



2025년 10월

therascreen[®] KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침(안내서)



버전 1

IVD

체외 진단용

Rx ONLY 처방 전용

Rotor-Gene[®] Q MDx (US) 기기와 함께 사용

QIAamp[®] DSP DNA FFPE Tissue Kit와 함께 사용

REF 870021



QIAGEN, GmbH, QIAGEN Strasse 1, 40724 Hilden, 독일

R16

목차

- 용도 5
- 요약 및 설명 6
 - 절차의 원리 8
- 제공 품목 14
 - 키트 내용물 14
- 필요하지만 제공되지 않는 재료 15
- 경고 및 예방조치 17
 - 경고 17
 - 예방 조치 17
- 시약 보관 및 취급 20
- 시료 취급 및 보관 22
 - 시료 취급 22
 - 결장직장암 조직의 DNA 추출을 위한 조직 시료 준비 22
 - 비소세포폐암 조직의 DNA 추출을 위한 조직 시료 준비 23
 - 시료 보관 23
- 프로토콜: DNA 추출 24
 - 결장직장암 샘플을 위한 DNA 추출 24
 - 비소세포폐암 샘플을 위한 DNA 추출 25
- 프로토콜: DNA 샘플 평가 27
- 프로토콜: KRAS 돌연변이 검출 43
- 결과 해석 55
 - 분석 및 돌연변이 판정 55
 - Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package 플래그 56
 - 비소세포폐암 및 결장직장암 전용 플래그 56
 - 비소세포폐암 전용 플래그 58
 - 결장직장암 전용 플래그 60

문제 해결 가이드	63
품질 관리	64
금기 사항	64
제한 사항	64
CRC 시료의 성능 특징	66
분석 성능	66
컷오프	66
공백 한계	66
분석 표준 방법과의 비교	67
검출 한계(Limit of Detection, LOD)	70
투입 DNA의 영향	75
DNA 투입의 함수인 선형성/증폭 효율	76
돌연변이 비율에 따른 선형성/증폭 효율	78
간섭 물질	79
교차 오염	80
배타성/교차 반응성	81
반복성 및 재현성	83
샘플 처리 변동성	85
로트 상호 교환성	87
비소세포폐암 시료의 성능 특징	88
분석 성능	88
검출 한계(Limit of Detection, LOD)	88
세포주 상관 관계 연구	88
분석 표준 방법과의 비교	89
샘플 획득의 등가성	90
반복성 및 재현성	92
분석 정확도(임상 샘플 사용)	104
비특이적 증폭	105
투입 DNA의 영향	105
비특이적 증폭/교차 반응/배타성: 돌연변이 양성 KRAS DNA	107
샘플 처리 변동성	108
로트 상호 교환성	109
FFPE 절편의 안정성	110
간섭 물질	110

보호대역 연구	111
임상적 성능	114
Erbix(세톡시맵)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구	114
Vectibix(파니투무맵)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구	116
비소세포페암에 대한 LUMAKRAS(소토라십)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구	119
비소세포페암에 대한 Krazati(아다그라시브)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구	121
직장결장암에 대한 Krazati(아다그라시브)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구	123
CRC에 대한 파니투무맵 병용 LUMAKRAS(소토라십)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구	125
참고 문헌	128
기호	131
연락처 정보	132
부록: Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package의 설치	133
주문 정보	136
문서 개정 이력	138

용도

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

표 1. 동반 진단 적응증

적응증	생체표지자	요법
결장직장암(Colorectal Cancer, CRC)	<i>KRAS</i> 야생형(코돈 12 및 13에 돌연변이 없음)	Erbix [®] (세특시맵) Vectibix [®] (파니투무맵)
결장직장암(Colorectal Cancer, CRC)	<i>KRAS</i> G12C	Krazati [®] (아다그라시브) 및 Erbix [®] (세특시맵) 병용
결장직장암(Colorectal Cancer, CRC)	<i>KRAS</i> G12C	Vectibix [®] (파니투무맵) 및 LUMAKRAS [™] (소토라십) 병용
비소세포 폐암(NSCLC)	<i>KRAS</i> G12C	LUMAKRAS(소토라십) 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 약 40%의 mCRC 사례에 존재합니다(14).

KRAS G12C 돌연변이는 특히 아미노산 위치 12의 글리신 잔류물을 시스테인 잔류물로 대체하는 *KRAS* 단백질 형태의 발현을 초래합니다.

- 비소세포폐암 환자에서 이는 표적 *KRAS* 억제제 LUMAKRAS™(소토라십) 또는 Krazati®(아다그라시브)를 사용한 치료에 적합할 가능성을 나타냅니다. 이 돌연변이는 비소세포폐암 사례의 약 13%에 존재할 것으로 추정됩니다(15).
- CRC 환자의 경우 이는 Vectibix(파니투마뎀)과 병용한 표적 *KRAS* 억제제 LUMAKRAS(소토라십) 또는 Erbitux(세록시맵)과 병용한 Krazati(아다그라시브) 치료를 받을 수 있는 잠재적 자격을 나타냅니다. 이 돌연변이는 CRC 사례의 약 3%에 존재할 것으로 추정됩니다(16).

Scorpions®(17)와 ARMS(Allele Refractory Mutation System) 기술(18, 19)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(20).

표 2. 돌연변이 및 COSMIC 개체 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 ID는 공공 데이터베이스인 Catalog of Somatic Mutations in Cancer에서 가져온 것입니다
(www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic)

절차의 원리

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

돌연변이 반응 혼합물

각 반응 혼합물은 돌연변이 특이적 증폭 불응 돌연변이 시스템(Amplification Refractory Mutation System, ARMS) 프라이머를 사용하여 돌연변이 된 DNA를 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 ARMS에 의해 달성됩니다. 프라이머가 완전히 일치할 경우 최상의 효율로 증폭이 진행됩니다. 3' 염기가 일치하지 않으면 낮은 수준의 배경 증폭 곡선만 발생할 수 있습니다. 그러므로 돌연변이 된 염기 서열은 대다수의 DNA가 돌연변이를 갖고 있지 않은 샘플에서도 선택적으로 증폭됩니다.

Scorpions

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

대조 반응액

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

내부 대조물질

8개의 반응 혼합물 각각은 반응의 실패(예: 억제제의 존재로 인해)를 검출할 수 있도록 설계된 내부 대조물질을 포함합니다. 내부 대조물질을 대조물질 및 돌연변이 반응에서 FAM 표지 Scorpions와 구별하기 위해, 내부 대조물질은 KRAS와 관련되지 않은 올리고뉴클레오타이드 표적 서열, 비표지 프라이머 및 핵사클로로플루오레세인(HEX™)으로 표지된 Scorpions 프라이머를 사용합니다.

양성 대조물질

therascreen KRAS RGQ PCR Kit는 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 Kit에는 '템플릿 없는 대조물질' 반응을 위해 사용되는 템플릿 없는 대조물질을 위한 탈핵산분해효소(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 Kit에서 사용하는 중합효소 연쇄 반응을 위한 효소입니다.

플랫폼 및 소프트웨어

therascreen KRAS RGQ PCR Kit는 www.qiagen.com에서 다운로드할 수 있는 *therascreen* KRAS Assay Package가 설치된 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기에서 사용할 수 있도록 고안되었습니다.

- 호환되는 RGQ 소프트웨어와 *therascreen* KRAS Assay Package 버전에 관해서는 '필요하지만 제공되지 않는 재료' 페이지의 15을 참고하십시오.
- 기기에 관한 사항은 기기 사용 설명서를 참고하십시오.
- 대조물질 및 샘플에 대한 플래그를 최소화하려면 설치 절차와 장소적 요건에 따라 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기를 배치할 때 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침 지침을 엄격하게 준수해야 합니다.
- '부록: Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package의 설치' 페이지의 133 설치를 참고하여 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 설치 지침을 확인하십시오.

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 Package를 사용하여 다양한 주기 매개변수 또는 '실행'을 위해 프로그래밍됩니다. *therascreen* KRAS Assay Package는 다음 두 개의 템플릿으로 구성되어 있습니다.

- *therascreen* KRAS QC 잠금 템플릿(DNA 샘플 평가용)
- *therascreen* KRAS 잠금 템플릿(KRAS 돌연변이 검출용)

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

1. 95°C에서 15분간 유지하여 Taq DNA 중합효소를 활성화시킵니다.
2. 95°C에서 30초간 40주기의 PCR을 실시하여 변성시키고, 60°C에서 1분간 결합 및 신장시킵니다.

특정 반응의 형광성이 *therascreen* KRAS Assay Package에 의해 주어진 사전 정의된 임계값을 교차할 때의 PCR 주기가 C_T 값으로 정의됩니다.

DNA 샘플을 평가하기 위한 대조 반응을 사용하면 샘플이 분석에 적합한 수준의 DNA를 포함하고 있으며, 분석 전에 어떤 샘플이 희석이 필요한지를 얻어진 C_T 값에 기초하여 결정하는 것이 가능합니다.

다양한 돌연변이 반응 혼합물로 샘플을 평가하여 각 C_T 값을 결정하면 *therascreen* KRAS Assay Package 소프트웨어에서 다음 식을 사용하여 샘플의 ΔC_T 값을 결정하기 위한 계산을 수행할 수 있습니다.

$$\Delta C_T = [\text{돌연변이 분석항목 } C_T \text{ 값}] - [\text{대조 분석항목 } C_T \text{ 값}]$$

미리 결정된 분석 C_T 및 ΔC_T 값에 기초하여 Rotor-Gene Q 소프트웨어는 DNA 샘플의 돌연변이 상태를 정성적으로 결정하고, 어떤 샘플이 어떤 돌연변이를 포함하고 있는지 보고합니다.*

*드물게, 한 개의 중앙에 둘 이상의 돌연변이가 포함되어 있을 수 있습니다. 그러한 경우, 최저 ΔC_T 값을 산출하는 돌연변이가 식별됩니다.

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 RNA를 포함하고 있습니다.

표 3. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에서 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 2개 x 600 µL
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 1개 x 600 µL
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 1개 x 600 µL
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 1개 x 600 µL
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 1개 x 600 µL
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 1개 x 600 µL

표 3. theascreen KRAS RGQ PCR Kit에서 공급되는 시약 (계속)

시약	성분	수량
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 1개 x 600 µL
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 1개 x 600 µL
KRAS 양성 대조물질	대조 템플릿, 12ALA 템플릿, 12ASP 템플릿, 12ARG 템플릿, 12CYS 템플릿, 12SER 템플릿, 12VAL 템플릿, 13ASP 템플릿, Poly A RNA, Tris EDTA 완충액	튜브 1개 x 250 µL
Taq DNA 중합효소	Taq DNA 중합효소: 50% 글리세롤/물	튜브 1개 x 80 µL
템플릿 없는 대조물질	탈핵산분해효소수	튜브 1개 x 1.9 mL
템플릿 희석용	탈핵산분해효소수	튜브 1개 x 1.9 mL

제공 품목

키트 내용물

<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit (24)				
카탈로그 번호 870021				
준비 수 24				
색상	ID	튜브 식별		용량
빨간색	대조 반응 혼합물	1	CTRL	2 x 600 µL
보라색	12ALA 반응 혼합물	2	12ALA	600 µL
주황색	12ASP 반응 혼합물	3	12ASP	600 µL
분홍색	12ARG 반응 혼합물	4	12ARG	600 µL
초록색	12CYS 반응 혼합물	5	12CYS	600 µL
노란색	12SER 반응 혼합물	6	12SER	600 µL
회색	12VAL 반응 혼합물	7	12VAL	600 µL
파란색	13ASP 반응 혼합물	8	13ASP	600 µL
베이지색	KRAS 양성 대조물질	9	PC	250 µL
박하색	<i>Taq</i> DNA 중합효소		<i>Taq</i>	80 µL
흰색	템플릿 없는 대조를 위한 탈핵산분해효소수		NTC	1.9 mL
흰색	희석용 탈핵산분해효소수		Dil.	1.9 mL

필요하지만 제공되지 않는 재료

화학 물질을 취급할 때는 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑, 보안경을 착용하십시오. 자세한 내용은 제품 공급업체에서 구할 수 있는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참조해 주십시오.

제조업체 권고사항에 따라 기기를 점검 및 교정했음을 확인합니다.

- 새로운 메스, 면도날 또는 이와 유사한 날카로운 칼날이 있는 도구
- 0.1 mL Strip Tubes and Caps, 72-Well Rotor와 함께 사용(QIAGEN, 카탈로그 번호 981103 또는 981106)
- 마스터 혼합물 준비용 탈핵산분해효소 마이크로 원심분리기 튜브
- 에어로졸 막이 있는 멸균 피펫 팁
- 유성펜
- 72-Well Rotor를 사용하는 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기(QIAGEN, 카탈로그 번호 9002035)
- *therascreen* KRAS Assay Package CD 버전 3.1.1을 포함하는 Rotor-Gene Q Software 버전 2.3.1 이상(QIAGEN, 카탈로그 번호 9023818)

참고: Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package는 소프트웨어 버전 2.3.1 이상과 함께 사용해야 합니다.

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)
- 샘플 준비 전용 피펫(조절식)

- PCR 마스터 혼합물 준비 전용 피펫(조절식)
- 템플릿 DNA 분주 전용 피펫(조절식)
- 56°C, 70°C, 90°C에서 배양 가능한, 열교반기, 가열 회전 배양기, 가열 블록 또는 수조
- 1.5 mL 튜브용 로터 포함 실험대용 원심분리기
- 실험대 교반기
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN, 카탈로그 번호 60404, '프로토콜: DNA 추출' 페이지의 24 참고)

경고 및 예방조치

경고

체외 진단용

처방 전용

Rotor-Gene Q MDx (US) 기기와 함께 사용

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit와 함께 사용함

화학물질로 작업할 때는 항상 적합한 실험용 가운, 일회용 장갑 및 보안경을 착용하십시오. 자세한 정보는 적절한 안전보건자료(Safety Data Sheet, SDS)를 참고하시기 바랍니다. 이러한 자료는 www.qiagen.com/safety에서 편집한 PDF로 온라인으로 제공되며, 해당 페이지에서 각 QIAGEN 키트 및 키트 구성품에 대한 SDS를 검색하여 보고 인쇄할 수 있습니다.

예방 조치

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

- 이 테스트는 포르말린 고정 파라핀 포매 조직 시료에 사용하기 위한 것입니다.
- 모든 화학 물질과 생물학적 물질은 잠재적으로 위험합니다. 시료 및 샘플은 감염 가능성이 있으며 생물학적 유해물질로 취급해야 합니다.
- 샘플 및 분석 폐기물은 현지 안전 절차에 따라 폐기하십시오.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit용 시약은 최적의 상태로 희석되었습니다. 시약을 추가로 희석하면 성능 저하를 야기할 수 있으므로 추가로 희석하지 마십시오. 25 µl 미만 부피의

반응액(반응 혼합물 + 샘플)을 사용하지 마십시오.

- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 모든 시약은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에서 제공하는 검사에 함께 사용하기 위해 특별히 조제되었습니다.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에 제공되는 모든 시약은 동일한 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에 제공되는 다른 시약과만 함께 사용해야 합니다. 성능에 영향을 줄 수 있으므로 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 내에서 또는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 간에 시약을 대체하지 마십시오.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에 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, 예방 조치 및 절차는 *Rotor-Gene Q MDx (US) 사용 설명서*를 참고하십시오.
- 유효 기간이 만료되거나 부적절하게 보관된 구성품은 사용하지 마십시오.
- 대조군 및 샘플에 대한 플래그를 최소화하려면, 다음을 포함하지만 이에 국한되지 않는 *therascreen KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침*을 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 샘플 혼입, 로딩 오류 및 피펫팅 오류에 특히 주의하여 정확한 샘플 검사가 이루어지도록 신중해야 합니다.

다음과 같은 위험 및 예방조치 관련 문장은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 구성요소에 적용됩니다.

Taq DNA 중합효소

내용물: 에톡실화 노닐페놀. 장기적인 영향으로 수생생물에게 유해합니다. 환경에 방출되지 않게 하십시오. 보호용 장갑/보호복/보안경/얼굴 보호대를 착용하십시오. 내용물/용기를 승인된 폐기물 처리 시설에 폐기합니다.

시약 보관 및 취급

therascreen KRAS RGQ PCR Kit는 드라이아이스에 얹은 상태로 운송되며, 도착 시 동결 상태여야 합니다. 도착 시, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 구성품이 동결된 상태가 아니거나 운송 중에 외부 포장에 개봉되었거나 배송물에 포장 명세서, 사용 지침 또는 시약이 들어 있지 않으면 QIAGEN 기술 서비스 부서 또는 현지 유통업체로 문의하십시오(www.qiagen.com 방문).

therascreen KRAS RGQ PCR Kit는 수령하는 즉시 -30°C ~ -15°C 의 항온 냉동고에 차광 보관해야 합니다. 지정된 보관 조건에서 보관하는 경우 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit는 명시된 유통 기한까지 안정적입니다.

일단 개봉한 시약은 원래 포장재에 넣은 상태로 -30°C ~ -15°C 에서 12개월간 또는 포장재에 표시된 유통 기한까지 보관할 수 있습니다. 해동과 동결을 반복해서는 안 됩니다. 최대 6회의 동결-해동 사이클을 초과하지 마십시오.

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

- 실온에서 보관 시 7시간

참고: 이 시간에는 PCR 설정 및 보관 시간이 모두 포함됩니다.

- 냉장고(2°C ~ 8°C)에서 보관 시 18시간

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 Kit의 시약은 최적으로 희석되어 있으므로 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 사용 지침(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 만료되거나 부적절하게 보관된 구성품은 사용하지 마십시오.

시료 취급 및 보관

시료 취급

therascreen KRAS RGQ PCR Kit는 결장직장암 또는 비소세포폐암 환자의 FFPE 종양 조직에서 추출한 DNA 샘플에 사용하기 위한 것입니다. 종양은 유전자형과 표현형 모두에서 이질성입니다. 돌연변이 양성 종양은 야생형 DNA를 포함할 수 있으며, 마찬가지로 조직학적으로 비종양 조직의 영역을 나타낼 수 있습니다. 모든 조직 샘플은 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 μm 의 연속 절편을 잘라내어 유리 슬라이드에 고정합니다.
- 종양 함량 및 면적 결정을 위해서는 훈련된 사람(예: 병리학자)이 헤마톡실린 & 에오신(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. 종양조직이 아닌 것을 폐기하십시오.
- 면적이 <4 mm^2 인 절편의 경우, 두 개 이상의 절편을 처리하여 총 종양 면적을 최소 4 mm^2 로 증가시킵니다(육안 절제를 하든 하지 않든 모든 샘플에 적용). 거시절제술을 시행한 경우 종양조직이 아닌 것을 폐기하십시오.
- 새로운 메스, 면도날 또는 이와 유사한 날카로운 칼날이 있는 도구를 사용하여 조직에서 과도한 파라핀을 긁어내십시오.

참고: 건조를 마친 메스, 면도날 또는 이와 유사한 날카로운 칼날이 있는 도구를 사용하십시오. 기류식 후드 또는 흠 후드에서 이 단계를 수행하지 마십시오.

- 각 샘플에서 새로운 메스, 면도날 또는 이와 유사한 날카로운 칼날이 있는 도구를 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% NBF에 고정하고 조직 시료를 파라핀에 포매합니다. 박절기를 사용하여 파라핀 블록에서 5 μm 의 연속 절편을 잘라내어 슬라이드에 고정합니다.
- 훈련받은 사람(예: 병리학자)이 H&E 염색 절편을 평가하여 종양이 존재하는지 확인해야 합니다. DNA 추출을 위해 연속 절편을 사용합니다.
- 새로운 메스, 면도날 또는 이와 유사한 날카로운 칼날이 있는 도구를 사용하여 조직에서 과도한 파라핀을 긁어내십시오.
- 현지 절차에 따라 통제된 방식으로 추출할 준비가 된 종양 시료, 블록, 슬라이드, 샘플 및 마이크로 원심분리기 튜브에 표지를 붙이고, 취급 및 보관합니다.

시료 보관

결장직장암 FFPE 블록과 슬라이드는 실온에서 보관하십시오. 슬라이드는 DNA 추출 전에 어두운 곳에서 주변 온도로 최대 4주간 보관할 수 있습니다.

비소세포폐암 FFPE 블록과 슬라이드는 실온의 어두운 곳에 보관하십시오. 비소세포폐암 절제 및 중심부 바늘 생검 슬라이드는 DNA 추출 전에 실온에서 최대 70주간 보관할 수 있습니다. 비소세포폐암 미세 흡인 슬라이드는 DNA 추출 전에 실온에서 최대 56주간 보관할 수 있습니다.

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

프로토콜: DNA 추출

결장직장암 샘플을 위한 DNA 추출

FFPE 결장직장암 시료로 제조된 샘플의 유전체 DNA를 정제하기 위한 아래에 설명된 프로토콜을 수정하여 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN, 카탈로그 번호 60404)를 사용하십시오.

참고: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit는 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit를 사용하여 추출된 DNA를 사용하여 검증되었습니다. 다른 DNA 추출 제품을 사용하지 마십시오.

QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서에 나와 있는 지침에 따라 다음에 유의하여 DNA 추출을 수행하십시오.

- DNA 추출에 앞서 시료를 준비하려면 *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* 안내서를 사용 지침을 참조하십시오.
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit는 수동으로만 사용해야 합니다. *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* 안내서에 설명되어 있는 QIAcube®를 위한 자동화된 프로토콜을 사용하지 마십시오.
- *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit* 사용 지침에 설명된 파라핀 제거를 위한 자일렌/에탄올 방법만 사용하십시오.
- 모든 필수 단계에는 분자생물학 등급 에탄올을 사용하십시오.*
- 추출 당 1 x 5 µm 절편을 사용합니다(절편에 ≤20%의 종양 함량 또는 절편이 부위 내 <4 mm²인 경우 제외; '결장직장암 조직의 DNA 추출을 위한 조직 시료 준비' 페이지의 22 참조).

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

- 단백질분해효소 K 분해법(QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 사용 지침에 설명된 대로)은 1 시간 동안 수행되어야 합니다.
- 샘플은 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit의 200 µL 용출 완충액(Buffer ATE)을 사용하여 용출해야 합니다.

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

비소세포폐암 샘플을 위한 DNA 추출

FFPE 비소세포폐암 시료로 제조된 샘플의 유전체 DNA를 정제하기 위한 아래에 설명된 프로토콜을 수정하여 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN, 카탈로그 번호 60404)를 사용하십시오.

참고: *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit는 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit를 사용하여 추출된 DNA를 사용하여 검증되었습니다. 다른 DNA 추출 제품을 사용하지 마십시오.

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

- 추출당 2 x 5 µm 절편을 사용합니다.
- QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit는 수동으로만 사용해야 합니다. *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 안내서*에 설명되어 있는 QIAcube를 위한 자동화된 프로토콜을 사용하지 마십시오.
- *QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 사용 지침*에 설명된 파라핀 제거를 위한 자일렌/에탄올 방법만 사용하십시오.
- 단백질분해효소 K 분해법(*QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit 사용 지침*에 설명된 대로)은 1시간 동안 수행되어야 합니다.

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

프로토콜: DNA 샘플 평가

이 프로토콜은 샘플 내 증폭 가능한 총 DNA를 평가하는 데 사용됩니다.

시작 전 중요 사항

참고: 샘플 내 총 증폭 가능 DNA만 대조 반응을 사용하여 평가하므로 DNA 샘플 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 DNA는 프라이머가 짧은 DNA 단편을 생성하더라도 증폭되지 않을 수 있습니다.

- 사용 가능한 대조 반응 혼합물을 사용하여 최대 24개의 샘플을 평가할 수 있습니다.
- 테스트 전에 대조 반응 혼합물(튜브 CTRL)을 사용하여 DNA를 평가하십시오.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 시약을 효율적으로 사용하려면 가능한 한 DNA 샘플을 배치로 구성하여 완전히 채워진 실행을 만드십시오. 샘플을 개별적으로 또는 적은 수량으로 테스트하면 시약이 더 많이 사용되고 한 개의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 테스트할 수 있는 전체 샘플의 수량이 줄어듭니다.
- *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*) 또는 *Taq* DNA 중합효소가 들어 있는 혼합물을 흔들지 마십시오. 그렇게 하면 효소가 불활성화될 수 있습니다.
- 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 지침 사용 지침을 엄격하게 준수하고, 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 Package가 설치되었는지 확인하십시오(페이지의 '부록: Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package의 설치' 페이지의 133 참고).
- 각 사용 전에 모든 시약을 실온(15~25°C)에서 최소 1시간 동안 완전히 해동하고, 10회 거꾸로 하여 혼합한 후, 짧게 원심 분리하여 튜브 바닥의 내용물을 채집합니다. 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 원심 분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.
- 모든 샘플을 완전히 해동한 다음 10회 뒤집어서 혼합했고, 튜브 바닥에 있는 내용물을 수집하기 위해 짧게 원심분리했는지 확인하십시오.

절차

1. 대조 반응 혼합물(튜브 CTRL), 템플릿 없는 대조물질(No Template Control, NTC)를 위한 탈핵산분해효소수, KRAS 양성 대조물질(Positive Control, PC)을 실온(15~25°C)에서 최소 1시간 동안 완전히 해동합니다.

실행 시작 전 시약 해동, PCR 설정 및 보관 시간은 에 기재되어 있습니다.

표 4. 해동 시간, PCR 설정 시간 및 보관 온도

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

참고: PCR 설정은 실온에서 수행됩니다. '보관'이라는 용어는 PCR 설정 완료 시점부터 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' 페이지의 20). 튜브를 짧게 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.

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

참고: 샘플을 10번 뒤집어서 섞은 다음 잠깐 원심분리해서 샘플 튜브 바닥에 있는 내용물을 모읍니다.

참고: 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.

3. 표 5에 있는 용량에 따라 DNA 샘플을 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 1개의 추가 샘플에 대한 시약을 포함시킵니다. 대조 분석 마스터 혼합물에는 대조 또는 샘플을 제외하고 PCR에 필요한 모든 구성 요소가 포함되어 있습니다.

표 5. 대조물질 분석 마스터 혼합물 준비

대조물질 분석 마스터 혼합물 구성품	마스터 혼합물에 필요한 용량
대조 반응 혼합물(튜브 CTRL)	19.76 μL x (n+1)*
Taq DNA 중합효소(튜브 Taq)	0.24 μL x (n+1)*
총용량	반응당 20 μL

* n = 반응액 수(샘플 + 대조군).

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

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

- 표 6의 배치에 따라 적절한 수의 PCR 4-스트립 튜브(각 스트립에 4개의 튜브)를 로딩 블록에 배치합니다. 번호는 로딩 블록 내 위치를 표시하며 최종 로터 위치를 나타냅니다. 튜브의 캡을 닫지 마십시오.

참고: 캡은 필요할 때까지 플라스틱 용기에 남겨 두십시오.

표 6. DNA 샘플 평가를 위한 로딩 블록의 실행 배치도

분석									
대조물질	1(Positive Control, 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 마스터 혼합물 용량보다 적은 용량으로 설정하고 위아래로 10회 완전 흡인하여 완전히 혼합합니다.

참고: 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.

6. 각 PCR 스트립 튜브에 20 μ L의 대조 분석 마스터 혼합물을 즉시 추가합니다. 튜브 배치는 표 6를 참조하십시오.

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

7. 템플릿 없는 대조 물질(No Template Control, NTC)를 위한 5 μ L의 탈핵산분해효소수를 NTC 튜브(튜브 위치 2)에 즉시 첨가하고 튜브 캡을 닫습니다.
8. 샘플 튜브(튜브 위치 3~26)에 각 DNA 샘플 5 μ L를 추가하고 튜브 캡을 닫습니다.
9. 5 μ L의 KRAS 양성 대조물질(Positive Control, PC)을 PC 튜브(튜브 위치 1)에 추가하고 튜브 캡을 닫습니다.

각 튜브에는 총 25 μ L의 반응물 용량(20 μ L의 대조 분석항목 마스터 혼합물 + 5 μ L의 NTC/샘플/PC)이 들어 있어야 합니다.

10. 영구 마커로 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 Rotor에 로드되는 방향을 표시합니다.

11. 캡을 덮은 튜브를 4회 뒤집어 샘플과 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 Rotor의 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 Rotor를 배치합니다. 잠금 링(Rotor-Gene Q MDx (US) 기기와 함께 공급됨)을 로터 상단에 설치하여 실행 중 튜브를 고정시킵니다.
14. Rotor- Gene Q MDx (US) 기기에 연결된 노트북의 화면에서 **therascreen KRAS QC Locked Template**(therascreen KRAS QC 잠금 템플릿) 아이콘을 더블 클릭하여 Rotor-Gene Q 소프트웨어를 시작하는 동시에 템플릿을 엽니다.



그림 1. *therascreen* KRAS QC 잠금 템플릿.

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.

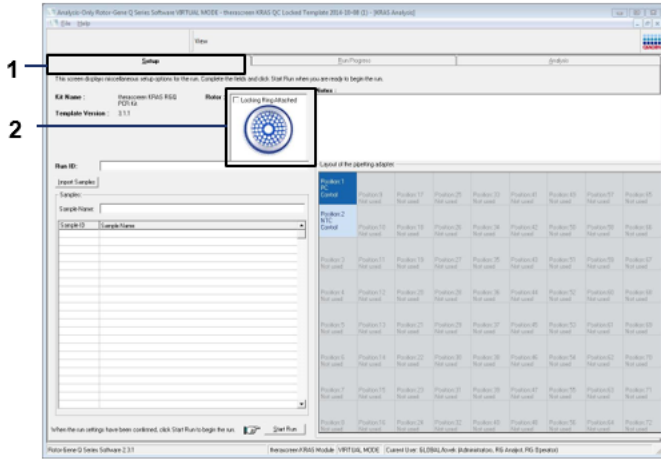
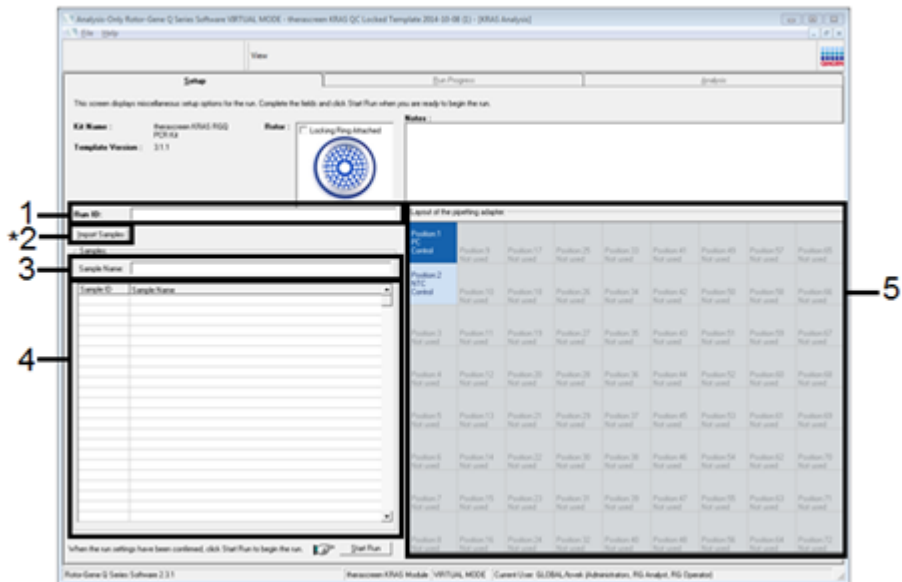


그림 2. Setup(설정) 탭 및 Locking Ring Attached(잠금 링 부착됨) 상자. 1 = Setup(설정) 탭, 2 = Locking Ring Attached(잠금 링 부착됨) 상자.

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



17. 현지 명명 규칙에 따라 **Sample Name**(샘플 이름) 필드(3) 에 샘플 이름을 입력하고 **리턴** 키를 누릅니다.

이렇게 하면 샘플 이름이 아래의 샘플 목록(4)에 추가되고, 샘플에 **Sample ID**(샘플 ID)(1, 2, 3 등)가 할당됩니다. 또한 오른쪽에 있는 **Layout of the pipetting adapter**(피펫팅 어댑터 배치)(5) 패널 도 업데이트되어 샘플 이름이 포함됩니다.

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

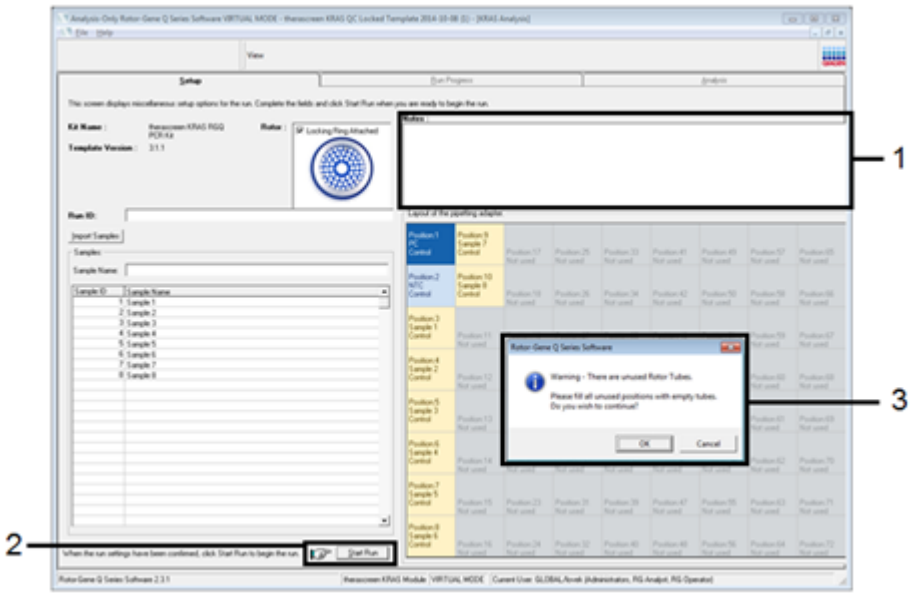
참고: **Layout of the pipetting adapter**(피펫팅 어댑터 배치) 패널에 추가한 샘플 이름이 색깔이 바뀌며 강조 표시되고, 샘플 이름이 샘플 위치에 있는지 확인하십시오.

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

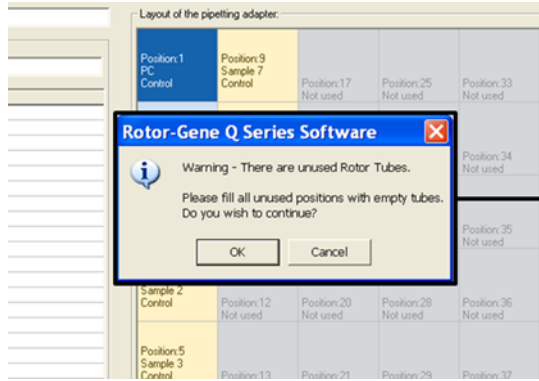
18. 17단계를 반복하여 모든 추가 샘플의 이름을 입력하십시오.

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

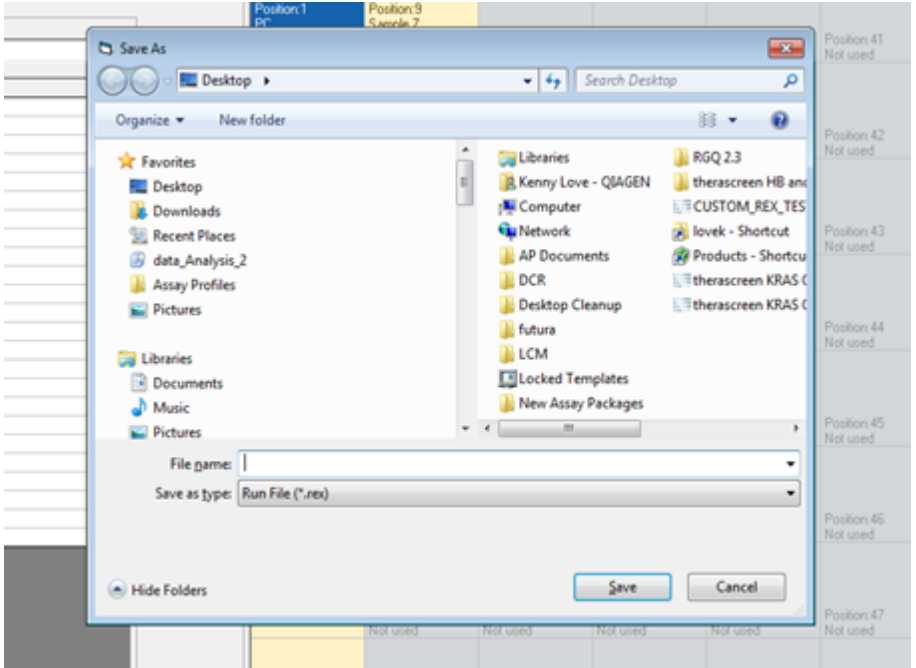
19. 모든 샘플 이름을 입력한 후 이름이 정확한지 확인합니다. 필요하다면 **Notes**(참고) 필드(1)에 추가 정보를 추가하고, **Start Run**(실행 시작)(2)을 클릭합니다.



참고: 사용되지 않는 로터 위치가 있을 경우 경고 메시지가 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.

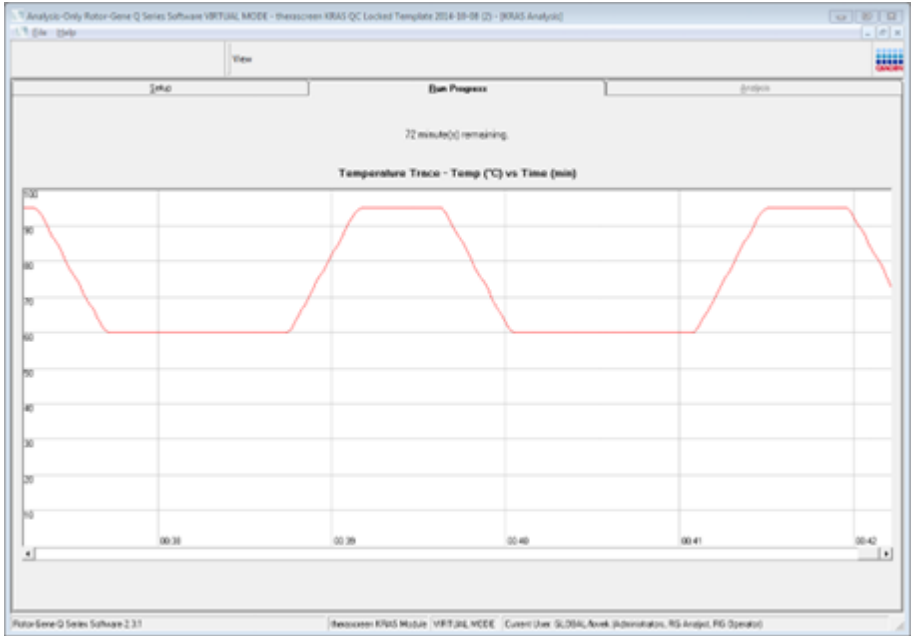


20. Save As(다른 이름으로 저장) 창이 열립니다. 적절한 파일명을 선택한 다음 선택한 위치에 PCR 실행을 *.rex 실행 파일로 저장합니다. **Save(저장)**를 클릭합니다.



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 - therascreen KRAS QC Locked Template 2014-09-08 (3) - KRAS Analysis

File Help

Setup View Run-Programs Analysis

Export

QC Sample Result Table:

Tube ID	Sample Name	Control Area (Ct)	Pass/Fail (%)	Status
1	PC Control	27.48	-	Valid
2	NTC Control	-	-	Valid
3	Sample 1	27.48	-	Valid
4	Sample 2	27.69	-	Valid
5	Sample 3	29.36	-	Valid
6	Sample 4	29.36	-	Valid
7	Sample 5	30.94	-	Valid
8	Sample 6	30.16	-	Valid
9	Sample 7	27.69	-	Valid
10	Sample 8	29.36	-	Valid

Rotor-Gene Q Series Software 2.3.1

therascreen KRAS Module VIRTUAL MODE Control User: EUCBR/Power Administration, RS Analyst, RS Operator

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

- 대조균을 실행합니다(PC 대조 및 NTC 대조, 각각 튜브 위치 1과 2).
결과가 허용 범위 이내이면 각각은 'Valid'(유효) 상태로 표시됩니다.
결과가 허용 범위 이내가 아니면 'Invalid'(무효) 결과가 표시됩니다.
- 샘플 대조 반응 C_T 값이 >32.00 이면, 'Invalid'(무효) 결과가 표시됩니다.

DNA의 양이 돌연변이 분석에 충분하지 않습니다.

샘플을 재검사합니다. DNA의 양이 아직 충분하지 않으면 가능한 경우 증양 조직을 더 추출하십시오(참고: 'Rotor-Gene Q therascreen KRAS Assay Package 플래그' 페이지의 56 및 '문제 해결 가이드' 페이지의 63).

- 샘플 대조 반응 C_T 값이 <21.92면, 'Invalid'(무효) 결과가 표시됩니다.

DNA 농도가 돌연변이 분석을 하기에 너무 높습니다.

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

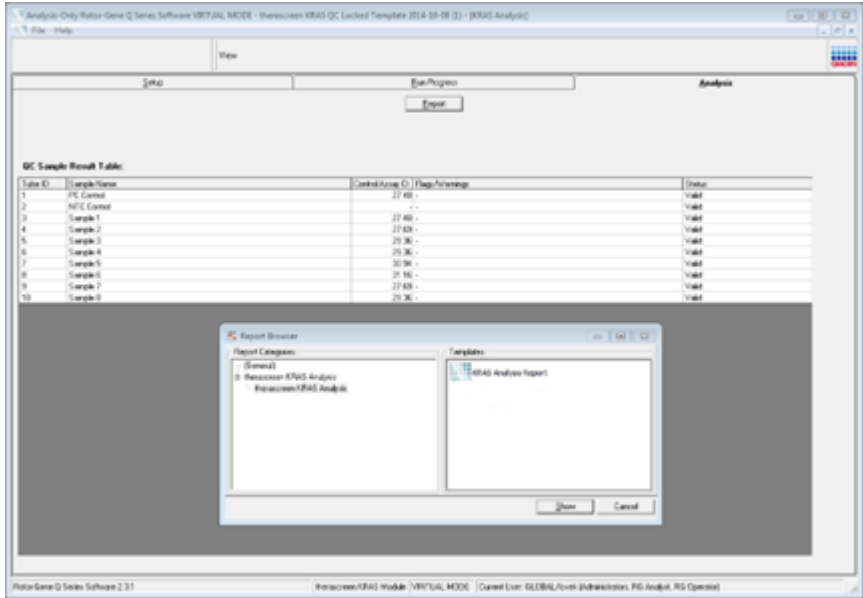
C_T 값이 21.92~32.00가 되도록 희석합니다. 1:1 희석은 C_T 값을 약 1.0 증가시킵니다.

- 샘플 대조 반응 C_T 값이 21.92~32.00(경곶값 포함)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) 를 클릭하여 보고서 파일을 생성합니다. 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 상단 왼쪽 구석에 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

- 샘플 평가를 통과한 샘플은 KRAS 돌연변이 분석을 사용하여 검사할 수 있습니다.
- *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 효율적으로 사용하려면 샘플을 7개씩 배치로 묶어야 합니다(72-Well Rotor를 채우기 위해). 배치 크기를 줄이면 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 테스트할 수 있는 샘플 수가 줄어듭니다.
- 샘플은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 제공된 모든 반응 혼합물을 사용하여 테스트해야 합니다.
- *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*) 또는 *Taq* DNA 중합효소가 들어 있는 혼합물을 흔들지 마십시오. 그렇게 하면 효소가 불활성화될 수 있습니다.
- 피펫 팁이 효소에 과도하게 덮이지 않도록 팁을 조심스럽게 액체 표면 바로 밑에 담가서 *Taq* DNA 중합효소를 피펫팅하십시오.

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

시작하기 전에 해야 할 일

- 각 사용 전에 모든 시약을 실온(15~25°C)에서 최소 1시간 동안 완전히 해동하고, 10회 거꾸로 하여 혼합한 후, 짧게 원심 분리하여 튜브 바닥의 내용물을 채집합니다.
- 각 사용 전에 *Taq* DNA 중합효소(튜브 *Taq*)를 실온(15~25°C)에 둡니다. 튜브를 짧게 원심 분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.

- 모든 샘플이 완전히 해동되었고, 10회 뒤집어서 혼합했고, 튜브 바닥에 있는 내용물을 수집하기 위해 짧게 원심분리했는지 확인하십시오.

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 1시간 동안 완전히 해동합니다.

실행 시작 전 시약 해동, PCR 설정 및 보관 시간은 표 7에 기재되어 있습니다.

표 7. 해동 시간, PCR 설정 시간 및 보관 온도

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

참고: PCR 설정은 실온에서 수행됩니다. '보관'이라는 용어는 PCR 설정 완료 시점부터 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' 페이지의 20). 튜브를 짧게 원심분리하여 튜브 바닥에 있는 효소를 수집합니다.

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

참고: 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.

3. 아래의 표와 같이 8개의 탈핵산분해효소 마이크로 원심분리기 튜브(제공되지 않음)에 각 해당 반응 혼합물에 따라 라벨을 붙입니다. DNA 샘플을 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 1개의 추가 샘플에 대한 시약을 포함시킵니다. 마스터 혼합물에는 샘플을 제외하고 PCR에 필요한 모든 구성품이 포함되어 있습니다.

표 8. 마스터 혼합물 및 해당 볼륨*

분석항목 및 반응 혼합물 튜브	반응 혼합물의 부피	<i>Taq</i> DNA 중합효소의 용량
대조물질(튜브 CTRL)	19.76 $\mu\text{L} \times (n + 1)$	0.24 $\mu\text{L} \times (n + 1)$
12ALA(튜브 12ALA)	19.76 $\mu\text{L} \times (n + 1)$	0.24 $\mu\text{L} \times (n + 1)$
12ASP(튜브 12ASP)	19.76 $\mu\text{L} \times (n + 1)$	0.24 $\mu\text{L} \times (n + 1)$
12ARG(튜브 12ARG)	19.76 $\mu\text{L} \times (n + 1)$	0.24 $\mu\text{L} \times (n + 1)$
12CYS(튜브 12CYS)	19.76 $\mu\text{L} \times (n + 1)$	0.24 $\mu\text{L} \times (n + 1)$
12SER(튜브 12SER)	19.76 $\mu\text{L} \times (n + 1)$	0.24 $\mu\text{L} \times (n + 1)$
12VAL(튜브 12VAL)	19.76 $\mu\text{L} \times (n + 1)$	0.24 $\mu\text{L} \times (n + 1)$
13ASP(튜브 13ASP)	19.76 $\mu\text{L} \times (n + 1)$	0.24 $\mu\text{L} \times (n + 1)$

* n = 반응액 수(샘플 + 대조군).

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

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

- 표 9의 배치에 따라 적절한 수의 PCR 4-스트립 튜브(각 스트립에 4개의 튜브)를 로딩 블록에 배치합니다. 번호는 로딩 블록 내 위치를 표시하며 최종 로터 위치를 나타냅니다. 튜브의 캡을 닫지 마십시오.

참고: 캡은 필요할 때까지 플라스틱 용기에 남겨 두십시오.

표 9. KRAS 돌연변이 검출을 위한 로딩 블록 내 실행 레이아웃.

분석	PC	NTC	1	2	3	4	5	6	7
CTRL	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
13ASP	8	16	24	32	40	48	56	64	72

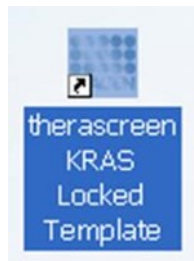
- 피펫을 총 반응 혼합물 용량보다 적은 용량으로 설정하고 위아래로 10회 완전히 흡인하여 분석 마스터 혼합물을 완전히 혼합합니다.

참고: 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.

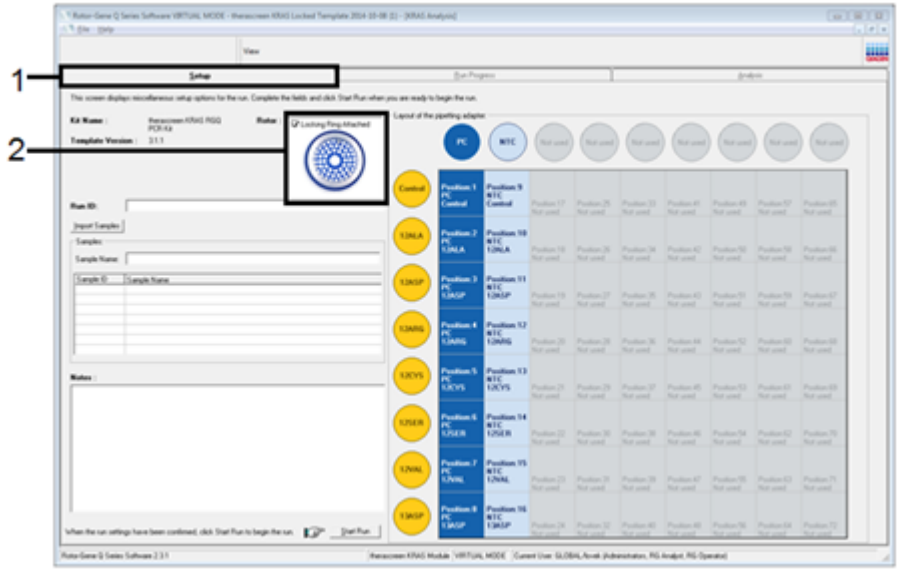
KRAS 돌연변이 검출을 위해서는 20 µL 분석 마스터 혼합물을 8개의 PC 튜브, 8개의 NTC 튜브, 각 DNA 샘플 당 8개의 튜브에 추가해야 합니다.

- 템플릿 없는 대조물질(No Template Control, NTC)용 5 µL의 탈핵산분해효소수를 즉시 NTC 튜브(튜브 위치 9~16)에 추가하고 튜브 캡을 닫습니다.
- 샘플 튜브(튜브 위치 17~72)에 각 DNA 샘플 5 µL를 추가하고 튜브 캡을 닫습니다.

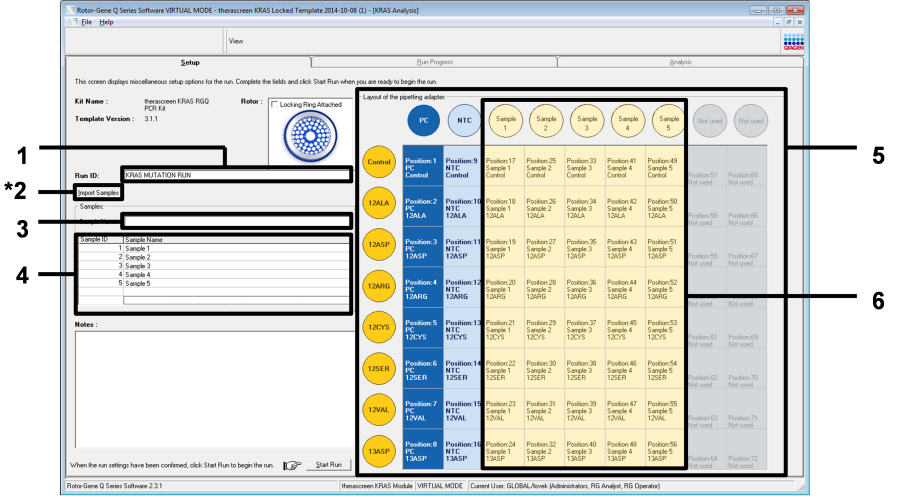
8. 5 μ L의 KRAS 양성 대조물질(Positive Control, PC)을 PC 튜브(튜브 위치 1~8)에 추가하고 튜브 캡을 닫습니다.
9. 영구 마커로 각 PCR 4-스트립 튜브(예: 위치 1, 5, 9 등)의 가장 낮은 숫자 위치의 첫 번째 튜브 뚜껑에 표시하여 튜브가 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기의 72-Well Rotor에 로드되는 방향을 표시합니다.
10. 캡을 덮은 튜브를 4회 뒤집어 샘플과 반응 혼합물을 섞습니다.
참고: 분석 설정 중 올바른 시약 혼합을 확실히 수행해야 합니다.
11. 모든 PCR 4-스트립 튜브를 방향 표시를 사용하여 실행 배치에 따라 72-Well Rotor의 적절한 위치에 배치합니다.
참고: 각 PCR 실행에 최대 7개의 샘플이 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 Rotor를 배치합니다. 잠금 링(Rotor-Gene Q MDx (US) 기기와 함께 공급됨)을 로터 상단에 설치하여 실행 중 튜브를 고정시킵니다.
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 ID를 입력합니다.



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

중요: 샘플 이름을 입력할 때 샘플 ID가 혼동되지 않도록 주의합니다. 이렇게 하면 샘플 이름이 아래의 샘플 목록에 추가되고, 샘플에 **Sample ID**(샘플 ID)(1, 2, 3 등)가 할당됩니다. 또한 오른쪽에 있는 **Layout of the pipetting adapter**(피펫팅 어댑터 배치) 패널(5)도 업데이트되어 샘플 이름이 포함됩니다.

또는 Import Samples(샘플 가져오기) 버튼을 사용하여 *.smp(Rotor-Gene Q 샘플 파일) 또는 *.csv(쉼표로 구분된 값) 형식으로 저장된 샘플 이름을 가져올 수도 있습니다. 이 방법을 사용하면 샘플 이름이 자동으로 채워집니다.

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

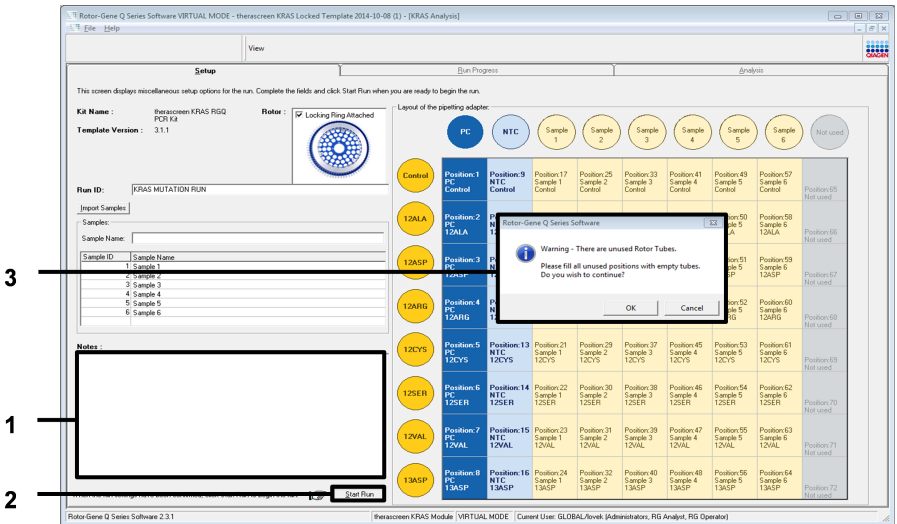
참고: 최대 7개의 샘플을 추가할 수 있습니다. 샘플 ID(샘플 원 안)에 자동으로 1~7이 배정됩니다.

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

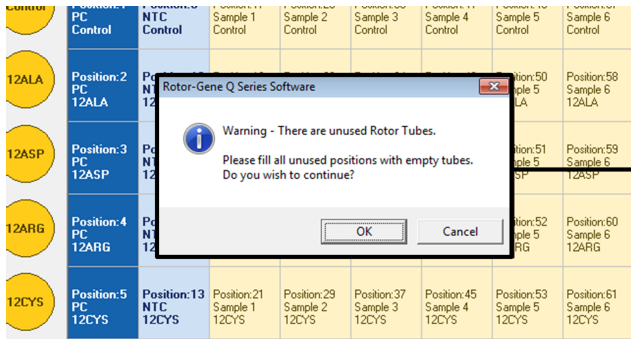
17. 16단계를 반복하여 모든 추가 샘플의 이름을 입력하십시오.

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

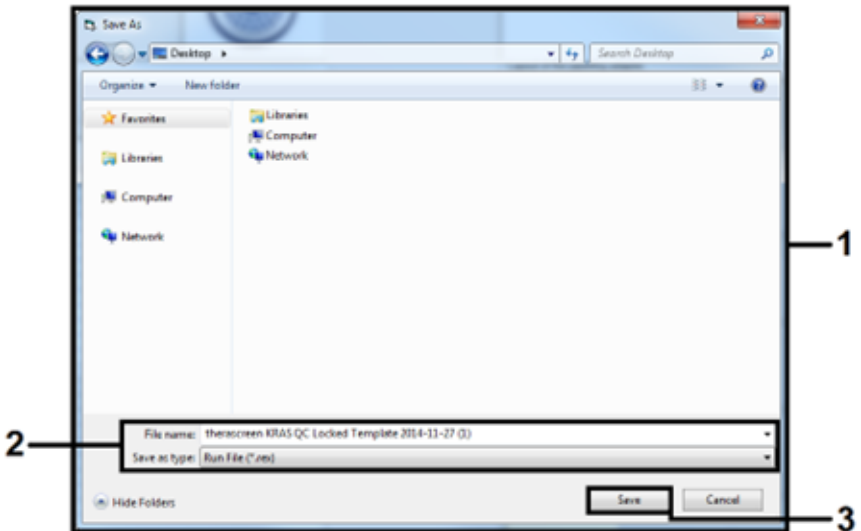
18. 모든 샘플 이름을 입력한 후 이름이 정확한지 확인합니다. 필요하다면 **Notes**(참고) 필드(아래 예의 1)에 추가 정보를 추가하고, **Start Run**(실행 시작)(2)을 클릭합니다.



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.

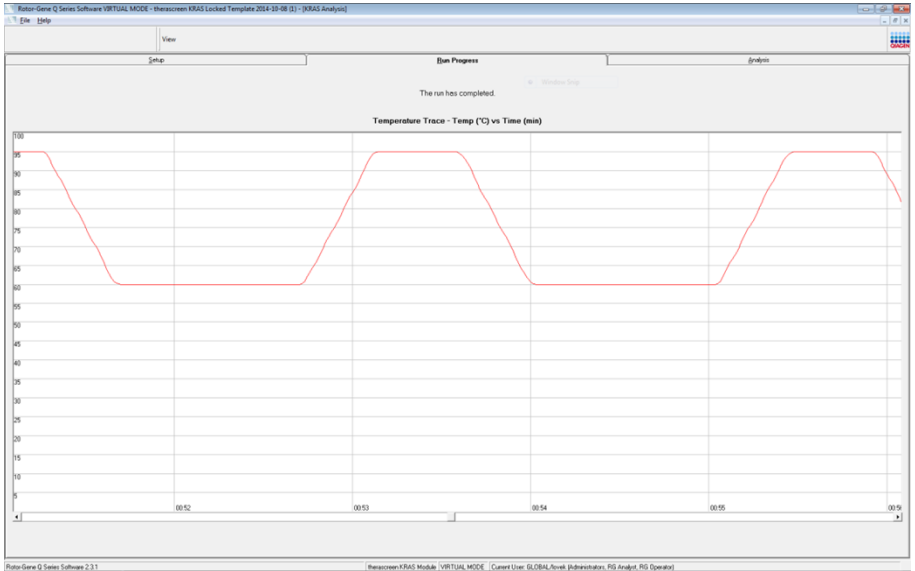


19. 모든 미사용 로터 위치가 캡을 씌운 빈 튜브로 채워졌는지 확인하고 **OK**(확인)를 눌러서 진행합니다.
20. Save As(다른 이름으로 저장) 창이 열립니다(1). 적절한 파일명(2)을 선택한 후 **Save**(저장) (3)를 클릭하여 PCR 실행을 선택된 위치에 *.rex 실행 파일로 저장합니다.



21. PCR 실행이 시작됩니다.

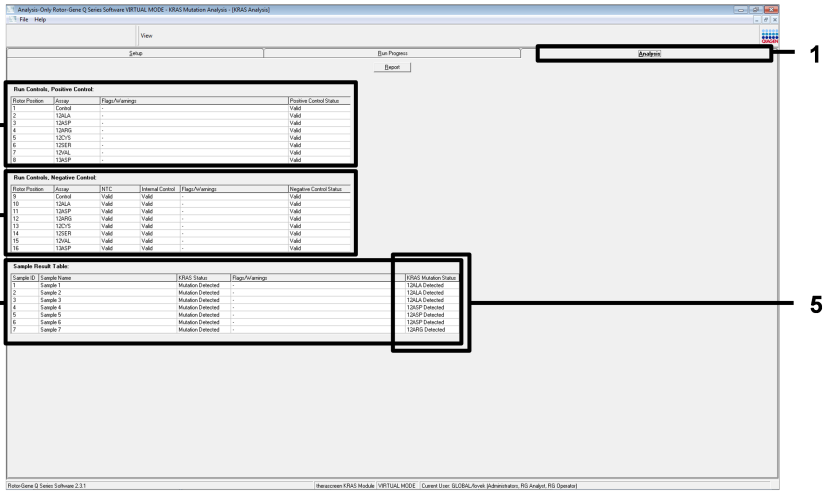
참고: 실행을 시작하면 Run Progress(실행 진행) 탭이 자동으로 열리고 온도 추적 및 남은 실행 시간이 표시됩니다.



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

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

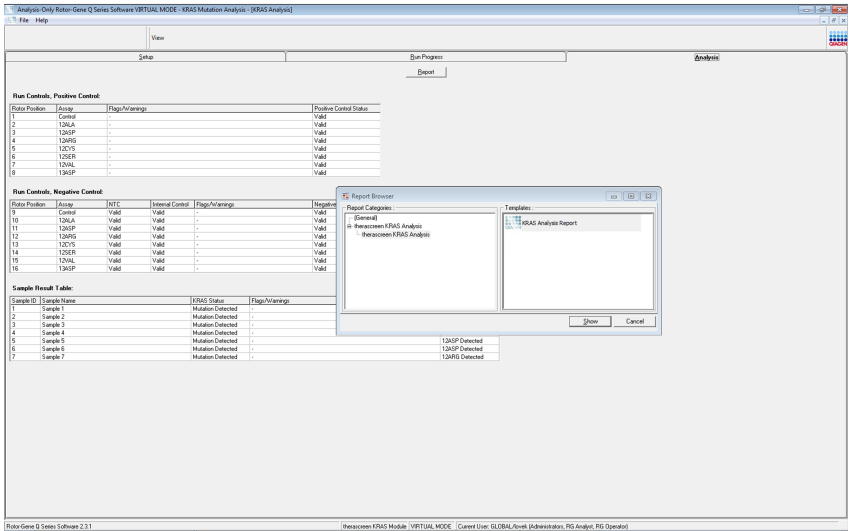
참고: 계산 방법에 대한 설명은 '분석 및 돌연변이 판정' 페이지의 55에 나와 있습니다.



23. 분석항목 결과가 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**(샘플 결과표) 패널(4)
 구체적인 돌연변이 **KRAS Mutation Status**(KRAS 돌연변이 상태) 칼럼(5) 아래에 돌연변이 양성 샘플로 보고됩니다.

24. **Report**(보고서)를 클릭하여 보고서 파일을 생성합니다. 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 및 결장직장암 샘플 참고 사항: 거짓 G12C(12CYS) 돌연변이 결과의 호출을 피하기 위해 아래 나열된 플래그가 있는 샘플은 무효로 해석되어야 합니다. 플래그 해석에 대한 자세한 내용은 표 11 페이지의 58 및 표 12 페이지의 60의 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 Package에 의해 분석 및 돌연변이 판정이 자동으로 수행됩니다. 다음의 정보는 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package가 분석 및 돌연변이 판정을 수행하는 방법을 설명합니다.

분석 및 돌연변이 판정

특정 반응물의 형광도가 임계값과 교차하는 PCR 사이클을 C_T 값으로 정의합니다. C_T 값은 특정 투입 DNA의 양을 나타냅니다. 낮은 C_T 값은 높은 투입 DNA 수준을 나타내고, 높은 C_T 값은 낮은 투입 DNA 수준을 나타냅니다. C_T 값이 있는 반응은 양성 증폭으로 분류됩니다.

Rotor-Gene Q 소프트웨어는 두 가지 기록된 값 사이의 형광반응 신호를 보간합니다. 따라서 C_T 값은 0~40 사이에 포함되는 어떠한 실수(정수로 한정되지 않음)도 될 수 있습니다.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit에서 임계값은 0.05 상대 형광 단위로 설정됩니다. 이 값은 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package에서 녹색 및 노란색 채널에 대하여 모두 구성됩니다. 임계값은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 개발 중에 정의되었습니다.

ΔC_T 값을 결정하기 위해 다음 수식을 사용하여 계산이 수행됩니다.

$$\Delta C_T = [\text{돌연변이 분석항목 } C_T \text{ 값}] - [\text{대조 분석항목 } C_T \text{ 값}]$$

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

샘플 ΔC_T 값은 동일한 샘플로부터의 돌연변이 분석항목 C_T 와 대조 분석항목 C_T 간의 차이로 계산됩니다. 계산된 값이 해당 분석항목의 컷오프 ΔC_T 값 이하일 경우 샘플이 돌연변이 양성으로 분류됩니다. 이 값보다 높으면 샘플이 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit가 검출할 수 있는

돌연변이 비율 미만(분석 한계 초과)이 포함되어 있거나, 샘플이 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 ΔC_T 값이 컷오프 ΔC_T 값보다 클 것으로 예상되는 경우 해당 샘플은 '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 샘플의 경우, 구체적인 돌연변이가 보고됩니다. 표시될 수 있는 다른 가능한 결과는 이 사용 지침의 '프로토콜: DNA 샘플 평가' 페이지의 27 및 '문제 해결 가이드' 페이지의 63에서 논의됩니다.

Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package에 의해 생성된 플래그의 해석은 'Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 플래그' 아래를 참조하십시오.

참고: 드물게, 한 개의 증양에 둘 이상의 돌연변이가 포함되어 있을 수 있습니다. 그러한 경우, 최저 ΔC_T 값을 산출하는 돌연변이가 식별됩니다.

Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 플래그

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

비소세포폐암 및 결장직장암 전용 플래그

표 10는 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package에 의해 생성될 수 있는 플래그, 플래그의 의미 및 취해야 할 조치를 보여줍니다.

표 10. Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 플래그 의미 및 권장 조치

플래그	의미	조치
PC_CTRL_ASSAY_FAIL	PCR 실행 무효 — FAM C _T 가 대조 반응에서 양성 대조물질의 범위를 벗어났습니다	전체 PCR 실행을 반복합니다.
PC_MUTATION_INVALID_DATA (PC_돌연변이_무효_데이터)	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(NTC_내부_CTRL_조기_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 (샘플_CTRL_무효_데이터)	샘플 무효 — 샘플 대조군의 형광 데이터를 해석할 수 없습니다	새로운 PCR 실행을 설정하여 관련 샘플을 반복합니다.
SAMPLE_CTRL_HIGH_CONC(샘플_CTRL_높음_농도)	샘플 무효 — 샘플 대조물질에서 FAM C _T 가 너무 낮습니다	샘플을 희석하여 대조 C _T 값을 높입니다. 이 희석은 키트로 공급된 물을 사용하여 1:1로 희석했을 때 C _T 값이 1.0 증가하는 것으로 가정하여 계산해야 합니다. 샘플이 희석되면 새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다.

비소세포폐암 전용 플래그

표 11는 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package에 의해 생성될 수 있는 플래그, 플래그의 의미 및 비소세포폐암 샘플에 대해 취해야 할 조치를 보여줍니다.

표 11. Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 플래그 의미 및 비소세포폐암 샘플에 대한 권장 조치

플래그	의미	조치
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL (샘플_내부_CTRL_실패)	내부 대조물질(HEX)의 C _T 값이 너무 높음(또는 C _T 값이 없음), FAM 채널 돌연변이 음성	거짓 G12C(12CYS) 돌연변이 결과를 무효로 해석해야 합니다. 나머지 샘플을 DIL로 표시된 튜브의 물로 1/8로 희석하여 최종 부피가 40 µL를 초과하도록 하고(예: DIL로 표시된 튜브의 DNA 10 µL 및 물 70 µL) 새 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편(절편 2개)에서 샘플을 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 유효하지 않은 경우 나머지 샘플을 DIL로 표시된 튜브의 물로 1/8로 희석하여 최종 부피가 40 µL를 초과하도록 한 다음 해당 희석을 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
SAMPLE_INT_CTRL_EARLY_CT(샘플_내부_CTRL_조기_CT)	돌연변이 튜브 무효 — 샘플(내부 대조물질)에서 C _T HEX가 너무 낮습니다	새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편(절편 2개)에서 샘플을 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
SAMPLE_INVALID_DATA (샘플_무효_데이터)	돌연변이 튜브 무효 — 내부 대조물질의 형광 데이터를 해석할 수 없음	새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편(절편 2개)에서 샘플을 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.

표 11. Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package 플래그 의미 및 비소세포폐암 샘플에 대한 권장 조치 (계속)

플래그	의미	조치
MUTATION_EARLY_CT	돌연변이 튜브 무효 — 샘플의 C_T FAM 값이 너무 낮습니다.	새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편(절편 2개)에서 샘플을 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID(샘플_양성_및_무효)	하나의 샘플에서 한 개 이상의 돌연변이가 유효이고 양성이지만, 동시에 동일한 샘플의 한 개 이상의 돌연변이가 무효입니다.	새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편(절편 2개)에서 샘플을 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트하며, 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
SAMPLE_CTRL_FAIL	샘플 무효 — 샘플 대조 반응의 FAM C_T 가 너무 높습니다	새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효가 나오면 새로운 FFPE 절편(절편 2개)에서 샘플을 추출합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트합니다. 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.

결장직장암 전용 플래그

표 12는 Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package에 의해 생성될 수 있는 플래그, 플래그의 의미 및 CRC 샘플에 대해 취해야 할 조치를 보여줍니다.

표 12. Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package 플래그 의미 및 결장직장암 샘플에 대한 권장 조치

플래그	의미	조치
SAMPLE_CTRL_FAIL	샘플 무효 — 샘플 대조 반응의 FAM CT가 너무 높습니다	<p>새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다.</p> <p>반복 PCR 실행에서 무효인 경우 총 종양 면적이 4 mm² 이상이어야 한다는 지침에 근거하여 추출(절편 ≥1개)을 반복하고, 종양 함량이 면적의 >20%인 절편을 추출에 사용합니다(육안 절개는 이루어지지 않음). 종양 함량이 면적당 ≤20%인 절편에서는 하나 이상의 절편을 육안 절제하여 총 종양 면적이 4 mm² 이상인지 확인합니다.</p> <p>새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트하며, 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.</p>
SAMPLE_INT_CTRL_FAIL (샘플_내부_CTRL_실패)	내부 대조물질(HEX)의 C _T 값이 너무 높음(또는 C _T 값이 없음), FAM 채널 돌연변이 음성	<p>샘플에 유효 상태가 부여된 경우 - 조치 없음.</p> <p>샘플에 무효 상태가 부여되면 새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다.</p> <p>반복 PCR 실행에서 무효인 경우 총 종양 면적이 4 mm² 이상이어야 한다는 지침에 근거하여 추출(절편 ≥1개)을 반복하고, 종양 함량이 면적의 >20%인 절편을 추출에 사용합니다(육안 절개는 이루어지지 않음). 종양 함량이 면적당 ≤20%인 절편에서는 하나 이상의 절편을 육안 절제하여 총 종양 면적이 4 mm² 이상인지 확인합니다.</p> <p>새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트하며, 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.</p>

표 12. Rotor-Gene Q thetascreen KRAS Assay Package 플래그 의미 및 결장직장암 샘플에 대한 권장 조치 (계속)

플래그	의미	조치
SAMPLE_INT_CTRL_ EARLY_CT(샘플_내부_ CTRL_조기_CT)	돌연변이 튜브 무효 — 샘플(내부 대조물질)에서 C _T HEX가 너무 낮습니다	<p>샘플에 유효 상태가 부여된 경우 — 조치 없음.</p> <p>샘플에 무효 상태가 부여되면 새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다.</p> <p>반복 PCR 실행에서 무효인 경우 총 증양 면적이 4 mm² 이상이어야 한다는 지침에 근거하여 추출(절편 ≥1개)을 반복하고, 증양 함량이 면적의 >20%인 절편을 추출에 사용합니다(육안 절개는 이루어지지 않음). 증양 함량이 면적당 ≤20%인 절편에서는 하나 이상의 절편을 육안 절제하여 총 증양 면적이 4 mm² 이상인지 확인합니다.</p> <p>새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트하며, 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.</p>
SAMPLE_INVALID_DATA (샘플_무효_데이터)	돌연변이 튜브 무효 — 내부 대조물질의 형광 데이터를 해석할 수 없음	<p>샘플에 유효 상태가 부여된 경우 — 조치 없음. 샘플에 무효 상태가 부여되면 새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효인 경우 총 증양 면적이 4 mm² 이상이어야 한다는 지침에 근거하여 추출(절편 ≥1개)을 반복하고, 증양 함량이 면적의 >20%인 절편을 추출에 사용합니다(육안 절개는 이루어지지 않음). 증양 함량이 면적당 ≤20%인 절편에서는 하나 이상의 절편을 육안 절제하여 총 증양 면적이 4 mm² 이상인지 확인합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트하며, 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.</p>

표 12. Rotor-Gene Q theascreen KRAS Assay Package 플래그 의미 및 결장직장암 샘플에 대한 권장 조치 (계속)

플래그	의미	조치
MUTATION_EARLY_CT	돌연변이 튜브 무효 — 샘플의 C _T FAM 값이 너무 낮습니다.	샘플에 유효 상태가 부여된 경우 — 조치 없음. 샘플에 무효 상태가 부여되면 새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효인 경우 총 증양 면적이 4 mm ² 이상이어야 한다는 지침에 근거하여 추출(절편 ≥1개)을 반복하고, 증양 함량이 면적의 >20%인 절편을 추출에 사용합니다(육안 절개는 이루어지지 않음). 증양 함량이 면적당 ≤20%인 절편에서는 하나 이상의 절편을 육안 절제하여 총 증양 면적이 4 mm ² 이상인지 확인합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트하며, 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.
SAMPLE_POSITIVE_AND_INVALID(샘플_양성_및_무효)	하나의 샘플에서 한 개 이상의 돌연변이가 유효이고 양성이지만, 동시에 동일한 샘플의 한 개 이상의 돌연변이가 무효입니다	새로운 PCR 실행을 설정하여 샘플을 반복합니다. 반복 PCR 실행에서 무효인 경우 총 증양 면적이 4 mm ² 이상이어야 한다는 지침에 근거하여 추출(절편 ≥1개)을 반복하고, 증양 함량이 면적의 >20%인 절편을 추출에 사용합니다(육안 절개는 이루어지지 않음). 증양 함량이 면적당 ≤20%인 절편에서는 하나 이상의 절편을 육안 절제하여 총 증양 면적이 4 mm ² 이상인지 확인합니다. 새로운 PCR 실행을 설정하여 새로운 추출물을 테스트하며, 무효인 경우 새로운 PCR 실행을 설정하여 재추출된 샘플을 다시 테스트합니다. 이 실행 후에도 샘플이 유효한 결과를 제공하지 않으면 해당 샘플에는 불확정 돌연변이 상태가 부여되며, 더 이상의 검사를 수행하지 않습니다.

문제 해결 가이드

이 문제 해결 가이드는 발생 가능한 문제를 해결하는 데 도움이 될 수 있습니다. 자세한 내용은 당사 기술 지원 센터의 자주 묻는 질문 페이지 www.qiagen.com/FAQ/FAQList.aspx (연락처의 경우 www.qiagen.com 방문)를 참고하십시오.

의견 및 제안

무효 결과

- | | |
|---|--|
| a. 한 개 이상의 키트 구성품의 보관 조건이 '시약 보관 및 취급' 페이지의 20에 제공된 지침에 부합하지 않았습니다. | 시약의 보관 조건과 유통 기한(라벨 참조)을 확인하고, 필요한 경우 새 키트를 사용합니다. |
| b. <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit가 만료되었습니다. | 시약의 보관 조건과 유통 기한(키트 라벨 참조)을 확인하고, 필요한 경우 새로운 <i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit를 사용합니다. |

NTC 샘플이 FAM 채널에서 양성 결과를 나타냄

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

품질 관리

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

금지 사항

알려진 금지 사항은 없습니다.

제한 사항

이 테스트는 *KRAS* 유전자의 코돈 12 및 13의 7가지 돌연변이를 검출하도록 설계되었습니다. 결과가 No Mutation Detected(돌연변이 무검출)로 보고되는 샘플은 이 분석법으로 검출되지 않는 *KRAS* 돌연변이(예: 13CYS)를 포함하고 있을 수 있습니다.

돌연변이의 검출은 샘플의 무결성과 시료에 존재하는 증폭 가능한 DNA의 양에 따라 달라집니다. 샘플 내 DNA의 최초 평가 결과 샘플의 양이 *KRAS* 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 샘플이 검사 환경의 외부 DNA 소스나 양성 대조물질의 DNA로 오염될 수 있습니다. 샘플 및 반응 혼합물 시약이 오염되지 않도록 주의하십시오.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit는 질병의 진단에 사용되지 않습니다.

LUMAKRAS(소토라십) 또는 Krazati(아다그라시브)의 적격성을 결정하기 위한 샘플 테스트의 경우 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit는 *KRAS* G12C 돌연변이를 식별하기 위한 것입니다.

이 테스트는 각 돌연변이 반응이 측정되는 구체적인 돌연변이에 대하여 가장 민감하도록 설계되었습니다. 그러나 돌연변이가 검출된 샘플에서 다른 돌연변이 반응과의 교차 반응이 발생할 수 있습니다. 둘 이상의 돌연변이 반응이 양성이면 결과는 최저 ΔC_T 값을 갖는 것입니다.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit는 결장직장암 조직 및 비소세포폐암 조직의 FFPE에 대해서만 검증됩니다.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit는 오직 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit와의 사용에 대해서만 검증되었습니다. Rotor-Gene Q MDx (US) 기기만 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit와 함께 사용되도록 검증됨.

CRC 시료의 성능 특징

분석 성능

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

컷오프

분석을 위한 컷오프를 설정하기 위하여 220개의 FFPE 샘플을 NCCLS EP17-A(21)의 지침에 따른 방법을 사용하여 테스트했습니다. 대조군 반응 C_T 범위는 21.92~32.00로 확정되었습니다. 돌연변이 반응의 $C_t(\Delta C_t)$ 에서 뺀 대조 반응 C_t 에 기초한 컷오프 값을 표 13에서 볼 수 있습니다.

표 13. 각 돌연변이 분석항목에 대해 확립된 컷오프 값

돌연변이 분석항목

	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 샘플이 낮은 농도의 돌연변이를 나타낼 수 있는 분석 신호를 생성하지 않도록 템플릿이 없는 샘플을 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 Kit로 테스트된 결장직장암 샘플의 돌연변이 상태와 양방향 염기서열 분석과의 일치율을 확인하기 위한 두 건의 연구가 실시되었습니다. 첫 번째 연구에서는 베이스라인 임상, 인구 통계 및 종양 시료 특징에 기초하여 결장직장암 환자들로부터 입수한 350개의 종양 샘플을 선택했습니다. 통계적 무작위 샘플링 기법을 사용하여 돌연변이 상태가 알려지지 않은 150개의 샘플을 평가를 위해 선정했습니다. 이 연구에서는 이 150개의 FFPE 샘플을 테스트하고, 이어서 CLSI EP12-A2 Guidance(22)의 일치/불일치 통계 척도를 사용하여 분석했습니다. 총 137개의 FFPE 샘플이 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 및 양방향 염기서열 분석에서 모두 유효한 결과를 나타냈습니다.

그 결과 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit는 2개의 샘플을 음성으로 보고했는데, 그 중 1개에 대하여 양방향 염기서열 분석은 12ASP 양성을 판정했고, 다른 한 개는 양방향 염기서열 분석에서 13ASP로 나타났습니다. 반면에 3개의 샘플은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에 의해 KRAS 돌연변이를 갖고 있는 것으로 보고되었는데, 양방향 염기서열 분석에서는 양성으로 보고되지 않았습니다. 또한 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에 의해 12ARG로 식별된 1개의 샘플은 양방향 염기서열 분석에서 12ASP로 판정되었습니다. 양방향 염기서열 분석에서 돌연변이 음성으로 결정된 5개의 샘플은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에서 불확정(3개 샘플) 또는 무효(2개 샘플)였습니다(데이터 미표시). 생어 양방향 염기서열 분석에서 불확정이었던 한 개의 샘플은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에서는 12SER로 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. 6개의 실패한 생어 샘플을 제외한 전체 결과를 각 95% 신뢰 구간(Confidence Interval, CI)과 함께 표 14에 표시되어 있습니다.

표 14. 일치 분석

일치율 측정	빈도(%)	95% 신뢰 구간(Confidence Interval, 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 15은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit와 양방향 염기서열 분석 간 일치에 대한 세부 사항을 보여줍니다.

표 15. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 대 양방향 Sanger 염기서열 분석

양방향 염기서열 분석의 돌연변이 판정

	음성	12ALA	12ARG	12ASP	12CYS	12SER	12VAL	13ASP	총계
음성	80	-	-	1	-	-	-	1	82
12ALA	-	3	-	-	-	-	-	-	3
12ARG	-	-	-	1	-	-	-	-	1
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit 판정	12ASP	-	-	-	20	-	-	-	20
12CYS	-	-	-	-	-	3	-	-	3
12SER	-	-	-	-	-	-	-	-	0
12VAL	2	-	-	-	-	-	-	14	16
13ASP	1	-	-	-	-	-	-	-	11
총계	83	3	0	22	3	0	14	12	137

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

총 13개(~5%)의 샘플에서 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 평가를 위해 육안 절제가 필요했습니다. 양방향 염기서열 분석 결과가 나온 271개의 샘플 중에서 24개는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에서 불확정이었습니다(실패한 대조 C_T 범위, 데이터 미표시). 일치율 분석은 유효한 양방향 및 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 결과를 보인 247개 샘플에 대하여 실시되었습니다. 9개의 불일치 샘플이 있었습니다. 247개 샘플 중 한 개는 양방향 염기서열 분석에서 돌연변이 양성 결과를 보였으나 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에서는 'No Mutation Detected'(돌연변이 검출되지 않음) 결과를 보였습니다. 여덟 개의 샘플은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에서 양성 결과를 보였으나 양방향 염기서열 분석에서는 음성 결과를 보였습니다. 전체적으로 일치율은 96.4%였습니다. 이 데이터는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 정확한 성능을 뒷받침합니다(표 16 및 표 17).

표 16. 일치 분석(두 번째 연구)

일치율 측정	빈도(%)	95% 신뢰 구간(Confidence Interval, 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 17는 두 번째 연구에서의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit와 양방향 염기서열 분석 간 일치에 대한 세부 사항을 보여줍니다.

표 17. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 대 생어 염기서열 분석(두 번째 연구)

양방향 염기서열 분석의 돌연변이 판정

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

검출 한계(Limit of Detection, LOD)

*therascreen*KRAS RGQ PCR Kit의 작동 범위는 시료 내 증폭 가능 DNA의 양에 기초하며, 대조 반응 C_T 값으로 결정됩니다. 분석항목의 명시된 입력 범위는 대조 C_T 사전 지정 범위 21.92~32.00로써 정의되었습니다. LOD란 총 증폭 가능 DNA가 명시된 입력 범위 내에 있으면서 임계 컷오프 ΔC_T 값보다 여전히 낮을 때 야생형의 배경에서 검출될 수 있는 돌연변이 DNA의 최소 비율입니다.

therascreenKRAS RGQ PCR Kit에 포함된 7가지의 각 돌연변이 특이적 반응의 LOD를 측정하기 위한 연구가 수행되었습니다. therascreenKRAS RGQ PCR Kit의 경우, 야생형 DNA 배경에서의 돌연변이 DNA 검출 한계는 각 돌연변이 양성 샘플의 테스트 복제본의 95%가 양성으로 판정된 최저 희석 인자로 정의됩니다. 8개의 FFPE 세포주, 돌연변이 DNA 함량이 알려진 7개와 1개의 야생형이 이 평가에 사용되었습니다.

총 증폭 가능 DNA 중 돌연변이의 비율(돌연변이 DNA의 비율)은 먼저 고정되지 않은 세포에서 양방향 생어 염기서열 분석법으로 측정된 후 상대적 피크 분석을 사용하여 결정되었습니다. 3개의 세포주의 경우, 돌연변이 함량은 100%였습니다(즉, 세포주 DNA가 동형접합 돌연변이체임). 다른 세포주들은 혼합된 접합체였습니다. 각 샘플로부터 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 DNA의 수준은 동일하지만 돌연변이 DNA 수준은 상이한 추출물 희석 시리즈를 만들었습니다. 그런 다음, 이 샘플들로부터 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 비율은 표 18에 나와 있습니다. 강조 표시된 상자는 95%를 초과하는 복제본이 정확한 판정을 받은 비율을 나타냅니다.

표 18. 각 돌연변이 반응에서 희석의 함수인 정확한 판정의 비율

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

표 18. 각 돌연변이 반응에서 희석의 함수인 정확한 판정의 비율 (계속)

돌연변이 희석(%)	정확한 판정(%)						
	12ALA	12ASP	12ARG	12CYS	12SER	12VAL	13ASP
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 샘플의 돌연변이 희석은 40.0%였습니다.

첫 번째 희석 시리즈의 결과는 낮은 수준과 높은 수준이 모두 분석의 투입 범위 이내인 보다 좁은 반응 특이적 범위의 비율 돌연변이 희석을 사용하여 LOD 값을 확인하기 위한 희석물을 만드는 데 사용되었습니다. 높은 희석 시리즈의 경우, 각각 12개의 복제본이 평가되었습니다. 높은 희석 시리즈(목표값은 대략 C_T 23-24)에서 희석의 함수인 정확한 판정의 비율이 표 19에 나와 있습니다. 강조 표시된 상자는 95%를 초과하는 복제본이 정확한 판정을 받은 비율을 나타냅니다.

표 19. 높은 희석 시리즈에서 희석의 함수인 정확한 판정의 비율

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

표 19. 높은 희석 시리즈에서 희석의 함수인 정확한 판정의 비율 (계속)

돌연변이	돌연변이 희석 높음(%)					
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 11이었습니다.

낮은 시리즈에서는 명시된 경우를 제외하고, 희석당 24개의 복제본을 평가했습니다. 낮은 희석 시리즈(목표값은 C_T 31)에서 희석의 함수인 정확한 판정의 비율이 표 20에 나와 있습니다. 강조 표시된 상자는 95%를 초과하는 복제본이 정확한 판정을 받은 비율을 나타냅니다.

표 20. 낮은 희석 시리즈에서 희석의 함수인 정확한 판정의 비율

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 및 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 CT값 또는 높은 CT값으로 시작하는 희석 시리즈로부터 결정된 LOD가 표 21에 나와 있습니다.

표 21. 낮은 C_T 및 높은 C_T 희석 시리즈의 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

입력 C_T 값이 대략 22~27 C_T 일 때 FFPE 세포주를 사용한 최종 LOD 값이 표 22에 나와 있습니다. C_T 입력 범위의 하단에서는 분석항목의 민감도가 하락합니다. 투입 DNA의 양은 작동 범위의 높은 지점과 중간 지점에서 관찰되는 비율의 야생형 대 돌연변이 DNA의 동일한 비율을 뒷받침하기에 충분한 사본을 포함하지 않을 수 있습니다.

표 22. FFPE 세포주를 사용한 각 돌연변이 분석항목의 LoD 값

분석	LoD C ₉₅ (아생형 DNA 내 돌연변이 DNA의 비율)
12ALA	0.8
12ASP	6.4
12ARG	2.6
12CYS	1.5
12SER	5.6
12VAL	1.6
13ASP	6.4

투입 DNA의 영향

총 DNA 수준이 다양한 샘플들이 동일한 비율의 돌연변이 DNA를 포함하고 있으면 측정된 ΔC_t 값은 일관성을 유지할 것으로 예상됩니다. 이 연구의 목적은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 성능이 분석항목의 총 DNA 입력(대조 C_T) 범위에서 일관성이 있음을 입증하는 것이었습니다. 8개의 FFPE 세포주에서 추출한 DNA를 사용하여 달성 가능한 가장 낮은 대조 반응 Ct를 가진 DNA의 풀을 준비했습니다. 이후 농축된 DNA 스톱을 희석하여 작동 범위에 걸친 DNA를 만들었습니다(초기 농축 스톱을 포함한 총 5개의 희석물).

작동 범위 내의 각 지점에서 6개의 복제 테스트를 수행하기에 충분한 재료가 준비되었습니다. 각 돌연변이 반응의 희석 범위와 결과에서 얻은 평균 ΔC_t 값이 표 23에 나와 있습니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 검출된 각 돌연변이에서 분석항목의 작동 범위에 걸친 다양한 총 DNA 입력 수준에서 측정된 ΔC_t 값은 연구에서 사전 설정된 수용 기준을 통과했습니다. DNA 입력이 증가할 때 ΔC_t 에 약간의 증가가 있지만 ΔC_t 값은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 작동 범위에 걸쳐 사전 지정된 수용 기준 이내로 일관되었습니다.

표 23. DNA 투입이 투입 대조 반응 Ct 범위에서 ΔCt 값에 미치는 영향 — FFPE 세포주

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

* 12ASP의 총 복제수는 27이었습니다.

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 ΔCt (그리고 따라서 돌연변이 판정)가 분석항목의 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 24에 요약되어 있습니다.

표 24. 증폭 효율(DNA 입력의 함수) 데이터 요약

샘플	절편	절편 표준 오차	계산된 기울기	표준 오차(기울기)	양측 95% 신뢰 하한(기울기)	양측 95% 신뢰 상한(기울기)	증폭 효율	증폭 효율의 차이
12ALA	대조물질 C _T	0.060	-1.008	0.007	-1.023	-0.993	0.989	0.03
	12ALA C _T	0.103	-0.987	0.013	-1.013	-0.961	1.019	
12ASP	대조물질 C _T	0.083	-1.035	0.01	-1.056	-1.014	0.954	0.056
	12ASP C _T	0.083	-0.993	0.011	-1.016	-0.97	1.01	
12ARG	대조물질 C _T	0.13	-1.013	0.16	-1.046	-0.98	0.982	-0.003
	12ARG C _T	0.065	-1.015	0.008	-1.032	-0.999	0.979	
12CYS	대조물질 C _T	0.063	-0.981	0.01	-1.003	-0.96	1.026	0.032
	12CYS C _T	0.039	-0.961	0.006	-0.974	-0.947	1.058	
12SER	대조물질 C _T	0.050	-1.003	0.008	-1.02	-0.986	0.996	0.105
	12SER C _T	0.087	-0.934	0.014	-0.963	-0.904	1.101	
12VAL	대조물질 C _T	0.047	-0.995	0.006	-1.007	-0.983	1.007	0.033
	12VAL C _T	0.043	-0.972	0.005	-0.983	-0.961	1.04	
13ASP	대조물질 C _T	0.056	-1.001	0.009	-1.02	-0.982	0.999	0.145
	13ASP C _T	0.106	-0.909	0.017	-0.945	-0.873	1.144	

돌연변이 비율에 따른 선형성/증폭 효율

이 연구의 목적은 연속적으로 희석된 돌연변이 양성 샘플이 증폭 효율에 미치는 영향을 약 22~23 C_T 의 C_T 입력 수준으로 시작해서 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 작동 범위에 걸쳐 평가하는 것이었습니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 OD 값은 초기에 FFPE 세포주에서 추출한 DNA를 사용하여 결정되었습니다. 그런 다음, 대조 반응 C_T 가 ~23 C_T 에 해당하는 DNA 스톱을 준비했습니다. 이 스톱을 야생형 DNA를 사용하여 매번 2배씩 연속적으로 희석하여 템플릿의 총 야생형 DNA는 일정하게 유지하면서 돌연변이 DNA 비율을 변화시켰습니다. 따라서 생성된 각 템플릿은 동일한 절대량 및 농도의 DNA를 가졌지만 야생형 대 돌연변이 DNA의 비율은 달랐습니다.

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

이 연구는 일정한 농도의 야생형 DNA의 배경에서 돌연변이의 희석이 위의 선형성 연구에서 결정된 값 밖에서 크게 다르지 않은 증폭 효율을 보였고, 증폭 효율은 $\pm 10\%$ 미만의 차이를 나타냈음을 보여주었습니다. 데이터는 표 25에 요약되어 있습니다.

표 25. 증폭 효율(돌연변이 비율의 함수) 데이터 요약

샘플	절편	절편 표준 오차	계산된 기울기	표준 오차 (기울기)	양측 95% 하한	양측 95% 신뢰 상한(기울기)	증폭 효율
12ALA	23.540	0.025	-0.968	0.010	-0.989	-0.947	1.047
12ASP	24.804	0.054	-1.030	0.022	-1.075	-0.985	0.960
12ARG	24.226	0.028	-1.008	0.11	-1-031	-0.984	0.990
12CYS	24.354	0.027	-0.981	0.011	-1.003	-0.959	1.027
12SER	25.376	0.054	-0.892	0.022	-0.937	-0.847	1.174
12VAL	22.703	0.035	-1.021	0.014	-1.050	-0.992	0.972
13ASP	27.555	0.057	-0.810	0.023	-0.857	-0.763	1.353

간섭 물질

이 연구의 목적은 잠재적 간섭 물질이 *therascreen*KRAS RGQ PCR Kit의 성능에 미치는 영향을 평가하는 것이었습니다. 이것은 두 가지 농도에서의 첨가 실험을 통해 각 물질이 ΔC_T 값과 테스트 샘플의 돌연변이 상태에 미치는 영향을 분석함으로써 수행되었습니다. 농도는 표 26에 나와 있습니다.

표 26. 각 분석항목에서 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)	2.00×10^{-4}	5.00×10^{-5}
자일렌	2.00×10^{-4}	5.00×10^{-5}
에탄올	1.35×10^{-3}	3.38×10^{-4}
Buffer ATL	5.40×10^{-4}	1.35×10^{-4}
Proteinase K	1.32×10^{-5}	3.30×10^{-6}
Buffer AL	1.33×10^{-3}	3.33×10^{-5}
세척 완충액 Buffer AW1	0.50	1.25×10^{-1}
세척 완충액 Buffer AW2	5.00	1.25

정상적인 사용 중 발생할 것으로 예상되는 농도에서 평가된 잠재적 간섭 물질 중 어느 것도 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit가 돌연변이 양성 샘플과 돌연변이 음성 샘플을 구별하는 능력에 영향을 미치지 않습니다.

간섭 물질 연구 외에도 종양 샘플 내 높은 수준의 괴사 조직이 유효한 데이터를 생산하는 능력에 영향을 미치는지를 확인하기 위해 임상 샘플에서 괴사의 잠재적 영향을 평가하였습니다. '분석 표준 방법과의 비교'('분석 표준 방법과의 비교' 페이지의 67 참조), 연구의 일부로 평가된 총 421개의 샘플에서 29개의 샘플은 병리학적 검토에서 >50% 수준의 괴사가 있는 것으로 결정되었습니다. 이 29개의 샘플 중 28개는 양방향 생어 염기서열 분석과 일치하는 유효한 결과를 보였습니다. 한 개의 결과는 DNA가 부족하여 무효였습니다.

교차 오염

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

- 샘플 추출(예: 조각 스크래핑)
- 샘플 피펫팅
- 샘플 튜브의 폐쇄('캡 씩우기')
- 사용 중 키트 시약의 오염
- Rotor-Gene Q MDx (US) 기기에 분석항목 튜브 로딩

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

이 연구는 Rotor-Gene Q MDx (US) 기기 실행 이내 및 실행 간 오염 가능성을 조사하기 위해 고안된 10개 PCR 실행으로 구성되었습니다. 이들 테스트 실행에서 야생형 DNA가 들어 있는 튜브를 사용하여 돌연변이 DNA로부터의 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 Kit는 8개의 개별 반응으로 구성되었으며, 이는 *KRAS* 유전자의 비다형적 영역을 검출하는 한 개의 대조 반응 및 7개의 돌연변이 특이적 반응입니다. 코돈 12 또는 13의 야생형 *KRAS* 서열을 구체적으로 측정하는 반응은 없습니다. *KRAS* 'No Mutation Detected'(돌연변이 무검출) 결과(즉, 야생형)는 돌연변이 양성 결과를 초래하는 7가지 돌연변이 중 어떤 것도 없을 때 결정됩니다. 따라서 위양성 결과가 발생하지 않도록 과도한 양의 *KRAS* 야생형 DNA를 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 DNA가 존재할 때 잘못된 돌연변이 판정을 초래하지 않는다는 것을 입증하기 위해 평가됩니다. 이 분석항목에서 DNA 입력은 대조 C_T 범위(21.92~32.00)에 기초하기 때문에 최고 농도의 DNA 입력은 대조 C_T 값이 약 22입니다. 이 평가를 위해 FFPE 임상 샘플 FFPE 세포주 DNA가 사용되었습니다.

비특이적 증폭/교차 반응: 야생형 *KRAS* DNA

구체적 돌연변이를 증폭하도록 고안된 반응 혼합물에 의한 야생형 DNA의 비특이적 증폭의 양을 해결하기 위해 야생형 FFPE 세포주 DNA 또는 최고 농도의 증폭 가능 DNA 투입 수준의 CRC 종양 조직에서 추출한 DNA의 60개 복제본을 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 사용하여 평가했습니다. FFPE 세포주에서 추출한 DNA의 경우, 대조 C_T 값은 약 22~23이었습니다. 3개의 야생형 CRC 샘플의 대조 C_T 값은 24~25였습니다. 이 결과는 ΔC_T 값이 확정된 컷오프를 초과함을 보여주었습니다. 각 반응에서 관찰된 평균 및 최저 ΔC_T 값이 표 27에 나와 있습니다.

표 27. 돌연변이 반응의 야생형 샘플에서 관찰된 최저 평균 ΔC_T

돌연변이 반응	컷오프	관찰된 최저 ΔC_T	샘플 1 ΔC_T 평균 (최저)	샘플 2 ΔC_T 평균 (최저)	샘플 3 ΔC_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 반응성: 돌연변이 양성 KRAS DNA

대조 반응 C_T 가 약 23이 되도록 각 FFPE 세포주로부터 DNA 샘플을 준비하여 고농도의 입력 DNA를 가진 돌연변이 샘플을 모든 반응 혼합물에 대해 테스트했습니다. 각 돌연변이 샘플의 여섯 개의 복제본을 평가했습니다. 샘플의 돌연변이 비율은 세포주 DNA의 돌연변이체 비율에 의해 결정되었습니다. 평균 ΔC_T 값이 표 28에 나와 있으며, 돌연변이 반응들 간에 교차 반응이 있음을 보여줍니다. 12ALA 돌연변이는 증폭되었으며 12CYS, 12SER 및 12VAL 반응의 ΔC_T 임계값보다 낮은 ΔC_T 값을 생산했습니다. 12VAL 돌연변이는 증폭되었으며, 12ALA 반응의 ΔC_T 임계값보다 낮은 ΔC_T 값을 생산했습니다.

모든 사례에서 테스트 결과는 서로 짝을 이루는 돌연변이 반응에서 돌연변이 판정이 정확했음을 보여줍니다(즉, 최저 ΔC_T 값이 정확한 돌연변이 판정임). 다른 모든 테스트 사례는 검출되지 않았거나 ΔC_T 임계값 밖에 있었습니다.

표 28. 높은 입력 범위의 FFPE 세포주 DNA를 사용한 돌연변이 반응들 간의 ΔC_T 교차 반응 분석항목 ΔC_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 ΔC_T 는 굵게 표시되었습니다. 빈칸은 교차 반응이 없음을 나타냅니다.

컷오프보다 낮은 교차 반응적 반응들의 ΔC_T 는 강조 표시되었습니다.

반복성 및 재현성

therascreen KRAS RGQ PCR Kit의 정밀성을 CLSI EP12-A 및 EP5-A2의 측면을 포함하는 프로토콜을 사용하여 결정했습니다(22, 23). 임상 CRC 샘플을 이 평가에 사용했습니다. 한 개의 야생형과 각 돌연변이마다 한 개의 샘플을 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 사용하여 테스트했습니다. 3개 기관에서 각각 2명의 실시자가 모든 샘플 및 대조물질을 3개 로트의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 5일간 매일 하루 2회 테스트 실행했으며, 각 실행당 각 샘플의 2개 복제본을 사용했습니다. 각 샘플의 각 반응에 대해 얻은 C_T 및 ΔC_T 값도 분산 성분 분석을 통해 분석했습니다.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit의 재현성은 저수준 돌연변이체(3xLOD) 및 야생형 샘플에서 입증되었으며, 실험실 실험 이내 및 실험 간에 여러 로트, 플랫폼 및 실시자에 걸쳐 모든 분석항목에서 최소 39/40의 정확한 돌연변이 판정이 나왔습니다. C50 및 3xLOD 샘플을 사용하여 입증된 분산 추정치(1x 표준편차)는 표 29 및 에 나와 있습니다.

표 29. 분석항목 분산 추정치

분석	ΔCt의 %CV		돌연변이 Ct의 %CV		대조군 Ct의 %CV		
	3xLOD	C50	3xLOD	C50	3xLOD	C50	WT
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 30. 반복성 정밀성 추정치

분석	ΔCt의 %CV		돌연변이 Ct의 %CV		대조군 Ct의 %CV		
	3xLOD	C50	3xLOD	C50	3xLOD	C50	WT
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 샘플을 테스트한 3xLOD 샘플의 추정 비율을 보고했습니다. 모든 분석 및 샘플 조합에서 80개의 복제본 중 최소 79개가 정확한 돌연변이 판정을 받았습니다. 정확한 판정의 전체 비율은 99.6%(1115/1120)으로, 돌연변이 양성 (3xLOD) 샘플이 99.6%(558/560)였고, 돌연변이가 검출되지 않은 (야생형) 샘플이 99.5% (557/560)였습니다().

표 31. 전체적 정확한 판정

돌연변이	정확한 판정	
	3xLOD 샘플	야생형 샘플(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

샘플 처리 변동성

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

KRAS 돌연변이 판정과 관련한 3개 기관 간의 일치율은 99.33%였습니다. 각 분석항목에서 ΔC_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 샘플의 표준 편차(Standard Deviation, SD)를 사용한 평균 ΔC_T 값의 사이트별 비교는 결과에서의 매우 근접한 일치를 보여주었습니다(표 32 및 표 33). 이런 결과는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit와 관련한 DNA 추출 절차 및 샘플 처리의 일치도를 보여줍니다.

표 32. 돌연변이 유형 샘플의 평균 ΔC_T (SD) 값의 사이트별 비교

	ΔC_T (표준편차)						
	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 33. 야생형 샘플의 평균 ΔC_T (SD) 값의 사이트별 비교

	ΔC_T (표준편차)						
	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 3개 로트의 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit(FFPE 추출 키트) 및 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit가 각 로트의 FFPE 추출 키트를 사용하여 평가되었습니다. DNA는 3개 로트의 FFPE 추출 키트를 사용하여 FFPE 세포주로부터 추출했으며, 대략 23, 26 및 31의 목표 대조 C_T 값을 갖는 DNA 샘플들을 만들었습니다. 이런 C_T 값은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에서 정의된 작동 범위의 총 DNA 입력 수준에 걸치도록 선택되었습니다(대조 C_T 는 21.92~32.00 이내). 각 목표 C_T 값에서의 여섯 개의 복제본 추출을 3개의 독립적 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로트로 각각 테스트했습니다. ΔC_T 값 및 돌연변이 판정을 모든 테스트 샘플에서 수집했습니다. 사전 정의된 연구 목표는 유효한 테스트의 100%에서 관찰된 정확한 돌연변이 판정으로 충족되었으며, 이것은 샘플 돌연변이 판정이 다양한 로트의 FFPE 추출 키트 및/또는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 사용하는 것에 영향을 받지 않음을 확인해 주었습니다.

비소세포폐암 시료의 성능 특징

분석 성능

검출 한계(Limit of Detection, LOD)

therascreen KRAS RGQ PCR Kit의 LOD 값은 이전에 FFPE 세포주에서 추출한 DNA를 사용하여 결정되었습니다. 이 연구의 목적은 DNA 농도가 제한 인자가 아닐 때, 비소세포폐암 시료를 사용하여 각 돌연변이 분석의 LOD가 야생형 DNA의 배경에서 10% 돌연변이 함량 이하임을 재검증하는 것입니다. LOD 재검증은 세포주 샘플 혼합물(12ALA, 12SER, 13ASP) 및 임상 FFPE 비소세포폐암 샘플(12ASP, 12ARG, 12CYS, 12VAL)을 사용하여 수행되었습니다. 추적 관찰 연구에서는 12ALA, 12SER, 13ASP 돌연변이를 나타내는 임상 샘플이 사용되었습니다. 돌연변이 양성 테스트 샘플에서 추출한 DNA 및 야생형 샘플(희석제로 사용)이 중간 DNA 투입 수준으로 정규화되었습니다. 그런 다음 돌연변이 양성 샘플을 낮은 수준의 돌연변이 DNA 함량으로 희석하였습니다(이전에 결정된 LOD로 정의됨). 돌연변이 양성 DNA 샘플은 대조 반응 혼합물 및 관련 돌연변이 반응 혼합물을 사용하여 테스트했습니다. LOD 돌연변이 함량 수준으로 희석한 비소세포폐암 샘플은 관찰된 돌연변이 양성 검출률에 대해 편측 정확 95% 신뢰 상한이 95% 이상으로 다음에 나와 있는 결장직장암 샘플 LOD 값을 재검증했습니다.

세포주 상관 관계 연구

이 연구의 목적은 FFPE 세포주 샘플에서 추출한 DNA 및 임상 FFPE 비소세포폐암 조직 샘플에서 추출한 DNA에 대해 확립된 검출 한계(Limit of Detection, LOD), 그 미만 및 초과에서의 적중률과 비교하여 임상 FFPE 비소세포폐암 샘플의 적절한 대체재로서 FFPE 비소세포폐암 세포주 샘플의 유용성을 결정하는 것입니다. 또한 이 연구는 FFPE 세포주 샘플이 KRAS 키트를 사용하여 검사했을 때 임상 FFPE 비소세포폐암 샘플보다 성능이 떨어지지 않음을 입증하기 위해 수행되었습니다.

본 연구는 두 KRAS 돌연변이 양성 FFPE 세포주 샘플(KRAS Kit로 양성 검출)과 동일한 돌연변이 상태의 두 KRAS 음성 FFPE 샘플을 사용했습니다. C100(1.5xLOD), C95(LOD), C75, C50, C25, C5 비율의 정확한 돌연변이 판정을 제공할 것으로 예상되는 여섯 개의 희석 수준으로 각 샘플 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 샘플 간에 성능의 차이가 없음을 나타내지 않았습니다. 그러나 KRAS G12C 돌연변이의 경우, 세포주의 양성 비율이 여러 다른 희석 수준에서 임상 샘플보다 낮았고, 세포주가 임상 샘플보다 성능이 우수하지 않음을 입증했습니다. 12ASP 및 12CYS 세포주는 해당 임상 샘플보다 성능이 우수하지 않았기에 연구 허용 기준이 충족되지 않았고, 이러한 세포주는 검증 연구를 위해 임상 샘플을 사용할 수 없을 때 대체재로 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 34).

표 34. 생어와 KRAS RGQ 결과 간 상관 관계

생어 상태	KRAS 상태		
	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 샘플, FNA 및 CNB의 혼합을 나타내는 입수한 360개의 임상 비소세포폐암 FFPE 샘플이 KRAS Kit와 생어 양방향 염기서열 분석 간의 일치율을 평가하기 위해 사용되었습니다. DNA를 각 샘플에서 추출하여 KRAS Kit 및 양방향 생어 염기서열 분석으로 테스트했습니다. 360개의 유효한 샘플 중, 340개의 샘플이 KRAS Kit와 양방향 염기서열 분석 간에 일치하는 결과를 생성했습니다. 이러한 일치하는 샘플 중 두 개에서 하나는 KRAS Kit에 돌연변이 판정을 보였지만 양방향 생어 염기서열 분석에는 이중 돌연변이로 나왔습니다. 이 중 하나가 KRAS Kit의 한 판정과 일치하였고, 따라서 이 샘플에는 일치하는 결과가 나왔습니다.

표 35에 표시된 것처럼 PPA는 98.75%(94.21, 99.94), NPA는 93.21%(90.20, 95.51), OPA는 94.44%(92.03, 96.29)였습니다.

표 35. 생어와 KRAS Kit 모두에서 유효한 결과가 있는 샘플의 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

20개의 불일치 샘플이 있었습니다. 19개는 양방향 생어 염기서열 분석에 WT였지만 KRAS 키트에서는 돌연변이 결과가 나왔습니다. 한 샘플은 KRAS 키트에 WT였지만 양방향 생어 염기서열 분석에 돌연변이 양성(13ASP) 상태가 나왔습니다.

샘플 획득의 등가성

이 연구의 목적은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 결정되는 비소세포폐암 샘플의 돌연변이 판정이 샘플 획득 방법에 영향을 받는지 평가하는 것이었습니다. 이 연구에서 평가한 3가지 샘플 획득 방법은 절제, FNA, CNB였습니다.

이 연구를 위해, 수술적 절제(RES) 종양 샘플에서 '환자 일치(patient-matched)' CNB 및 FNA 샘플을 추출하여 3가지 획득 방법으로 동일한 종양을 수집할 수 있게 했습니다. 각 샘플은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 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 36).

표 36. 샘플 획득 방법 간 일치(3가지 획득 방법 모두를 사용한 유효한 샘플 포함)

비교	일치율	빈도	비율(%)	양측 신뢰 하한(%)	양측 95% 신뢰 상한(%)
CNB를 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
CNB를 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
FNA를 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
FNA를 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
RES를 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
RES를 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 샘플 획득 방법 간의 Ct와 ΔCt 값을 비교했습니다. 회귀 분석 결과, Ct 또는 ΔCt 에 대해 RES, CNB, FNA 샘플 유형 간에 일관되거나 비례적인 차이가 존재함을 시사하는 증거가 없는 것으로 나타났습니다. 선형 회귀 분석 또한 실시하여 관련 ΔCt 값에 대해 괴사 및 종양 조직의 비율에 영향이 있는지 조사했습니다. 괴사 및 종양 비율 대 ΔCt 에 대한 회귀선 기울기는 괴사 또는 종양 조직 비율이 증가할 때 ΔCt 값에 의미 있는 변화가 있음을 시사하는 증거가 없음을 나타냅니다.

반복성 및 재현성

검사실 내 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 정밀성(반복성)을 평가하였습니다. 돌연변이 결과의 올바름과 ΔC_T 값의 정밀도(돌연변이 반응과 대조 반응 간 C_T 값의 차이)가 모두 보고되었습니다.

총 15개 패널 멤버를 준비했으며 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit(LOD 및 2xLoD에서), 그리고 야생형(Wild Type, WT) 패널 멤버로 7개 돌연변이 각각에 대해 한 개가 검출되었습니다. 돌연변이 패널 멤버는 가용성에 따라 FFPE 세포주나 임상 샘플로 대표되었습니다. 모든 샘플은 27의 대조물질 Ct로 정규화되었고 돌연변이 샘플은 야생형 DNA에 희석하여 1xLoD 및 2xLoD의 돌연변이 수준의 샘플을 위해 충분한 재료를 생성했습니다.

각 검사 패널에 대한 정확한 판정 비율은 표 37에, 분산 성분 값은 표 38에 나와 있습니다.

표 37. 올바른 돌연변이 판정 비율

그룹화 변수		비율		양측 95% 신뢰 한계	
샘플 수준	분석	분수	비율(%)	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 38. SD 및 %CV에 대한 분산 성분 - 반복성

분서 번호	샘플 수준	분서	관찰 수	평균	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	진류*	총계
ΔC _T	2xLoD	12ALA	28	5.54	(0.0000, 0.000%)	(0.1221, 2.20%)	(0.0443, 0.80%)	(0.0385, 0.70%)	(0.0000, 0.00%)	(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%)	(0.0000, 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, 0.69%)	(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%)	
	LoD	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%)	
		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%)	
LoD	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%)		

표 38. SD 및 %CV에 대한 분산 성분 - 반복성 (계속)

분서 번호	샘플 수준	분서	관찰 수	평균	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	진류*	총계	
조류색CT	2xLoD	13ASP	38	6.26	(0.3433, 5.48%)	(0.1227, 1.96%)	(0.0778, 1.24%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.3459, 5.52%)	(0.4738, 7.57%)
		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	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, 0.73%)	(0.0000, 0.00%)	(0.2258, 0.68%)	(0.3864, 1.17%)		

표 38. SD 및 %CV에 대한 분산 성분 - 반복성 (계속)

분서 번호	심플 수준	분서	관찰 수	평균	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	진류*	총계
노란색CT	2xLoD	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,	
	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%)	(0.2912, 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, 1.120%		
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%		

표 38. SD 및 CV에 대한 분산 성분 - 반복성 (계속)

분서 번수	샘플 수준	분서	관찰 수	평균	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	검사일 간*	잔류*	총계
		12SER	40	33.08	(0.1254, 0.38%)	(0.2847, 0.86%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 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%)	(0.0000, 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%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1925, 0.58%)	(0.2804, 0.85%)
노란색CT	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%)	(0.0000, 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%)	(0.0000, 0.00%)	(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%)	(0.0000, 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%)	(0.0000, 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%)	(0.0000, 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%)	(0.0000, 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%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1651, 0.49%)	(0.2078, 0.62%)

* SD, %CV

검사실 간 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 정밀성(재현성)을 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, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit 로트, 22일간 비연속으로 사이트당 총 88회 실행을 산출하기 위한 하루당 실행 횟수에 따라 달랐습니다.

올바른 돌연변이 판정 비율은 표 39에 보고되어 있습니다. 정량적 정밀도 값은 표 40에 나와 있습니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 총 재현성은 표 40의 총 횟수(SD, CV%) 열에 나와 있습니다.

표 39. 모든 기관에서의 올바른 돌연변이 판정 비율

그룹화 변수		비율		양측 95% 신뢰 한계	
샘플 수준	분석	분수	비율(%)	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	119/120	99.17	95.44	99.88
	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 40. SD 및 %CV에 대한 분산 성분 - 재현성

분석 변수	샘플 수준	분석	관찰 수	평균	기관간	기관내 검사 일관성	기관내 실행 N간	기관내 R ² 간	검사일키트 로트간	검사일작업 자간	잔류*	총계	
ΔC _T	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%)	(0.2929, 5.67%)	(0.2967, 6.16%)	
	2xLoD	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%)	
	2xLoD	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%)	
	2xLoD	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	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%)
	LoD	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%)	(0.0000, 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%)	
LoD	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%)		

표 40. SD 및 %CV에 대한 분산 성분 - 재현성 (계속)

분석변수	샘플수준	분석	관찰수	평균	기관간	기관내 검사 일간*	기관내 실행 시간*	기관내 R ₉₅ 간*	검사일키트 로트간*	검사일작업 자간*	잔류*	총계
조류색 C _T	2xLoD	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%)
		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%)
	2xLoD	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%)
	2xLoD	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%)
	LoD	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%)

표 40. SD 및 %CV에 대한 분산 성분 - 재현성 (계속)

분석번호	샘플수준	분석	관찰수	평균	기판간	기판내 검사 일간*	기판내 실행 기간*	기판내 RGA 간*	검사일키트 로트간*	검사일작업 자간*	잔류*	총계
노란색 CT	2xLoD	12CVS	120	33.19	(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%)	(0.2433, 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%)	(0.1645, 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%)	(0.3569, 1.08%)	(0.0649, 0.20%)	(0.1565, 0.47%)	(0.2588, 0.78%)	(0.4894, 1.48%)	
	2xLoD	12ALA	84	33.25	(0.0706, 0.21%)	(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	33.07	(0.0000, 0.00%)	(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	32.98	(0.0000, 0.00%)	(0.1706, 0.52%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0797, 0.24%)	(0.1795, 0.54%)	(0.2616, 0.79%)	
		12CVS	84	33.20	(0.0000, 0.00%)	(0.1781, 0.54%)	(0.0000, 0.00%)	(0.0000, 0.00%)	(0.1454, 0.44%)	(0.1723, 0.52%)	(0.2939, 0.89%)	
	LoD	12SER	84	32.91	(0.0000, 0.00%)	(0.1101, 0.33%)	(0.0669, 0.20%)	(0.0677, 0.21%)	(0.1186, 0.36%)	(0.2274, 0.69%)	(0.2916, 0.89%)	
		12VAL	84	33.17	(0.0688, 0.21%)	(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	33.10	(0.0000, 0.00%)	(0.0482, 0.15%)	(0.2035, 0.61%)	(0.0466, 0.14%)	(0.1460, 0.44%)	(0.1688, 0.51%)	(0.3019, 0.91%)	
		12ALA	119	33.33	(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%)	

표 40. SD 및 %CV에 대한 분산 성분 - 재현성 (계속)

분서번호	샘플수준	분서	관찰수	평균	기관간	기관내 검사 일간*	기관내 실행 기간*	기관내 RGA 간*	검사일키트 로트간*	검사일작업 자간*	잔류*	총계
	12ARG	120	33.15	(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	32.96	(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	33.26	(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	33.01	(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	33.25	(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	33.16	(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%)	
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%)	

표 40. SD 및 %CV에 대한 분산 성분 - 재현성 (계속)

분석변수	샘플수	분석	관찰수	평균	기관간	기관내 검사 일간*	기관내 실행 N간*	기관내 RQ 간*	검사일키트 로트간*	검사일작업 자간*	잔류*	총계
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%)

* SD, %CV

분석 정확도(임상 샘플 사용)

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

분석에 사용된 319개의 샘플은 Amgen 임상 연구 20170543의 임상 샘플과 입수한 비소세포 폐암 샘플이 조합되어 있었습니다. 두 방법 모두, G12C 이외의 결과를 반환한 샘플이 이 분석에 대해 돌연변이 음성인 것으로 간주되었습니다. 319개의 샘플 중 5개가 ddPCR로 유효하지 않았습니다.

상응하는 양측 95% 신뢰 구간(Confidence Interval, CI)과 함께 OPA, NPA, PPA가 표 41에 요약되어 있습니다. OPA는 97.45%였습니다. 결과 분석은 표 42에 요약되어 있습니다.

표 41. KRAS 키트 대 ddPCR의 OPA, PPA 및 NPA(양측 95% 신뢰 구간)

그룹화 변수	비율		양측 95% 신뢰 한계	
	분수	비율	하한	상한
전체 일치율 (Overall Percentage Agreement, OPA)	306 / 314	97.45%	95.04%	98.89%
양성 일치율(Positive Percent Agreement, PPA)	149 / 150	99.33%	96.34%	99.98%
음성 일치율 (Negative Percent Agreement, NPA)	157 / 164	95.73%	91.40%	98.27%

표 42. 2x2 빈도 표 KRAS 키트 대 ddPCR

therascreen KRAS G12C 결과		ddPCR G12C 결과		
빈도	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 샘플에서 배경 증폭 수준을 평가하는 것이었습니다. 높은 DNA 투입 수준에서 임상 야생형인 60개 복제물 모두의 비특이적 증폭으로부터 관찰된 ΔC_t 값은 반응 혼합물 컷오프 값을 초과했습니다. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit. 는 60개 야생형 복제물을 모두 No Mutation Detected(돌연변이가 검출되지 않음)(야생형)으로 올바르게 식별했습니다.

투입 DNA의 영향

DNA 입력 수준은 샘플의 증폭 가능한 *KRAS* DNA(돌연변이 및 야생형 모두) 총량입니다. 이는 대조 반응의 C_T 값으로 결정됩니다. 여러 다른 총 DNA 수준의 샘플은 동일한 비율의 돌연변이 DNA를 포함하고 있으며, 측정된 ΔC_T 값(즉, 돌연변이 반응과 대조 반응 간 C_T 값의 차이)는 여전히 일관되게 유지될 것이므로 샘플 돌연변이 결과는 DNA 입력 수준에 의존적이거나 그 영향을 받지 않을 것으로 예상됩니다. 이 연구는 2개의 파트로 구성되었습니다.

파트 1은 입력 DNA 수준이 ΔC_T 값에 미치는 영향을 설명하기 위해 설계되었습니다. 아홉 개의 FFPE 비소세포암 샘플(4개 세포주 및 5개 임상)에서 추출한 DNA가 이 연구에서 사용되었습니다. 샘플을 약 20.00~21.00 C_T 의 대조 반응 C_T 값으로 희석했고 이로부터, 6개 복제물에 충분한 각 돌연변이의 DNA 풀을 약 32.00~33.00 C_T 의 C_T 값에 해당하는 4개 지점에 걸쳐 10배로 연속적으로 희석했습니다).

표 43. ΔC_T 값의 투입 DNA 수준에 대한 연구를 위한 희석 시리즈

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

이 범위는 샘플의 DNA 입력 범위(21.92~32.00 C_T의 대조 반응 C_T)에 걸치도록 설계되었고, 허용 DNA 농도보다 높은 희석 지점 한 개와 허용 DNA 농도보다 낮은 희석 지점 한 개를 포함합니다. 각 돌연변이에 대한 5개의 DNA 투입 수준은 모두 대조 반응 혼합물 및 해당 돌연변이 반응 혼합물을 사용하여 단일 PCR 실행에서 테스트했습니다.

대조물질 C_T 작동 범위 내 희석물 전반에 걸쳐 각 돌연변이 유형에 대한 ΔC_T 값을 보여주는 선형 회귀 그래프가 생성되었습니다. 대조물질 C_T 작동 범위 내 3개 희석물에 대한 선형 회귀선과 해당 양측 95% 신뢰 한계가 반복성 및 재현성 연구에서 계산된 대로 재현성에 대해 평균 ± 1.96x 표준 편차 내에 있었으므로 연구의 파트 1에 대한 연구 허용 기준이 모든 돌연변이에 대해 충족되었습니다. 모든 분석에 대해 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 작동 범위에서 ΔC_T 값이 일관되게 나타나 DNA 투입 수준이 샘플 돌연변이 판정에 영향을 미치지 않음을 보여줍니다.

연구의 파트 2는 높은 DNA 투입 수준(약 23.00 C_T의 대조 반응)에서 다양한 돌연변이 비율로 샘플을 테스트하여 증폭 효율에 대한 돌연변이 양성 샘플 연속 희석의 영향을 평가하기 위해 설계되었습니다. 임상 FFPE 비소세포폐암 및 FFPE 세포주 샘플 풀의 DNA를 약 22.00~23.00 C_T의 대조 반응 C_T 값에 해당하는 광학 농도로 희석했습니다. 돌연변이 DNA를 정규화된 야생형 DNA가 되도록 2배로 연속적으로 희석하여 다양한 돌연변이 비율(100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% 돌연변이 비율을 목표로 함)의 돌연변이 DNA 샘플 당 5개의 희석 시리즈를 생성했습니다.

표 43는 각 분석에 대한 모든 증폭 효율을 요약합니다. 샘플에 있는 돌연변이 DNA와 비교한 야생형 DNA의 증폭 효율은 ΔC_T 값에 영향을 미치지 않았으므로 돌연변이 판정도 영향을 받지 않았습니다.

표 44. 돌연변이 분석항목의 증폭 효율

샘플	증폭 효율
12ALA	0.921
12ASP	1.034
12ARG	1.039
12CYS	0.988
12SER	1.047
12VAL	1.082
13ASP	1.085

비특이적 증폭/교차 반응/배타성: 돌연변이 양성 KRAS DNA

대조 반응 C_T 가 약 23이 되도록 각 FFPE 세포주로부터 DNA 샘플을 준비하여 고농도의 입력 DNA를 가진 돌연변이 샘플을 모든 반응 혼합물에 대해 테스트했습니다. 각 돌연변이 샘플의 여섯 개의 복제본을 평가했습니다. 샘플의 돌연변이 비율은 세포주 DNA의 돌연변이체 비율에 의해 결정되었습니다. 평균 ΔC_T 값이 표 45에 제공되었으며, 돌연변이 반응들 간에 교차 반응이 있음을 보여줍니다. 12ALA 돌연변이는 증폭되었으며 12CYS, 12SER 및 12VAL 반응의 ΔC_T 임계값보다 낮은 ΔC_T 값을 생산했습니다. 12VAL 돌연변이는 증폭되었으며, 12ALA 반응의 ΔC_T 임계값보다 낮은 ΔC_T 값을 생산했습니다. 12CYS 돌연변이는 증폭되었으며, 12ARG 반응의 ΔC_T 임계값보다 낮은 ΔC_T 값을 생산했습니다. 모든 사례에서 테스트 결과는 서로 짝을 이루는 돌연변이 반응에서 돌연변이 판정이 정확했음을 보여줍니다(즉, 최저 ΔC_T 값이 정확한 돌연변이 판정임). 다른 모든 테스트 사례는 검출되지 않았거나 ΔC_T 임계값 밖에 있었습니다.

표 45. 교차 반응 비소세포폐암

분석

샘플	컷오프	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

샘플 처리 변동성

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

이전 연구에서 이 돌연변이들을 대표하는 세포주 샘플을 사용한 것처럼 12ALA, 12ARG, 12SER 및 13ASP 돌연변이를 대표하는 임상 FFPE 임상 비소세포폐암 샘플을 사용하여 추가 샘플 처리 연구를 수행했습니다. 이 추가 연구는 이전 연구와 동일한 연구 설계를 따랐습니다. 세 개의 개별 테스트 기관에서의 12ALA, 12ARG, 13ASP 돌연변이 샘플에 대한 모든 샘플 준비는 KRAS Kit를 사용하여 테스트했을 때 올바른 돌연변이 판정을 제공했습니다. 이러한 샘플에 대한 전체 올바른 판정은 100%였습니다. 12SER 돌연변이에 대한 샘플 준비는 세 개의 개별 테스트 기관에서 28/30(93.33%와 동등한 올바른 판정 비율)의 올바른 돌연변이 판정의 빈도를 제공했습니다. 이런 결과는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 사용하여 테스트를 수행하는 데 사용되는 DNA 추출 절차 및 샘플 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 Kit를 여러 다른 로트로 사용 시 테스트한 샘플의 샘플 돌연변이 상태에 영향이 없음을 입증하는 것이었습니다. 각 키트의 세 로트를 사용하여 FFPE 비소세포폐암 샘플을 검사했으며, QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit와 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 다른 로트를 사용해도 검사된 샘플의 돌연변이 상태에 영향을 미치지 않는 것을 확인했습니다. 스물네(24) 개의 비소세포폐암 샘플(*therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 검출된 일곱 개의 돌연변이에 대해 각 세 개 + 세 개의 야생형 샘플)이 연구에서 사용되었습니다. 각 샘플은 세 개 로트의 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit를 사용하여 추출했습니다. 모든 DNA 추출은 RGQ 기기의 동일한 PCR 실행 내에서 각각 세 개 로트의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 사용하여 테스트했습니다.

ΔC_T 값(돌연변이 반응과 대조 반응 간 C_T 값의 차이) 및 돌연변이 판정은 여러 다른 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit를 사용하여 추출한 모든 테스트 샘플에 대해 수집했고 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 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 샘플로 준비한 절편이 안정적임을 입증하는 것이었습니다. 다섯 개의 *KRAS* 돌연변이 양성 임상 FFPE 비소세포폐암 샘플(돌연변이 12ALA, 12ASP, 12CYS, 12VAL, 13ASP 각각에 대해 한 개)과 한 개의 *KRAS* 야생형 샘플로부터 획득한 샘플 절편을 절단하여 필요할 때까지 보관했습니다. 75주에 걸쳐 다섯 개 지점에서 *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit를 사용하여 절편을 테스트했습니다. 모든 샘플이 모든 지점에서 올바른 돌연변이 상태 판정을 제공했습니다. 이 연구는 FFPE 절편이 상온에서 최소 70주 동안 안정적임을 입증했습니다.

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

이 연구에서는 *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit로 검출된 일곱 개의 *KRAS* 돌연변이에 대해 야생형인 FNA 샘플을 사용했습니다. 열 개의 *KRAS* 야생형 샘플로부터 획득한 절편을 사용했습니다. 이러한 샘플은 한 개 로트의 QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit를 사용하여 추출했습니다. DNA를 추출하여 T0에서 테스트한 다음 T1(T0+52주), T2, T3에서 테스트했으며, 이 작업은 T1 이후 추가 여덟 주에 걸쳐 수행되었습니다. 이 연구 중에 획득한 결과는 올바른 조건에서 보관 시 FFPE 비소세포폐암 FNA 샘플이 최소 56주 동안 안정적이라는 증거를 제공합니다.

간섭 물질

이 연구는 *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit를 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, 단백분해효소 K, Buffer AL, Buffer AW1 및 Buffer AW2였습니다. 각 물질은 여덟 개의 FFPE 세포주에서 추출한 DNA를 사용하여 테스트했으며, *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit로 검출된 각 일곱 개의 돌연변이 및 야생형 샘플을 대표했습니다. 돌연변이 샘플은 검출 한계의 약 세 배(3xLOD)에 해당하는 수준에서 테스트했습니다. 두 분석물질 모두(돌연변이 및 야생형 샘플)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 ATE로 스파이크했습니다. 연구는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에 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 샘플 대부분(58/64 조건, 1x 수준)에 대해 평균 ΔC_T 차이에 통계적으로 유의한 영향을 미치지 않았음을 입증했습니다. 통계적으로 유의미한 차이를 보인 여섯 개 샘플의 경우, 각 샘플의 평균에서 관찰된 차이는 연구 허용 기준인 $\pm 2 \times SD$ (재현성 연구에서 가져온 SD 추정치) 이내였습니다.

헤모글로빈(Hb)이 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit에 미치는 영향을 평가하기 위해 추가 연구를 수행했습니다. 이 연구에서는 12ALA, 12ASP, 12ARG, 12VAL, 12CYS, 13ASP 돌연변이에 대해 조달된 임상 절제 샘플을 사용했습니다. 돌연변이의 희귀성으로 인해 12SER 임상 샘플은 평가하지 않았습니다. 임상 *KRAS* 야생형 FFPE 샘플은 연구 샘플 세트에 통합하여 돌연변이 음성 상태인 샘플에서의 잠재적 간섭을 평가했습니다. 테스트 샘플은 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-A2에서 2g/L로 선택되었습니다. 이 연구는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 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 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 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 소화 시간

이 연구의 목적은 다양한 단백질분해효소 K 소화 시간(50, 55, 60, 65, 70분)에 대해 *therascreen* KRAS RGQ PCR System의 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) 샘플(네 개 FFPE 세포주 및 네 개 임상 FFPE 비소세포폐암 샘플)을 FFPE 추출 Kit를 사용하여 추출했고 한 개 로트의 KRAS Kit 비소세포폐암을 사용하여 테스트했습니다(6개 복제물). 샘플의 DNA 투입 수준은 KRAS Kit 대조 반응 혼합물을 사용하여 측정했습니다. 돌연변이 샘플은 대조 반응 혼합물 및 관련 돌연변이 반응 혼합물을 사용하여 테스트했고 WT 샘플은 KRAS 키트의 여덟 개 반응을 모두 사용하여 테스트했습니다. ΔC_T 값(돌연변이 반응과 대조 반응 간 $FAM C_T$ 값 차이) 및 모든 샘플에 대한 돌연변이 판정을 각 소화 시점에 획득했습니다.

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

12ARG 돌연변이를 대표하는 데 체장 세포주를 사용한 초기 연구에서의 결함을 설명하기 위해 12ARG 돌연변이(인간 폐 세포주 FFPE 샘플 사용)를 평가하는 추가 연구도 수행했습니다. KRAS 키트로 검출된 12ARG 돌연변이를 대표했던 FFPE 세포주 샘플을 이 연구에서 테스트했습니다. 위에 설명된 연구와 비슷하게 55분, 60분, 65분, 70분 동안 처리된 샘플을 평가했습니다. 모든 반응 복제물(144개)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 샘플(12ALA, 12ASP, 12ARG, 12CYS, 12SER, 12VAL, 13ASP 및 WT), 양성 대조물질(Positive

Control, PC) 및 템플릿 없는 대조물질(No Template Control, NTC)을 사용했습니다. KRAS Kit의 각 PCR 성분의 부피(즉, 각 반응 혼합물, 샘플 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 23개의 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 다양했지만 기타 모든 성분은 표준 용량으로 사용했을 때, 돌연변이 판정에 변화가 없었고 모든 평균 ΔC_T 의 차이는 12ASP 이외의 다른 모든 분석항목에 대해 반복성 및 재현성에서 $\pm 2x$ 의 관찰된 중간 정밀도 내에 있었습니다. -21% Taq에 대한 용적 허용범위 수준에서 12ASP 분석으로 얻은 결과는 허용 기준을 통과하지 못했습니다. 12ASP 샘플은 $\pm 8\%$ 용적 허용범위의 허용 기준을 충족했으므로 이 반응에 대해 이 수준으로 설정했습니다.

12ARG 돌연변이를 대표하는 데 체장 세포주를 사용한 초기 연구에서의 결함을 설명하기 위해 12ARG 돌연변이(인간 폐 세포주 FFPE 샘플 사용)를 평가하는 추가 보호대역 연구도 수행했습니다. KRAS 키트로 검출된 12ARG 돌연변이를 대표했던 FFPE 세포주 샘플을 이 연구에서 테스트했습니다. 샘플은 23개의 테스트 조건 모두를 사용해서 3회 반복 테스트했습니다. 위양성 또는 위음성 결과를 초래할 가능성이 가장 높은 조건을 다시 만들기 위해, 여러 성분의 용량(반응 혼합물, Taq, 샘플)을 동시에 변경했습니다. 연구의 허용 기준은 여러 다른 PCR 성분 수준 간 평균 델타 C_T 값의 차이가 영과 유의하게 차이가 있거나 추정치가 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 시약 용량 허용범위 차이를 견디기에 충분히 강건함을 입증했습니다(다른 모든 인자가 일정할 때).

임상적 성능

therascreen KRAS RGQ PCR Kit는 KRAS 유전자의 코돈 12와 13에서 7가지의 KRAS 돌연변이를 특이적으로 검출하도록 고안되었습니다. 이는 이들 코돈에서 야생형 서열을 특정적으로 검출하도록 고안되지 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 7가지 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 Kit로 검출된 7가지 돌연변이에 대하여 음성인 환자를 말합니다(즉, 샘플이 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 동정되지 않은 돌연변이를 KRAS 유전자에 갖고 있을 수 있음).

Erbitux(세특시맵)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구

Erbitux(세특시맵)을 사용한 치료를 위해 환자를 선택할 수 있도록 하는 동반 진단 테스트로서의 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit의 임상적 유용성을 지지하기 위한 데이터를 생성하기 위해 한 건의 임상적 성능 연구가 수행되었습니다. Erbitux(세특시맵)의 안전성과 효과는 CA225025 연구에서 입증되었습니다. CA225025는 이전에 치료된 EGFR 발현 재발성 전이성 결장직장암(metastatic CRC, mCRC)를 가진 572명의 환자에서 수행된 다기관, 공개 라벨, 무작위 배정 임상시험이었습니다. 환자들은 Erbitux(세특시맵) + 최선의 지지 치료(Best Supportive Care, BSC) 또는 BSC만을 받도록 무작위(1:1) 배정되었습니다. Erbitux(세특시맵)는 처음에 400 mg/m²으로 투여되었으며, 질병 진행이나 용납할 수 없는 독성이 나타날 때까지 매주 250 mg/m²씩 투여했습니다.

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

453/572명(79%)의 환자에서 *KRAS* 돌연변이 상태를 확인할 수 있었습니다. *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit로 평가했을 때 245명(54%)의 환자는 *KRAS* 돌연변이 양성 종양이었고, 208명(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) + BSC의 OS 위험비는 0.63이었습니다. 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 0.91이었으며, 95% CI (0.67, 1.24)였습니다. 결과는 표 46과 그림 3에 나와 있습니다.

표 46. 이전에 치료된 EGFR 발현 전이성 결장직장암(모두 무작위 배정 및 *KRAS* 상태)에서의 전체 생존 기간

	모두 무작위 배정		야생형 <i>KRAS</i> 돌연변이 음성		<i>KRAS</i> 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.

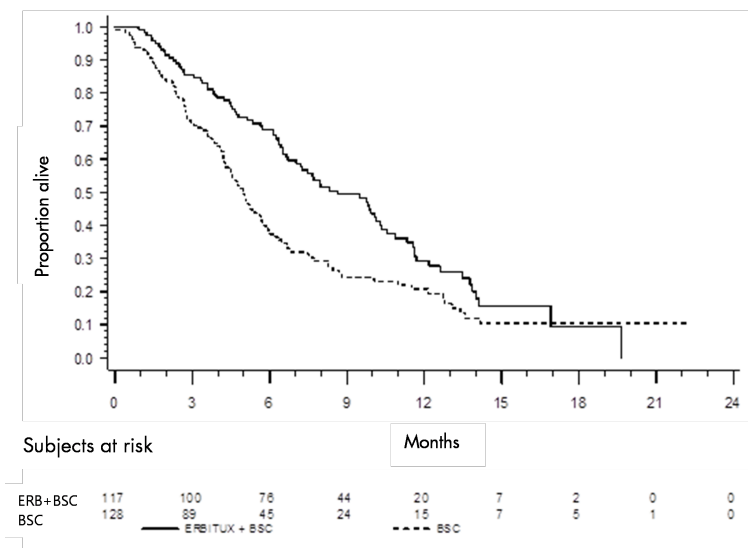


그림 3. KRAS 돌연변이 음성(야생형) 전이성 결장직장암 환자의 전체 생존 기간에 관한 카플란-마이어 곡선.

6개월 및 12개월에서 카플란-마이어 추정치에 기초한 전체 생존율은 KRAS 야생형 하위 집단에서 Erbitux(세특시맵) + 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 Kit의 임상적 유용성을 뒷받침하는 데이터를 생성하기 위해 한 건의 임상적 성능 연구가 수행되었습니다. 이 연구의 목적은 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 결정된 KRAS 돌연변이 상태를 Vectibix(파니투무맵) 치료의 이점을 누릴 수 있는 전이성 결장직장암 환자를 선택하는 데 사용할 수 있는지 평가하는 것이었습니다. 임상시험 20050203은 이전에 치료 받지 않은 재발성 mCRC 환자에서 옥살리플라틴, 5플루오로우라실(5-FU), 루코보린

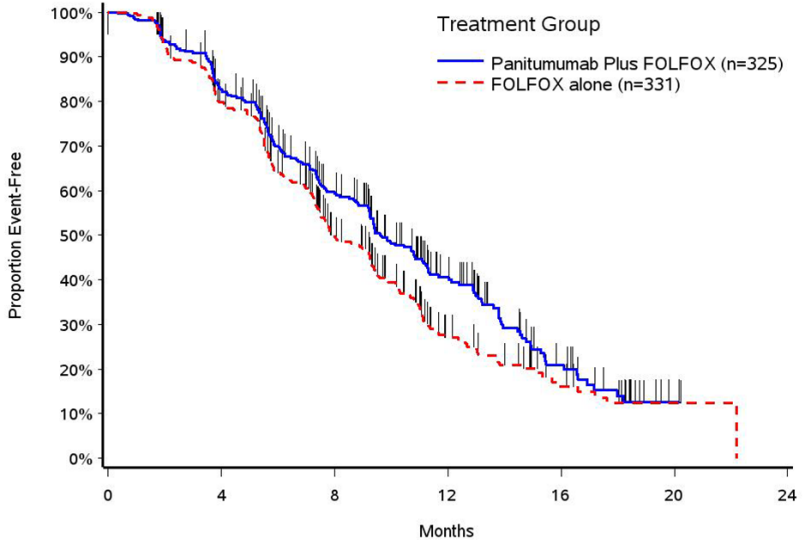
(FOLFOX)과 조합한 파니투무맙의 효능을 FOLFOX 단독 요법과 비교 평가하는 다기관, 전향적, 공개 라벨, 무작위 배정 3상 연구였습니다.

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

미리 지정된 일차 효능 평가항목은 영상에 대한 독립적 중앙 맹검 평가에 의해 평가된 야생형 *KRAS* mCRC 환자군(n = 656)에서의 무진행 생존(Progression-Free Survival, PFS)이었습니다. 다른 주요 효능 평가 항목은 OS 및 ORR이었습니다. 야생형 *KRAS* mCRC 환자에서의 효능 결과가 표 47와 그림 4에 나와 있습니다.

표 47. 야생형 *KRAS* mCRC 환자에서의 효능 결과

	야생형 <i>KRAS</i> 모집단	중앙값(개월) (95% CI)	PFS		ORR (95% CI)
			위험비 (95% CI)	p-값	
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%)



Subjects at risk:

Panitumumab Plus FOLFOX	325	254	156	73	22	1	0
FOLFOX alone	331	242	127	41	16	2	0

그림 4. 야생형 KRAS mCRC 환자의 무진행 생존(Progression-Free Survival, PFS)의 카플란-마이어 곡선.

KRAS 돌연변이 중앙 환자들 중에서 Vectibix(파니투무맵) + FOLFOX를 투여한 221명의 중앙 PFS는 7.3개월(95% CI: 6.3, 8.0)이었으며, FOLFOX를 단독 투여한 219명의 중앙 PFS는 8.8개월(95% CI: 7.7, 9.4)이었습니다(HR = 1.29, 95% CI: 1.04, 1.62). 중앙 OS는 Vectibix(파니투무맵) + FOLFOX를 투여한 환자들이 15.5개월(95% CI: 13.1, 17.6)이었으며, FOLFOX를 단독 투여한 환자들은 19.3개월(95% CI: 16.5, 21.8)이었습니다(HR = 1.24, 95% CI: 0.98, 1.57).

야생형 KRAS mCRC 환자의 82%에서의 이벤트를 기반으로 업데이트된 정보를 사용한 OS 탐색 분석에서 FOLFOX 단독 요법과 비교한 Vectibix(파니투무맵) + FOLFOX 병용 요법의 치료 효과를 추정했습니다. Vectibix(파니투무맵) + FOLFOX를 병용 투여한 야생형 KRAS mCRC 환자 325명의 중앙 OS는 23.8개월(95% CI: 20.0, 27.7)이었으며, FOLFOX를 단독 투여한 331명

의 환자의 중앙 OS는 19.4개월(95% CI: 17.4, 22.6)이었습니다(HR = 0.83, 95% CI: 0.70, 0.98). 결과는 그림 5에 나와 있습니다.

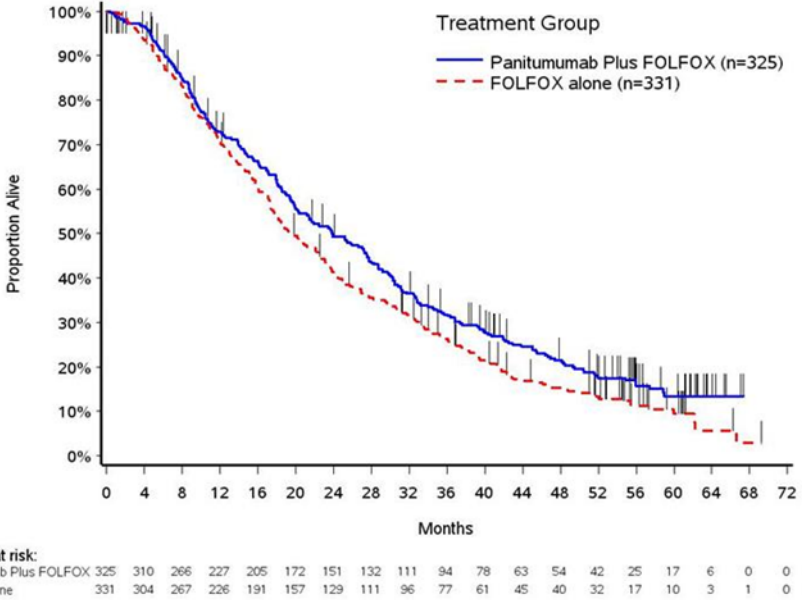


그림 5. 야생형 KRAS mCRC 환자의 전체 생존 기간(Overall Survival, OS) 카플란-마이어 곡선.

비소세포폐암에 대한 LUMAKRAS(소토라십)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구

LUMAKRAS(소토라십)을 사용한 치료를 위한 KRAS G12C positive 양성 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 Kit로 결정된 G12C 돌연변이 상태를 LUMAKRAS(소토라십) 치

료의 이점을 누릴 수 있는 진행성 비소세포폐암 환자를 선택하는 데 사용할 수 있는지 평가하는 것이었습니다. 임상시험 20170543은 *KRAS* G12C 돌연변이를 가진 진행성 고형암 성인 시험대상자에서 LUMAKRAS(소토라십)의 유효성 및 안전성을 평가하기 위해 설계된 공개, 다기관, 제1/2상 연구였습니다. 이 연구의 비소세포폐암 제2상 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 제2상 부분의 일차 평가변수는 고형암의 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, RECIST), 버전 1.1로 평가한 중앙 객관적 반응을 (Objective Response Rate, ORR), *KRAS* G12C 돌연변이 진행성 중앙이 있는 시험대상자에서 단독 요법으로서 LUMAKRAS(소토라십)의 기준을 평가하는 것이었습니다.

총 126명의 비소세포폐암 환자 중 124명의 시험 대상자가 전체 분석군에 포함되었습니다. 두 명의 시험대상자가 눈가림 상태의 독립적 중앙 검토(Blinded Independent Centralized Review, BICR)에 따라 ≥ 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%(45/124명의 시험대상자, 95% CI: 28~45%)였으며, 두(2)명의 시험대상자(2%)가 완전 반응을 달성했고 43명의 시험대상자(35%)가 부분 반응을 달성했다고 평가했습니다.* 카플란-마이어 방법의 반응 지속 기간(Duration Of Response, DOR) 중앙값은 10개월이었습니다 (범위: 1.3+, 11.1).

*2020년 12월 1일 기준 데이터 컷.

비소세포폐암에 대한 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 Kit를 동반 진단으로 사용하는 경우 이 키트의 임상 효능을 입증하기 위한 가교 연구를 수행했습니다. 이 결과는 임상 시험 849-001의 코호트 A에서 관찰된 임상적 효능과 비교되었습니다. 임상 효능은 KRAS G12C 돌연변이 검출, KRAS G12C 돌연변이 미검출, KRAS G12C 돌연변이 미평가 시험대상자에 대한 객관적 반응률(Objective Response Rate, ORR)을 각각 측정하여 평가했습니다.

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

다중 임상시험 분석(Clinical Trial Assay, CTA)에 의해 등록된 코호트 A 시험대상자 총 116명 중 12명은 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 114개를 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 테스트했습니다. 고유한 시험대상자 총 218명(코호트 A에서 104명 및 조달 114명)의 FFPE 조직 시료를 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit로 KRAS G12C 테스트를 수행하도록 중앙 실험실로 보냈습니다.

두 개의 시료는 동일한 조달 시험대상자로부터 얻은 것이므로 총 219개 시료의 KRAS G12C 돌연변이 상태를 테스트했습니다. 코호트 A의 샘플 세 개에는 종양이 없거나 테스트할 샘플이 충분하지 않았습니다. 테스트 가능한 샘플 216개 중 210개에서 평가 가능한 결과가 나왔습니다. 고유 시험대상자 218명 중 209명에게서 평가 가능한 결과가 나왔습니다.

therascreen KRAS RGQ PCR Kit로 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 임상시험 등록 분석(CTA) 간 양성 일치율(Positive Percent Agreement, PPA)과 음성 일치율(Negative Percent Agreement, NPA)을 계산했습니다(PPA: 88.78%, NPA: 100%)(표 48). NPA 100%는 의도된 사용 모집단에서 CDx로 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 48. *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(1)]		88.78% (80.80%, 94.26%)	
음성 일치율[95% CI(1)]		100.00% (96.73%, 100%)	

(1)95% CI는 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 Kit는 Krazati(아다그라시브)를 사용한 치료를 위해 *KRAS* G12C 돌연변이 검출로 환자를 식별하는 데 효능이 있는 것으로 입증되었습니다. 측정 가능한 질병

이 있는 *KRAS* G12C 돌연변이 검출 환자의 일차 객관적 반응률(Objective Response Rate, ORR) 중점은 43%(36/83, 95% CI: (33%, 55%))로, 표준 치료에서 23%로 보고된 가정 응답률을 초과하고 연구 수용 기준을 충족했습니다.

직장결장암에 대한 Krazati(아다그라시브)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구

양성 *KRAS* G12C 돌연변이 테스트 결과를 기반으로 세특시맵과 병용한 Krazati(아다그라시브)를 사용하여 치료할 전이성 직장결장암(mCRC) 진단을 받은 환자를 식별하는 데 *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit를 동반 진단(CDx)으로 사용하는 경우 이 키트의 임상 유용성을 평가하기 위한 가교 연구를 수행했습니다. 가교 연구의 결과는 Mirati Therapeutics가 수행한 1/2상 임상시험 (849-001, KRYSTAL 1)에서 관찰된 임상적 효능과 비교되었습니다. 임상 효능은 1상 하위 연구 및 2상 코호트 G에 등록된 피험자의 전반적인 반응 비율(Overall Response Rate, ORR)을 측정하여 평가했습니다. *KRAS* G12C 돌연변이 검출, *KRAS* G12C 돌연변이 미검출, 미평가/테스트 불능 피험자에 대한 ORR을 각각 측정하여 평가했습니다.

임상시험 849-001은 *KRAS* G12C 돌연변이가 있는 진행성 고형암 환자를 대상으로 한 세특시맵 병용 Krazati(아다그라시브)의 1/2상 다중 확장 코호트 시험이었습니다. 직장결장암 환자는 1상 하위 연구, 1b상 용량 최적화 코호트 및 2상 코호트 G에 등록되었습니다. 2상 코호트 G에 등록된 환자는 이전에 최소한 플루오로피리미딘, 옥살리플라틴, 이리노테칸 및 VEGF/VEGFR 억제제로 치료를 받았습니다. 이 임상시험의 일차 목적은 *KRAS* G12C 돌연변이가 있는 진행성 악성 고형암 환자를 대상으로 Krazati(아다그라시브)의 안전성과 내약성의 특징을 표현하고 Krazati(아다그라시브)의 약동학을 평가하는 것이었습니다. RECIST 버전 1.1의 기준에 따른 ORR은 임상 효능을 평가하는 주요 평가변수였습니다.

환자는 QIAGEN *therascreen* *KRAS* RGQ PCR Kit 이외의 여러 *KRAS* 돌연변이 검출 검사를 기반으로 849-001에 등록되었습니다. 이러한 분석항목은 임상시험 분석(Clinical Trial Assay, CTA)이었습니다. *KRAS* G12C+/- 코호트에 대한 ORR의 비교로 확인된, 임상시험에 사용된 *therascreen* *Kras* Kit(CDx) 및 CTA 간의 일치성을 확립하기 위해 가교 연구가 수행되었습니다.

CTA로 검사한 mCRC가 있는 KRAS G12C+ 대상자 121명으로부터의 샘플은 Mirati 연구 849-001의 1상 하위 연구(피험자 32명), 1b상 용량 최적화(피험자 27명) 및 2상 코호트 G(피험자 62명)에 등록되었습니다. 이 121명의 피험자 중 35개 샘플(1상 14개, 1b상 7개, 2상 14개)은 중앙 조직이 부족하거나 추가 테스트에 대한 동의가 없어 테스트할 수 없었고 *therascreen* KRAS 키트를 사용하여 평가하거나 효능 분석에 포함되지 않았습니다. 1/2상의 86개 테스트 가능 샘플에 추가로 상용 공급 업체로부터 조달한 KRAS G12C가 결과에서 감지되지 않은 91개 mCRC 샘플이 추가되었습니다. 총 177명의 고유한 피험자(Mirati 연구 849-001의 1/2상에서 86명, 조달된 91명)의 FFPE 조직 시료가 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 사용한 KRAS G12C 테스트를 위해 중앙 실험실로 보내졌습니다. 샘플 177개 중 171개에서 평가 가능한 결과가 나왔습니다.

표 49에 나와 있는 것과 같이 임상 가교 연구를 기반으로 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit (CDx)와 임상시험 등록 분석(CTA) 간 양성 일치율(Positive Percent Control, PPA)과 음성 일치율(Negative Percent Control, NPA)을 계산했습니다(PPA: 92.50%, NPA: 100%). CTA와 CDx의 일치하는 CTA를 기준 방법으로 사용했기 때문에 나타납니다.

표 49. *Therascreen* KRAS RGQ PCR Kit(CDx)와 임상시험 등록 분석(CTA) 간 일치율

	CTA 양성, n	CTA 음성, n	총계
CDx 양성, n	74	0	74
CDx 음성, n	6	91	97
총계	80	91	171
양성 일치율[95% CI(1)]		92.50% (84.39%, 97.20%)	
음성 일치율[95% CI(1)]		100.00% (96.03%, 100%)	

(1)95% CI는 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 Kit는 Krazati(아다그라시브) 및 세특시맙을 사용한 치료를 위해 KRAS G12C 돌연변이 검출로 mCRC 환자를 식별하는 데 효능이 있는 것이 일차 유효성 모집단의 피험자를 대상으로 입증되었습니다. 가교 연구에서 측정 가능한 질병이 있는 CDx KRAS G12C 돌연변이 검출 환자의 일차 평가 변수인 ORR은 34.6%(19/55, 95% CI: 22.2%, 48.6%)였습니다. 이 값은 KRYSTAL-1 연구의 수용 기준을 초과했습니다(즉, 표준 치료에서 보고된 가정된 반응 비율이 5%이며 KRYSTAL-1 연구에서 나타난 ORR 값(34.0%)과 비슷했음).

CRC에 대한 파니투무맙 병용 LUMAKRAS(소토라십)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구

Amgen과 QIAGEN은 협력하여 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 새로운 지표에 대해 평가했습니다. 대장암(Colorectal Cancer, CRC) 환자 식별에 도움이 되는 동반 진단 테스트 KRAS G12C 돌연변이가 있는 환자는 파니투무맙과 병용한 소토라십으로 치료에서 혜택을 얻을 수 있습니다. 이 연구는 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 KRAS G12C 돌연변이 양성 종양이 있는 CRC 환자를 식별하기 위한 3상 Amgen 임상 연구(프로토콜 번호 20190172)의 선별검사로 활용하도록 설계되었습니다. 이 연구에서 얻은 데이터는 향후 의료가기-약물 조합에 대한 규제 제출을 뒷받침하기 위해 약물-의료가기 효능을 확인하는 데 사용되었습니다.

총 219명의 피험자가 이 Amgen 연구 번호 20190172에 등록하기 위해 선별되었고, 160명이 소토라십 240 mg + 파니투무맙 치료군(피험자 53명), 소토라십 960 mg + 파니투무맙 치료군(피험자 53명), 또는 대조군(트리플루리딘과 티피라실 또는 레고라페닙)(피험자 54명)으로 무작위 배정되었습니다. 대조군에서 3명의 피험자(5.6%)는 연구 대상 제품을 전혀 받지 못했습니다(부적격 판정 피험자 1명, 피험자 요청 1명, 기타 사유 피험자 1명[모두 1.9%]). 반면, 소토라십 + 파니투무맙 그룹의 모든 피험자는 연구 대상 제품을 받았습니다. 219명의 피험자

중 211명이 CDx로 검사를 받았습니다(8명은 CDx 검사 전에 선별검사에 실패함). 등록 및 무작위 배정된 160명의 피험자 모두 CDx 검사에서 G12C 양성 결과를 보였습니다. 나머지 51명의 선별검사 불합격자 중 27명은 CDx G12C 양성 결과, 12명은 G12C 음성 결과, 9명은 평가 불능, 3명은 유효하지 않은 결과를 보였습니다.

모든 샘플은 CDx로 검사하기 전에 양성 국소 검사 결과를 보였습니다. CDx와 국소 결과 사이의 PPA는 94.0%(187/199)였습니다. 연구에 사용된 CDx와 다양한 국소 검사 방법 사이의 PPA는 표 50에서 확인할 수 있습니다. 이 연구에서는 CDx로 검사할 수 있는 국소 음성 검사 샘플이 제공되지 않았습니다. 하지만 CRC 시료에서 CDx에 대한 NPA는 CRC에 대한 Krazati(아다그라시브)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구에서 확인되었습니다.

표 50. *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit(CDx)와 임상시험 등록 분석(CTA) 간 일치율

	CTA 양성, n	CTA 음성, n*	총계
CDx 양성, n	187	0	187
CDx 음성, n	12	91	103
총계	199	91	290
양성 일치율[95% CI] ^(†)		94.0% (89.7%, 96.8%)	
음성 일치율[95% CI] ^(†)		100.00% (96.0%, 100.0%)	

* CRC에 대한 Krazati(아다그라시브)의 사용을 뒷받침하는 임상 연구에서 얻은 91개 CTA 음성 샘플의 데이터를 사용하여 계산됨.

† 95% CI는 직접확률법(클로퍼-피어슨)으로 계산됨.

무진행 생존기간(Progression-Free Survival, PFS)에 대한 1차 분석을 위한 데이터 컷오프 날짜는 2023년 6월 19일이었습니다.

데이터 컷오프 날짜(2023년 6월 19일)까지 총 97건의 PFS 사건이 보고되었습니다. 소토라십 240 mg + 파니투무맙 치료군의 중앙값 PFS(95% CI)는 3.9개월(3.6, 5.8)이었고, 대조군은 2.0개월(1.9, 3.9)이었습니다. 소토라십 960 mg + 파니투무맙 치료군의 중앙값 PFS(95% CI)는 5.6개월(4.2, 6.3)이었고, 대조군은 2.0개월(1.9, 3.9)이었습니다.

소토라십 240 mg + 파니투무맙은 대조군 대비 질병 진행 또는 사망에 대한 위험비(Hazard Ratio, HR)(95% CI)가 0.6(0.4, 1.0; 양측 p-값 = 0.06)이었고, 소토라십 960 mg + 파니투무맙의 HR은 대조군 대비 0.5(0.3, 0.8; 양측 p-값 = 0.011)였습니다. 이는 소토라십 960 mg + 파니투무맙 치료군에서 PFS가 통계적으로 유의미하게 향상되었음을 보여줍니다.

PFS 결과는 FAS(Full Analysis Set) 분석에서 관찰된 결과와 일치합니다.

결론적으로, 소토라십 960 mg + 파니투무맙은 *KRAS* 모집단, 전체 분석 세트에서와 같이, 높은 수준으로 사전 치료된 모집단 대상 표준 치료와 비교했을 때 *therascreen KRAS RGQ PCR Kit*를 사용하여 확인된 *KRAS* p.G12C 돌연변이 mCRC를 가진 피험자에서 PFS의 통계적으로 유의미한 개선과 OS 개선 추세를 보였습니다.

Erbix, Vectibix, LUMAKRAS, Krazati 적응증에 관한 자세한 정보는

www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/drugsatfda/index.cfm에 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) *KRAS* 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) *KRAS* 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 *KRAS* 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 *KRAS* 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. Strickler, J.H., et al. (2023) Modest, Prevalence of *KRAS* G12C Mutation and Co-mutations and Associated Clinical Outcomes in Patients With Colorectal Cancer: A Systematic Literature Review. *The Oncologist*, Volume 28, Issue 11, Pages e981–e994.

17. Newton, C.R., et al. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 17, 2503.
18. Whitcombe, D. et al. (1999) Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. *Nature Biotech.* 17, 804.
19. Thelwell, N., et al. (2000) Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res.* 28, 3752.
20. Catalog of Somatic Mutations in Cancer www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic.
21. 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).
22. 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).
23. 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

사용 지침 또는 포장물 및 라벨에는 다음과 같은 기호가 표시됩니다.

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

기호

기호 정의



온도 제한



제조업체



사용 지침 참고



직사광선을 피할 것

연락처 정보

기술 지원 및 자세한 정보는 www.qiagen.com/Support에서 기술 지원 센터를 참조하거나 1-800-362-7737800-426-8157로 전화하거나 QIAGEN 기술 서비스 부서 또는 현지 유통업체에 연락하십시오(뒤표지를 참조하거나 www.qiagen.com을 방문하시기 바랍니다).

부록: Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package의 설치

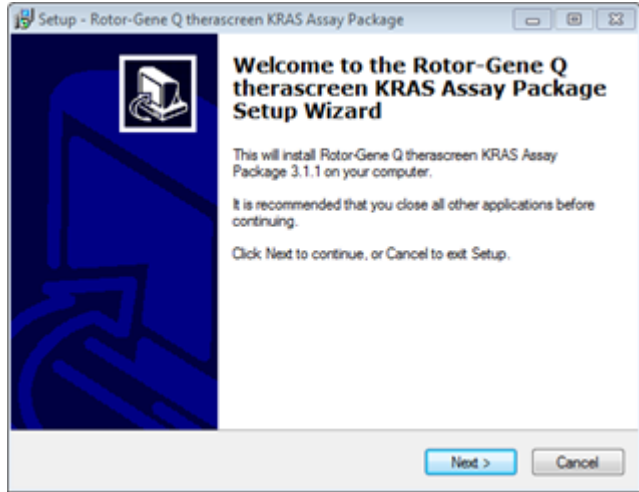
therascreen KRAS RGQ PCR Kit는 72-well rotor를 사용하는 Rotor-Gene Q MDx (US)와 함께 사용하도록 고안되었습니다. *therascreen* KRAS Assay Package는 www.qiagen.com에서 별도로 다운로드할 수 있습니다.

참고: Rotor-Gene Q *therascreen* KRAS Assay Package는 해당 Rotor-Gene Q Software 버전 2.3.5과 함께 작동합니다. *therascreen* KRAS Assay Package를 설치하기 전에 Rotor-Gene Q 소프트웨어의 최신 버전이 설치되어 있는지 확인하십시오.

이 패키지에는 '*therascreen* KRAS QC 잠금 템플릿' 및 '*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 Kit를 사용한 FFPE 샘플 준비, *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 사용한 DNA 샘플 평가 및 *therascreen* KRAS RGQ PCR Kit를 사용한 KRAS 돌연변이 검출을 위한 PCR 프로토콜을 정의한 실행 템플릿도 포함되어 있습니다.

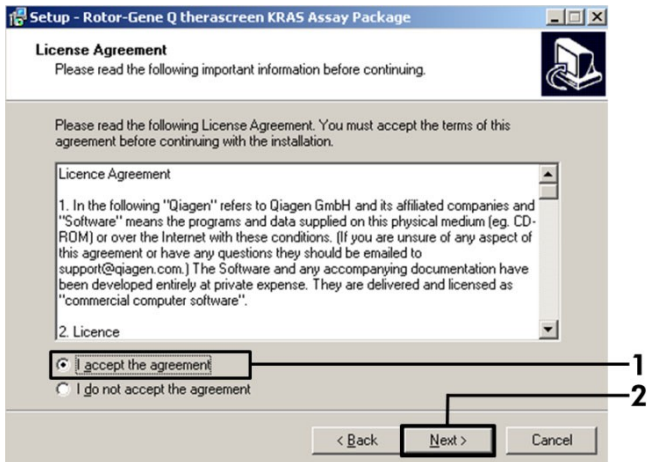
다음 절차에 따라 *therascreen* KRAS Assay Package를 설치합니다.

1. www.qiagen.com에서 Rotor-Gene Q **KRAS Assay Package 버전 3.1.1**을 다운로드하십시오.
2. 바이러스가 없는 이동식 저장소를 사용하여 Rotor-Gene Q MDx 기기에 연결된 노트북으로 Assay Package를 전송합니다.
3. **therascreen_KRAS_Assay_Package_3.1.1.exe**을 두 번 클릭하여 설치를 시작합니다.
설정 마법사가 나타납니다.

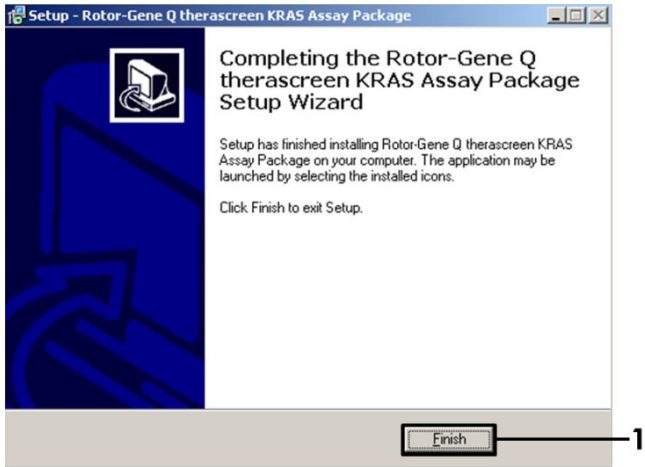


4. **Next**(다음)를 클릭하여 계속합니다.

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 열립니다.



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

thetascreen KRAS QC 잠금 템플릿 및 thetascreen KRAS 잠금 템플릿의 바로 가기가 자동으로 생성되어 바탕 화면에 표시됩니다.

주문 정보

제품	목차	카탈로그 번호
<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit(24)	24회 반응분: 대조물질 분석항목 1개, 돌연변이 분석항목 7개, 양성 대조물질, 물, <i>Taq</i> DNA 중합효소	870021
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package 버전 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 2.3과 호환됨)	9023818
<i>therascreen</i> KRAS Assay Package CD	<i>therascreen</i> KRAS RGQ PCR Kit 및 72-well 로터가 있는 Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM 기기와 함께 사용하기 위한 소프트웨어 프로토콜 패키지	9023675
Rotor-Gene Q 및 액세스리		
Rotor-Gene Q MDx Platform (US)	Real-time PCR 사이클러, 노트북 컴퓨터, 소프트웨어, 부속장치, 1년 보증(부품 및 인건비)	9002035
Rotor-Gene Q MDx System (US)	Real-time PCR 사이클러, 노트북 컴퓨터, 소프트웨어, 부속장치, 1년 보증(부품 및 인건비), 설치 및 교육	9002036
Rotor-Gene Q MDx 5plex HRM	5가지 채널(녹색, 노란색, 주황색, 적색, 진홍색) + HRM 채널, 노트북 컴퓨터, 소프트웨어, 부속품을 갖춘 real-time PCR 사이클러 및 고해상도 멜트(high resolution melt) 분석기: 부품 및 공임 1년 보장, 설치 및 교육은 포함되지 않음	9002032
Rotor-Gene Q MDx	72 x 0.1 ml 튜브의 단일 채널 피펫을 사용한 수동 반응 설정을 위한 알루미늄 블록	9002033
Loading Block 72 x 0.1 mL Tubes	72 x 0.1 mL 튜브의 단일 채널 피펫을 사용한 수동 반응 설정을 위한 알루미늄 블록	9018901

제품	목적	카탈로그 번호
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (250)	1,000회 반응을 위한 250개 스트립(4개 튜브) 및 캡	981103
Strip Tubes and Caps, 0.1 mL (2500)	10,000회 반응을 위한 10 x 250개 스트립 (4개 튜브) 및 캡	981106
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit — 파라핀 포매 조직으로부터 유전체 DNA 정제용		
QIAamp DSP DNA FFPE Tissue Kit (50)	DNA 준비 50회분: QIAamp Mini Spin Column, 단백질 분해 효소 K, 완충액, 시약 및 Collection Tubes (2 mL)	60404

최신 라이선스 정보 및 제품별 면책 사항은 각 QIAGEN 키트 사용 지침을 참고하십시오. QIAGEN 키트 사용 지침은 www.qiagen.com에서 확인하거나 QIAGEN 기술 서비스 또는 현지 유통업체에 요청할 수 있습니다.

문서 개정 이력

개정판	Description(설명)
R14 2023년 8월	<p>비소세포폐암 적응증에 대한 플래그 관련 조치와 관련하여 참고 사항에 플래그 해석 표에 대한 참조를 추가</p> <p>희석 단계 조치를 제거하기 위해 결장직장암 플래그 SAMPLE_INT_CTRL_FAIL에 대한 조치를 업데이트함</p> <p>해석의 모호성을 해소하기 위해 비소세포폐암 플래그 SAMPLE_INT_CTRL_FAIL에 대한 동작을 업데이트함</p> <p>12ARG 및 12ASP 샘플 데이터 할당에 대한 라벨링 오류를 수정하기 위해 표 18 업데이트</p> <p>1페이지와 문서 개정 내역 섹션에서 캡처된 안내서 개정 번호가 본 안내서 개정판 13에서 잘못 표기되었습니다. 이는 이후 문서 개정 내역 섹션의 이번 개정(R14)에서 업데이트됨</p>
R15, 2024년 10월	<p>Krazati CRC에 대한 정보를 추가하기 위해 의도된 사용 및 임상적 성능 섹션이 업데이트됨</p> <p>여러 단계에서 혼합하는 것의 중요성을 명확히 함</p> <p>플래그를 더 명확히 하고 표시에 따라 동작이 다른 플래그를 분할</p> <p>FFPE 보관을 위한 문구 추가</p> <p>12ASP를 13ASP로 오타 수정</p>
R16, 2025년 10월	<p>Vectibix 병용 LUMAKRAS의 CRC에 대한 정보를 포함하도록 용도 표 업데이트됨</p> <p>요약 및 설명 섹션에서 CRC 환자에 관한 표현 개정</p> <p>새로운 메스, 면도날 또는 이와 유사한 날카로운 칼날이 있는 도구에 대한 정보를 업데이트하기 위해, 필수이지만 제공되지 않는 재료 및 시료 취급 및 보관 섹션을 개정함</p> <p>표 30의 Ct 값에 대한 12VAL 3x LOD % CV에 대해 소수점 2자리가 포함됨</p> <p>표 46의 12ARG 및 13ASP에 대한 증폭 효율 값이 업데이트됨; 표 각주 제거됨</p> <p>임상적 성능 섹션 아래에 CRC 임상 연구에 관한 새로운 섹션이 추가됨</p> <p>처방 전용 기호 추가됨</p>

therascreen® KRAS RGQ PCR Kit에 관한 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 지침에 따라 사용해야 하며, 패널에 포함된 구성품과만 함께 사용할 수 있습니다. QIAGEN은 제품과 함께 제공된 프로토콜 및 본 사용 지침, 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 사용자들 위해 QIAGEN 사용자가 제공한 것입니다. QIAGEN에서 이 프로토콜을 철저히 검사하거나 최적화하지 않았습니다. QIAGEN은 이를 보증하거나 해당 내용이 제삼자의 권한을 침해하지 않는다는 것을 보장하지 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.

라이선스 조항의 업데이트는 www.qiagen.com을 참고하십시오.

상표: QIAGEN®, Sample to Insight®, QIAamp®, QIAcube®, MinElute®, Rotor-Gene®, Scorpions®, *therascreen*® (QIAGEN 그룹); Erbitux®(ImClone LLC., Eli Lilly 및 회사의 전액 출자 자회사); Vectibix®(Immunex Corp.), FAM™, HEX™ (Life Technologies, Inc.) LUMAKRASTM, KRAZATI®. 이 문서에 사용된 등록된 이름, 상표 등은 별도로 표시되지 않은 경우에도 법적 보호를 받는 것으로 간주해야 합니다.

이 제품을 구매함으로써 특정 ROCHE 특허에 따라 구매자에게 사람을 대상으로 한 체외 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.

10/2025 HB-1257-017 © 2025 QIAGEN, 모든 권리 보유.

