자시티딘과 병용한 TIBSOVO 치료 시 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit의 임상적 유용성/효능

AG120-C-009 임상 연구에서 선별된 피험자 중 Abbott RealTime IDH1 CTA 결과를 이용할 수 있는 대상자를 선정하여 Abbott 분석(CTA)과 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit(CDx) 간의 일치도를 평가했습니다. CTA 분석에 따라 IDH1 돌연변이 양성이고 연구 선정/제외 기준을 충족하는 잔여 샘플의 최대 수가 브리징 분석에 포함되었습니다.

2021년 3월 18일 데이터 컷오프 기준, 146명의 IDH1 돌연변이 양성 피험자(CTA 기준)가 확인되었으며, 이보시데닙(TIBSOVO) + 아자시티딘(N = 72) 또는 위약 + 아자시티딘(N = 74) 투여군으로 무작위 배정되었습니다.

이 전체 분석 대상군(FAS)에서 피험자는 다음과 같은 이유로 제외되었습니다.

- 임상시험 철회: 피험자 12명, 향후 검사에 대한 동의 거부: 피험자 8명
- 중국에서 수집된 샘플: 피험자 12명, 수출 제한으로 인해 제외됨
- 사용 가능한 잔여 샘플 없음: 피험자 2명

이러한 제외 절차 후, 112개의 샘플이 브리징 연구에 사용 가능한 상태로 남았습니다.

이 112개 샘플 중 111개는 CTA에서 IDH1 돌연변이 양성으로 확인되어 양성 브릿징 세트를 구성했습니다. 한 샘플은 로컬 테스트에 따라 무작위로 배정되었으며 CTA 음성이었기 때문에 음성 브릿징(Bridging) 샘플로 사용되었습니다. 2개의 샘플은 평가할 수 없었으며 추가로 2개의 샘플은 워크플로 외부에서 테스트되어 총 107개의 평가 가능한 샘플이 도출되었습니다.

또한, 음성 샘플 세트를 생성하기 위해 CTA 음성 피험자의 별도 하위 집합을 사용했습니다. 이보시데닙(TIBSOVO) 및 아자시티딘 병용 치료에 적합한 환자를 식별하기 위해 총 148개의 CTA 음성 샘플을 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit로 테스트할 수 있었습니다. 또한, AG120-C-009 임상 연구와 일치하는 무사건 생존율(EFS) 개선 및 기타 임상 결과에 나타난 바와 같이 IDH1 Kit을 사용한 임상적 효능을 확인하기 위함입니다.

브릿징 연구는 새로 진단받은 AML 환자의 잔여 BMA 시료를 사용한 비중재적, 후향적 분석이었습니다. 브릿징 연구의 주요 목적은 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit와 Abbott CTA 간의 일치도를 평가하고, 이보시데닙(TIBSOVO) 및 아자시티딘 병용 투여 치료에 적합한 환자를 식별하는 IDH1 Kit의 능력을 평가하는 것이었습니다. 또한 AG120-C-009 임상 연구와 일치하는 무사건 생존율(EFS) 개선 및 기타 임상 결과에서 나타난 바와 같이, *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit를 사용한 임상 효능을 확인하고자 하였습니다.

연구 모집단은 인구 통계, 질환 특성 및 샘플 유형 측면에서 대표성을 갖추었습니다. CDx 평가 가능 대상자와 평가 불가능 대상자 간에 유의미한 불균형은 관찰되지 않았습니다.

13.4. 임상적 일치도

임상 브릿징 연구 결과, 양성 일치율(PPA) 및 음성 일치율(NPA)이 사전 정의된 일치도 임계값인 $\geq 95\%$ 를 충족하여 *ipsogen* IDH1 RGQ PCR Kit와 Abbott CTA 간의 일치도가 입증되었습니다.

일치 결과는 다음과 같습니다.

- PPA: 95.33%(102/107; 95% CI: 89.43–98.47)
- NPA: 99.31%(144/145; 95% CI: 96.22–99.98)
- 전체 일치율(OPA): 97.62% (246/252; 95% CI: 94.89~99.12)

표 19. CTA를 참조 방법으로 사용한 IDH1 Kit(CDx)과 Abbott CTA 간의 일치도

CDx 돌연변이 상태		CTA 돌연변이 상태	
빈도	돌연변이 검출됨	돌연변이 검출되지 않음	총계
돌연변이 검출됨	102	1	103
돌연변이 검출되지 않음	5	144	149
총계	107	145	252

13.5. 임상적 효능

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit의 임상적 효능은 CDx를 통해 IDH1 돌연변이 양성으로 확인된 신규 진단 AML 환자의 치료 결과를 평가하여 분석되었습니다. 무사건 생존(EFS)을 포함한 이러한 결과는 Abbott RealTime IDH1 CTA를 사용하여 환자 선별을 수행한 AG120-C-009 연구에서 관찰된 임상적 효능과 비교되었습니다.

표 20에서는 임상 효능을 기준으로 한 AG120-C-009의 두 치료군에 대한 EFS를 보여주며, 표 21에서는 CDx 양성 결과를 기준으로 한 AG120-C-009의 두 치료군에 대한 EFS를 보여줍니다.

표 20. 임상시험 효능 무사건 생존율 결과(AG120-C-009)

	TIBSOVO + 아자시티딘(N = 72)	위약 + 아자시티딘(N = 74)
사건이 발생한 대상자 수(%)	46(63.9%)	62(83.8%)
EFS 비율(95% CI)		
1일	41.7%(30.2%, 52.7%)	20.3%(12.0%, 30.0%)
3개월	41.7%(30.2%, 52.7%)	20.3%(12.0%, 30.0%)
6개월	39.9%(28.6%, 51.0%)	20.3%(12.0%, 30.0%)
9개월	39.9%(28.6%, 51.0%)	20.3%(12.0%, 30.0%)
12개월	37.4%(25.9%, 48.9%)	12.2%(4.3%, 24.4%)
18개월	33.3%(20.9%, 46.2%)	6.1%(0.7%, 20.9%)
24개월	22.2%(6.6%, 43.4%)	0.0% [-, -] NE*
36개월	0.0% [-, -] NE	0.0% [-, -] NE*
위험비(위약 + 아자시티딘 대비)(층화)	0.33	
CI 하한	(0.16, 0.69)	
HR=1에 대한 P-값(단측)	0.0011	

* NE = 평가 불가.

표 21. 모집단 1에 대한 CDx 결과를 기반으로 한 전체 무사건 생존율 요약

	TIBSOVO + 아자시티딘(N = 50)	위약 + 아자시티딘(N = 52)
사건이 발생한 대상자 수(%)	32(64%)	46(88.5%)
이벤트가 없는 피험자(%) (중도 절단 됨)	18(36.0%)	6(11.5%)
EFS 비율(%) (95% CI)		
1 일	40.0%(26.5%, 53.1%)	13.5%(5.9%, 24.1%)
3개월	40.0%(26.5%, 53.1%)	13.5%(5.9%, 24.1%)
6개월	37.8%(24.5%, 51.0%)	13.5%(5.9%, 24.1%)
9개월	37.8%(24.5%, 51.0%)	13.5%(5.9%, 24.1%)
12개월	37.8%(24.5%, 51.0%)	9.0%(2.4%, 21.1%)
18개월	37.8%(24.5%, 51.0%)	9.0%(2.4%, 21.1%)
24개월	25.2%(7.4%, 48.2%)	0.0% [-, -] NE*
36개월	0.0% [-, -] NE	0.0% [-, -] NE*
위험비(위약+아자시티딘 대비)(층화)	0.438	
CI 하한	(0.254, 0.757)	
HR=1에 대한 p-값 (단측)	0.0016	

* NE = 평가 불가.

임상시험 효능 집단과 비교했을 때, CDx+ 피험자에서 치료군 간의 균등한 분할이 관찰되었으며, 임상시험 효능과 비교했을 때 군 간의 사건 발생 비율은 유사했습니다. 임상시험의 위험비(HR)는 0.33으로 통계적으로 유의미(0.0011)했고(표 20), CDx+ 집단에 대한 효능의 HR은 0.438로 통계적으로 유의미(0.0016)했습니다(표 21). CDx HR이 임상시험 효능보다 높지만, CTA 및 CDx HR이 모두 1 미만으로 치료 효과가 있음을 나타내며 두 수치 모두 통계적으로 유의미하므로 위약 대비 여전히 개선된 효과를 보입니다.

- CDx 양성 환자의 EFS 및 2차 평가지표는 주요 임상시험 결과와 일치했습니다.

ipsogen IDH1 RGQ PCR Kit는 임상시험 분석과 높은 일치도를 보였으며 표적 치료 대상인 ND AML 환자를 효과적으로 식별했습니다.

14. 참고 문헌

1. Dang, L., White, D. W., Gross, S., Bennett, B. D., Bittinger, M. A., Driggers, E. M., ... & Su, S. M. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274), 739-744.
2. Chowdhury, R., Yeoh, K. K., Tian, Y. M., Hillringhaus, L., Bagg, E. A., Rose, N. R., ... & Kawamura, A. (2011). The oncometabolite 2-hydroxyglutarate inhibits histone lysine demethylases. *EMBO reports*, 12(5), 463-469.
3. Pirozzi, C. J., & Yan, H. (2021). The implications of IDH mutations for cancer development and therapy. *Nature reviews Clinical oncology*, 18(10), 645-661.
4. Zarnegar-Lumley, S., Alonzo, T. A., Gerbing, R. B., Othus, M., Sun, Z., Ries, R. E., ... & Tarlock, K. (2023). Characteristics and prognostic impact of IDH mutations in AML: a COG, SWOG, and ECOG analysis. *Blood Advances*, 7(19), 5941-5953.
5. Bezerra, M. F., Larrazábal, B. R., Lima, A. S., Mello, M. R., Pimentel, R. F., Weinhäuser, I., ... & Lucena-Araujo, A. R. (2022). Screening for myeloid mutations in patients with myelodysplastic syndromes and AML with myelodysplasia-related changes. *Hematology, transfusion and cell therapy*, 44(3), 328-331.
6. DiNardo, C. D., Ravandi, F., Agresta, S., Konopleva, M., Takahashi, K., Kadia, T., ... & Kantarjian, H. (2015). Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. *American journal of hematology*, 90(8), 732-736.
7. Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC). (Wellcome Sanger Institute). COSMIC 데이터베이스. 접속 위치: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>
8. Kluk, M. J., Lindsley, R. C., Aster, J. C., Lindeman, N. I., Szeto, D., Hall, D., & Kuo, F. C. (2016). Validation and implementation of a custom next-generation sequencing clinical assay for hematologic malignancies. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 18(4), 507-515.

15. 문제 해결 가이드

이 문제 해결 가이드는 발생 가능한 문제를 해결하는 데 도움이 될 수 있습니다. 자세한 내용은 기술 지원 센터의 자주 묻는 질문(FAQ) 페이지(www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx)를 참조하십시오. QIAGEN 기술 지원팀의 전문가들은 본 안내서의 정보 및/또는 프로토콜 또는 시료 및 분석 기술에 관한 모든 질문에 성심껏 답변해 드립니다(연락처 정보는 www.qiagen.com 참조).

의견 및 제안

양성 대조물질(PC)의 “NO_CT_VALUE” 플래그

- | | |
|--|---|
| a. 잘못된 PCR 구성 | 피펫팅 계획을 점검하고 PCR을 반복합니다. |
| b. 하나 이상의 키트 구성품 보관 조건이 “시약 보관 및 취급” 섹션에 명시된 지침을 준수하지 않았습니다. | 시약의 보관 조건(키트 라벨 참조)을 확인하여 필요한 경우 새 키트를 사용합니다. |

NTC의 “UNEXPECTED_CT_VALUE” 플래그

- | | |
|----------------------|---|
| a. PCR 준비 중 오염이 발생했음 | 영역 오염이 제거되었음을 확인합니다. 새 시약으로 PCR을 반복합니다. 가능하면, 검사할 샘플을 추가한 후에 바로 PCR 튜브를 닫으십시오. 작업 공간과 기기의 오염을 정기적으로 제거해야 합니다. |
|----------------------|---|

PC의 “ABOVE_ACCEPTABLE_RANGE” 또는 “BELOW_ACCEPTABLE_RANGE” 플래그

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| a. PCR 준비 중 오류가 발생했음 | 정확한 피펫팅으로 PCR을 반복합니다. |
|----------------------|-----------------------|

샘플 튜브의 “DNA_INPUT_TOO_HIGH” 플래그

- | | |
|-----------------|--|
| a. 샘플 농도가 너무 높음 | DNA 정량화 및 정규화를 반복합니다. 샘플은 키트에 제공된 물(희석수[Dil.])을 사용하여 희석해야 합니다. |
|-----------------|--|

샘플 튜브의 “ABOVE_ACCEPTED_RANGE” 및 “NO_CT_VALUE” 플래그

- | | |
|------------------------------|---|
| a. 샘플 내 존재하는 시작 DNA 주형이 불충분함 | DNA 정량화 및 정규화를 반복합니다. 샘플은 키트에 제공된 물(희석수[Dil.])을 사용하여 희석해야 합니다. 재검사 후에도 대조군 Ct 값이 여전히 유효하지 않으면 샘플을 다시 추출하십시오. 재추출 및 두 차례의 추가 검사 후에도 대조군 Ct 값이 유효하지 않은 경우, 해당 샘플은 돌연변이 상태 불확정으로 보고해야 합니다. |
|------------------------------|---|

16. 기호

사용 설명서나 포장 및 라벨에 다음과 같은 기호가 있을 수 있습니다.

기호	기호 정의
	<N>회 반응에 충분한 시약 포함
	사용 기한
	체외 진단용 의료 기기
	카탈로그 번호
	로트 번호
	재료 번호(즉, 구성품 라벨)
	구성품
	내용물
	수
	국제 거래 단위 번호
	의료 기기 고유식별코드
Rn	R은 사용 지침의 개정 버전을 나타내며, n은 개정 번호임

기호

기호 정의



온도 제한



제조업체



사용 설명서 참고



직사광선을 피할 것

R_x Only

처방용 용도에 한함



경고/주의



건강상 위험



환경

17. 연락처 정보

기술 지원 및 자세한 정보는 support.qiagen.com에 있는 당사 기술 지원 센터를 참조하십시오.

18. 주문 정보

제품	목차	카탈로그 번호
<i>ipsogen</i> IDH1 RGQ PCR Kit	24회 반응용: IDH1 Reaction Mix 1(IDH1 반응 혼합물 1), IDH1 Reaction Mix 2(IDH1 반응 혼합물 2), IDH1 Positive Control (IDH1 양성 대조물질), Taq Polymerase(Taq 중합효소), Water for NTC(NTC용 물), Water for sample dilution(샘플 희석용 물)	675233
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit — 전혈 또는 골수 흡인물에서 유전체 DNA 정제용		
QIAamp DSP DNA Blood Mini Kit (50)	DNA 조제 50회분: QIAamp Mini Spin Columns 50개, QIAGEN Proteinase(QIAGEN 단백질 분해 효소), Buffers(완충액), Collection Tubes(2mL)(수집 튜브)	61104
Rotor-Gene Q MDx 및 액세서리		
Rotor-Gene Q MDx System	Real-time PCR cycler(사이클러)	9002036
Rotor-Gene Q MDx Platform	5개 채널(green, yellow, orange, red, crimson) 및 HRM 채널을 갖춘 Real-time PCR 사이클러 및 고해상도 용융 분석기, 노트북 컴퓨터, 소프트웨어, 액세서리. 다음 포함: 부품 및 공임에 대한 1년 보증, 설치 및 교육 미포함	9002035
Loading Block 72 × 0.1 mL Tubes (로딩 블록 72 × 0.1mL 튜브)	단일 채널 피펫을 사용하여 72 × 0.1mL 튜브에서 수동으로 반응을 준비하기 위한 알루미늄 블록 channel pipette in 72 × 0.1 mL tubes(72 × 0.1mL 튜브용 채널 피펫)	9018901
72-Well Rotor	Strip Tubes and Caps(스트립 튜브 및 캡) 고정용, 0.1mL, 반응 부피 10–50µL, Locking Ring 72 Well Rotor 필요	9018903
Locking Ring 72-Well Rotor	72-Well Rotor 내 잠금 Strip Tubes and Caps, 0.1mL의 경우	9018904
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	다음에 위한 4개 튜브 및 캡으로 구성된 250개 스트립 1,000회 반응	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10–50µL의 10,000회 반응용 4개 튜브 및 캡으로 구성된 10 × 250개 스트립	981106

최신 라이선스 정보 및 제품별 면책 사항은 각 QIAGEN 키트 사용 설명서를 참고하십시오.
QIAGEN 키트 사용 설명서는 www.qiagen.com에서 확인하거나 QIAGEN 기술 지원 또는 현지 대리점에 요청할 수 있습니다.

19. 문서 개정 이력

ipsogen® IDH1 RGQ PCR Kit에 대한 제한적 라이선스 계약

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

1. 이 제품은 제품과 함께 제공된 프로토콜과 본 사용 설명서에 따라 사용해야 하며, 패널에 포함된 구성품과만 함께 사용할 수 있습니다. QIAGEN은 제품과 함께 제공된 프로토콜 및 본 사용 설명서, www.qiagen.com에 제공된 추가 프로토콜에서 설명한 경우를 제외하고 지식 재산권에 따라 본 패널에 동봉된 구성품을 본 패널에 포함되지 않은 구성품과 통합하거나 사용하도록 라이선스를 부여하지 않습니다. 이러한 추가 프로토콜 중 일부는 QIAGEN 사용자를 위해 QIAGEN 사용자가 제공한 것입니다. 이러한 프로토콜은 QIAGEN에서 철저히 테스트하거나 최적화하지 않았습니다. QIAGEN은 이를 보장하지 않으며 제3자의 권리를 침해하지 않는다는 점을 보증하지도 않습니다.
2. 명시적으로 설명한 라이선스를 제외하고, QIAGEN은 이 패널 및/또는 이 패널의 사용이 제삼자의 권리를 침해하지 않음을 보증하지 않습니다.
3. 이 패널 및 구성품은 1회 사용에 대해 라이선스가 부여되며 재사용, 리퍼비시 또는 재판매할 수 없습니다.
4. QIAGEN은 명시적으로 설명한 경우 이외에 명시 또는 암시한 다른 라이선스는 명확히 부인합니다.
5. 패널의 구매자 및 사용자는 위에서 금지한 행위로 이어지거나 그러한 행위를 조장할 수 있는 조치를 취하거나 다른 사람이 그렇게 하도록 허용하지 않는다는 데 동의합니다. QIAGEN은 모든 법정에서 이 제한적 라이선스 계약의 금지를 시행할 수 있으며, 패널 및/또는 해당 구성품과 관련된 이 제한적 라이선스 계약 또는 지식 재산권을 행사하는 데 필요한 모든 조치에서 변호사 비용을 포함하여 모든 조사 및 법정 비용을 회수할 수 있습니다.

업데이트된 라이선스 약관은 www.qiagen.com을 참조하십시오.

상표: QIAGEN®, Sample to Insight®, ipsogen®, QIAcube®, Rotor-Gene®, QIAamp®, Rotor-Gene AssayManager®, HotStarTaq® (QIAGEN Group); TaqMan® (Roche Group), TIBSOVO® (Servier Pharmaceuticals LLC). 이 문서에 사용된 등록된 이름, 상표 등은 별도로 표시되지 않은 경우에도 법적 보호를 받는 것으로 간주해야 합니다.

2026/06 HB-3780-001 © 2026 QIAGEN, all rights reserved.

의도적으로 비워 둔 페이지입니다.

의도적으로 비워 둔 페이지입니다.

의도적으로 비워 둔 페이지입니다.