

**ORIGINAL ARTICLE****Pathological Factors Affecting DNA Quality in *BRAF*, *EGFR*, and *KRAS* Gene Molecular Tests**

Hyon-Goo Yun, Bo-Ra Kim, Joo-Mi Lee, Eun-Ha Song, Dong-Hoon Kim

Department of Pathology, Kangbuk Samsung Hospital, Seoul, Korea

***BRAF*, *EGFR*, *KRAS* 유전자 분자병리검사에서 DNA 품질에 영향을 미치는 병리학적인 인자에 관한 연구**

윤현구, 김보라, 이주미, 송은하, 김동훈

강북삼성병원 병리과

ARTICLE INFOReceived November 4, 2020
Revised 1st November 15, 2020
Revised 2nd November 17, 2020
Accepted November 19, 2020**Key words**DNA
Formalin fixation
Molecular test
Quality control**ABSTRACT**

The quality control of pathological specimens is important for accurate molecular pathology testing. This study evaluated that specimen factors affecting the DNA quality during tissue processing and sample types for *BRAF*, *EGFR*, and *KRAS* mutations tests. One thousand seven hundred and seventy-two molecular pathology tests were investigated for the factors influencing the DNA quality, such as sample type, formalin fixation time, and reexamination status. Cytology samples stored in a saline solution had better DNA quality than commercial cytology preservation. Tissue samples fixed in formalin within 24 hours had better DNA quality than the samples fixed over 24 hours. Between the types of samples, fresh tissue samples and tissue samples with a high tumor cell density had relatively better DNA quality than the formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and cytology specimens. Of real-time PCR, the non-PNA Ct value increased proportionally with samples held for longer than 24 hours in formalin, and that the formalin-fixed time affects the sample DNA quality. In conclusion, the appropriate tumor cellularity and 10% neutral formalin fixation time are the most important factors for maintaining the DNA quality. These factors should be managed properly for an accurate pathological molecular test to ensure optimal DNA quality.

Copyright © 2020 The Korean Society for Clinical Laboratory Science. All rights reserved.

서론

바이오마커(biomarker)가 치료전략을 선택하는데 널리 활용되면서, 병리과에서 분자병리 검사에 적합한 조직 및 세포검체를 관리하는 것이 중요해졌다[1]. 일반적인 병리과 진단업무에서 환자의 세포검체는 생리식염수 또는 액상세포검사 전용 고정액에 고정되고, 조직검체는 10% 중성 포르말린에 고정된 후

파라핀침투과정을 거친 후 포매하여 파라핀 블록으로 제작한다. 이러한 검체 처리 과정 동안 사용하는 고정액의 유형[2] 및 고정 시간[3] 등 많은 요인들이 분자병리 돌연변이 검사 결과에 영향을 끼칠 수 있다. 또한 포르말린 고정이 지연되면 분자병리검사의 결과에 영향을 미칠 수 있다[3]. 본 연구팀의 선행연구를 통하여 보고한 바와 같이 포르말린 고정 전 지연시간에 대한 연구에서 검체의 냉동보관시간에 따라 검체 DNA 품질이 저하되는 것으로 나타났다[4].

본 연구에서는 악성종양으로 진단된 증례를 이용하여, 검체의 종류에 따른 DNA 품질과 포르말린 고정 시간을 조사하였으며, 기타 DNA 품질에 영향을 미칠 수 있는 병리학적 요소들을

Corresponding author: Hyon-Goo Yun
Department of Pathology, Kangbuk Samsung Hospital, 29 Saemunan-ro,
Jongno-gu, Seoul 03181, Korea
E-mail: hg09.yun@samsung.com
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3835-4210>



분석하여 평가하였다.

재료 및 방법

1. 연구재료 선택

이 연구는 강북삼성병원의 기관심사위원회에서 승인 (KBSMC 2020-10-022)을 받아, 2013년 3월부터 2015년 12월까지 강북삼성병원 병리과에서 시행한 세침흡인 액상세포검체, 생검 및 수술조직 검체를 이용하여 Real-time PCR로 *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B), *EGFR* (epidermal growth factor receptor), *KRAS* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene) 돌연변이 검사 1,772건을 대상으로 실시하였다. 전자의무기록(electronic medical record, EMR)과 처방전달시스템(order communication system, OCS)의 기록을 바탕으로 검체종류, 채취방법, 병리진단, 분자병리 돌연변이 검사 결과 등을 조사하였으며, 수술 종료 시간, 검체 접수시간, 육안검사 시작시간 등을 조사해서 포르말린 고정시간을 산정하였다.

2. 검체 고정 및 처리과정

액상세포검체는 세침흡인 후 즉시 생리식염수에 담그고 병리과로 이송되어 실온에서 6000 rpm으로 6분간 원심분리하여 침전물을 준비하였다. 또한, 생검 및 수술조직검체는 동결 절편 응급검사 시행을 위해 신선조직으로 병리과에 이송되어 동결응급검사를 시행하며 즉시 분자병리검사용 검체를 채취하거나 육안소견 상 종양 부위가 적은 경우 15분내로 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 폐 및 대장은 통상적으로 종양병변을 확인 후 관류고정을 하거나 코르크 판에 넓게 펼친 후 10% 중성 포르말린 고정액에 약 24시간 동안 고정단계를 거쳐 육안검사 후 포매조직을 채취하였다. 조직의 파라핀 침투처리는 HistoCore PELORIS 3 (Leica biosystems, Germany) 자동조직처리기에 의해 수행되었다. 처리된 조직 샘플은 통상적인 포매와 박절 과정을 거쳐 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 후 진단에 이용하였으며, 이 후 분자병리검사를 위해 유리슬라이드 전면에 종양 부위를 표시하고 종양 세포의 밀도를 백분율로 기록하였다.

3. DNA 추출

생리 식염수에 담긴 세침흡인 액상세포검체는 즉시 원심분리 후 침전물을 사용하였다. 수술검체는 동결절편응급검사 중 신선 조직의 일부를 사용하였으며, 파라핀 포매 블록 검체는 회전

형 박절기(Microtome)를 사용하여 5 μ m 두께로 박절하여 1.5 mL 검체용기에 수집하였다. DNA 유전자 검사는 정제 키트를 사용하여 DNA를 추출하였으며(Maxwell 16 MDx, Promega, Madison, WI, USA) 추출한 DNA의 농도 및 순도는 UV/VIS분광광도계(NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 측정하였다. 또한 DNA 수량은 Quanti-It PicoGreen (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)을 사용하여 평가하였다.

4. 돌연변이 분석

돌연변이 검사는 peptide nucleic acid (PNA) Clamp 돌연변이 검사 키트(Pangene, Daejeon, Korea)를 이용하여 Real-time PCR (polymerase chain reaction)을 시행하였다. 검사과정을 간단히 요약하면 추출한 DNA 10 ng, Primer, PNA probe, SYBR green PCR master mixture를 포함하는 20 μ L 반응 볼륨을 각 테스트에 사용하였다. Real-time PCR 반응은 CFX96 PCR 시스템(Bio-Rad, Philadelphia, PA, USA)에서 수행되었다. 주기 임계값(threshold cycle, Ct)과 델타 Ct (Δ Ct)값은 PNA 혼합없이 검체 튜브에서 자동으로 계산되어 검체 DNA 품질의 허용 가능성을 평가했다. 검체의 DNA 품질은 Ct값에 기초하여 제조사의 지침기준으로 최적($22 < Ct < 30$) 또는 허용 가능한($30 \leq Ct \leq 34$) 또는 유효하지 않은($Ct \leq 22 \sim 23$ or $Ct \geq 34 \sim 35$) 군으로 분류되었다. 돌연변이의 존재는 제조사의 지침에 따라 Ct값을 측정하여 결정하였다.

5. 통계

강북삼성병원 연구지원팀의 의학통계 지원을 받아 분석하였으며 분석방법(IBM SPSS Ver.24)으로는 1. 범주형 변수: 세 군간 비율비교(Pearson's Chi-square test), 2. 10% 중성 포르말린 고정시간에 따른 Non-PNA 값 경향성 확인(P for trend), 3. 두 군간 평균비교: independent two sample t-test, 4. 세 군간의 평균비교(ANOVA, analysis of variance)로 분석하였으며 P 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

결 과

1. 병리학적 데이터

연구에 이용한 전체 1,772건 검사 검체의 병리학적 특징은 Table 1에 요약하였다. 성별은 남성 707건(39.9%), 여성 1065건(60.1%)이었다. 이 중에서 *BRAF* 검사의 갑상샘 수술환자 중

Table 1. Summary of pathological data of 1,772 mutation tests

	Total	<i>BRAF</i>	<i>EGFR</i>	<i>KRAS</i>	<i>P</i> -value
Total N (%)	1,772 (100)	1,045 (100)	304 (100)	423 (100)	
Gender					<0.001
Male	707 (39.9)	272 (26.0)	164 (53.9)	269 (63.6)	
Female	1,065 (60.1)	773 (74.0)	140 (46.1)	154 (36.4)	
Specimen type					<0.001
Biopsy	242 (13.7)	0 (0.0)	162 (53.3)	80 (18.9)	
Resection	981 (55.4)	508 (48.6)	130 (42.8)	343 (81.1)	
Cytology	549 (30.9)	537 (51.4)	12 (3.9)	0 (0.0)	
Organs					<0.001
Thyroid	1,045 (59)	1,045 (100)	0 (0.0)	0 (0.0)	
Lung	227 (12.8)	0 (0.0)	227 (74.7)	0 (0.0)	
Except lung	77 (4.3)	0 (0.0)	77 (25.3)	0 (0.0)	
Colon	404 (22.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	404 (95.5)	
Except colon	19 (1.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	19 (4.5)	
Formalin fixation time (hr)					<0.001
<24	1,505 (84.9)	1,044 (99.9)	234 (77)	227 (53.7)	
24~48	132 (7.4)	0 (0.0)	34 (11.2)	98 (23.2)	
48~72	42 (2.4)	0 (0.0)	10 (3.3)	32 (7.6)	
72~96	84 (4.7)	1 (0.1)	21 (6.9)	62 (14.7)	
>96	9 (0.5)	0 (0.0)	5 (1.6)	4 (0.9)	
Result					<0.001
Invalid	8 (0.45)	2 (0.2)	5 (1.6)	1 (0.2)	
Wild	938 (52.9)	476 (45.6)	196 (64.5)	266 (62.9)	
Mutant	826 (46.6)	567 (54.2)	103 (33.9)	156 (36.9)	
Retest					<0.001
Test	1,723 (97.2)	1,032 (98.8)	277 (91.1)	414 (97.9)	
Retest	49 (2.76)	13 (1.2)	27 (8.9)	9 (2.1)	

여성 비율이 약 74.0%를 차지하였다. 검체의 종류는 세침흡인 액상세포병리 검체가 549건(30.9%), 수술 후 동결절편 응급검사시 채취한 신선조직이 981건(55.4%), 육안검사 후 10% 중성 포르말린 고정 파라핀 포매된 검체가 242건(13.7%)이며, 장기별로는 갑상샘 1,045건(58.9%), 폐 227건(12.8%), 대장 404건(22.8%), 그 외 검체가 96건(5.4%)이었다. 10% 중성 포르말린 고정시간에 따라 24시간 미만 검체 1,505건(84.9%), 48시간 이하 132건(7.4%), 72시간 이하 42건(2.3%), 96시간 미만 84건(4.7%), 96시간 초과 9건(0.5%)이었다. 전체 돌연변이 검사결과는 wild type 938건(52.9%), mutant type 826건(46.6%), 판정불가 8건(0.4%)이었다. 재검 유무로 분류하면 재검없이 결과가 나온 검사는 1,723건(97.2%), 1회이상 재검하여 결과가 나온 검사 모두 49건(2.7%)이었는데, *EGFR* 검사의 재검율이 27건(8.9%)으로 높게 나왔으며, *BRAF* 검사는 재검율이 13건(1.2%)으로 낮게 나왔는데 대부분의 검사가 10% 중성 포르말린 고정시간이 24시간 이전이었다. 기존 연구 논문 발표 자료에 따르면 갑상샘 유두상암(papillary thyroid carcinoma, PTC)에서 *BRAF* 돌연변이가 약 69%, 폐암에서 *EGFR* 돌연변이는 약 40%, 대장암에서 *KRAS* 돌연변이는 약

20~38%의 돌연변이 결과를 보인다고 알려져 있다[5-7]. 그러나 본 병리과에서 병리 최종 진단이 악성종양으로 확진된 특정 검체 외 전이 검체에서도 유전자 검사를 시행하여 돌연변이 검사의 타기관 비율과 다를 수 있다.

2. 검체의 종류와 취급시간, 돌연변이 결과에 따른 재검율 차이

검사의 재검율을 검체 종류별로 비교하면 재검 전체 49건 중 수술조직이 24건(48.9%), 생검이 13건(26.5%), 세포검체는 12건(24.5%)이며($P=0.028$), 10% 중성 포르말린 고정시간에 따른 재검율은 24시간 이하가 38건(77.6%), 48시간이 6건(12.2%) 등이었다($P=0.062$) (Table 2). 또한 돌연변이 검사결과에 따른 재검율을 보면 Wild에서 32건(65.3%), Mutant에서 16건(32.6%), 판정불가에서 1건(2.0%)을 확인할 수 있었다($P=0.043$). 재검의 원인은 *BRAF* 검사의 재검 13건 중 11건(84.6%)이 세포검체 비율이 높았는데($P=0.016$) 이는 세포의 밀집도가 낮은 것이 원인으로 추정된다. 이는 10% 중성 포르말린 고정시간이 24시간 이상에서는 재검율이 0%로 포르말린 고정시간과는 차이가 없었다는 것이다. 폐암에서 시행하는 *EGFR* 검사는 10% 중성 포르말린 고정시간이 24시간 이하인 경우에

Table 2. Difference in retest rate by specimen type, 10% neutral formalin fixation time, and mutation result

	Total			BRAF			EGFR			KRAS		
	Test	Retest	P-value	Test	Retest	P-value	Test	Retest	P-value	Test	Retest	P-value
Total N (%)	1,723 (100)	49 (100)		1,032 (100)	13 (100)		277 (100)	27 (100)		414 (100)	9 (100)	
Specimen type			0.028			0.016			0.875			0.218
Biopsy	229 (13.3)	13 (26.5)		0 (0)	0 (0)		149 (53.8)	13 (48.2)		80 (19.3)	0 (0)	
Resection	957 (55.5)	24 (48.9)		506 (49.0)	2 (15.4)		117 (42.2)	13 (48.2)		334 (80.7)	9 (100)	
Cytology	537 (31.2)	12 (24.5)		526 (50.9)	11 (84.6)		11 (3.9)	1 (3.7)		0 (0)	0 (0)	
Formalin fixation time (hr)			0.062			>0.999			0.582			0.338
<24	1,467 (85.1)	38 (77.6)		1,031 (99.9)	13 (100.0)		214 (77.3)	20 (74.1)		222 (53.6)	5 (55.6)	
24~48	126 (7.3)	6 (12.2)		0 (0)	0 (0)		30 (10.8)	4 (14.8)		96 (23.2)	2 (22.2)	
24~72	39 (2.3)	3 (6.1)		0 (0)	0 (0)		9 (3.3)	1 (3.7)		30 (7.3)	2 (22.2)	
72~96	83 (4.8)	1 (2.0)		1 (0.1)	0 (0)		20 (7.2)	1 (3.7)		62 (14.9)	0 (0)	
>96	8 (0.5)	1 (2.0)		0 (0)	0 (0)		4 (1.4)	1 (3.7)		4 (0.9)	0 (0)	
Result			0.043			0.596			0.624			0.023
Invalid	7 (0.4)	1 (2.0)		2 (0.2)	0 (0)		5 (1.8)	0 (0)		0 (0)	1 (11.1)	
Wild	906 (52.6)	32 (65.3)		469 (45.5)	7 (53.9)		176 (63.5)	20 (74.1)		261 (63.1)	5 (55.6)	
Mutant	810 (47.0)	16 (32.7)		561 (54.4)	6 (46.2)		96 (34.7)	7 (25.9)		153 (36.9)	3 (33.3)	

도 20건(74.1%)의 재검이 발생했는데 이전 연구결과로 확인하면 조직검체 접수 후 포르말린에 고정하기 전까지 검체를 냉장 보관하는 것이 원인일 수 있을 것이다. 또한 대장암에 대한 KRAS 재검 9건 모두 수술조직이었으며 10% 중성 포르말린 고정시간이 24시간 이내인 검체가 5건(55.6%)이었는데, 이것도 냉장보관에 의한 조직검체의 10% 중성 포르말린 고정 지연이 원인으로 생각해 볼 수 있다.

3. 10% 중성 포르말린 고정시간에 따른 Non-PNA Ct값의 경향성 변화 비교

Real-time PCR 검사에 따른 Non-PNA Ct값의 변화를 이용하여 포르말린 고정시간에 따른 DNA 품질 변화를 측정해 보았다. 전체 검체 1,772건 중, 포르말린 고정시간에 따라 24시간 이하(1,505건)인 군에서 Non-PNA Ct평균값이 26.60, 48시간 이하(132건)군은 26.87, 72시간 이하(42건)인 군은 27.34, 96시간 이하(84건)는 27.59, 96시간 이상(9건)은 28.80으로, 포르말린 고정시간이 증가함에 따라 DNA 품질을 시사하는 Non-PNA Ct값이 증가함을 알 수 있었다($P < 0.001$). Figure 1에서 나타난 바와 같이 실제로 10% 중성 포르말린 고정시간에 따라 Non-PNA Ct값이 증가하는 경향을 보인다. 특히, 폐암 검체에 시행한 EGFR 돌연변이 검사 304건에서 포르말린 고정시간별로 Ct값의 차이가 뚜렷하게 나타났다. 상기와 같은 조건에서 Ct값은 24시간 미만 고정시간 군에서 Non-PNA Ct값이 26.69, 48시간 이내 고정군 26.47, 72시간 이내 고정군 27.59, 96시간 이내 고정군 28.12, 96시간 이상 고정군 28.41으로 10% 중성 포르말린 고정시간에 따라 각 군간의 평균값이 뚜렷

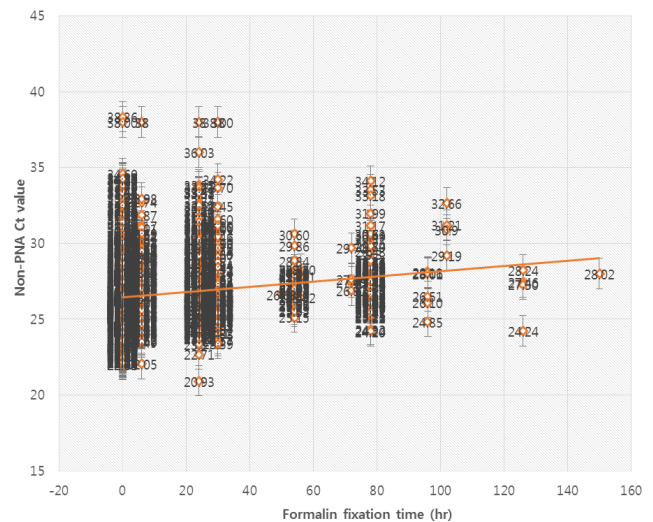


Figure 1. Variation of Non-PNA Ct value by 10% neutral formalin fixation time.

하게 증가함을 볼 수 있었다($P=0.008$) (Table 3).

이 Non-PNA Ct값이 검사 Kit 지침서상 30.0 이상으로 검출되면 증폭효율이 떨어져 검사결과의 신뢰도가 낮아질 수 있으며, 샘플의 순도에 따라 DNA양을 늘려 재검사할 것을 권장하고 있다.

또한 대장암 검체에 대한 KRAS 돌연변이 검사 423건에서도 어느 정도 Ct값이 증가하였다. 특히 96시간 이상 10% 중성 포르말린에 고정한 검체에서 Ct값이 29.29로 나타나, 포르말린 고정시간이 늘어난다면 부적절한 DNA 품질로 재검을 해야 하는 경우가 늘어날 것으로 사료된다($P=0.129$).

반면 대부분 24시간 이내에 10% 중성 포르말린 고정이 된 검

Table 3. Changing non-PNA Ct value by 10% neutral formalin fixation time

Variable	Non-PNA Ct value	
	N	Mean±SD
Total	1,772	26.70±2.32
Formalin fixation time (hr)		
<24	1,505	26.61±2.34
24~48	132	26.88±2.36
48~72	42	27.35±1.14
72~96	84	27.59±1.99
>96	9	28.80±2.53
P for trend		<0.001
<i>BRAF</i>	1,045	26.48±2.30
Formalin fixation time (hr)		
<24	1,044	26.48±2.30
24~48	0	-
48~72	0	-
72~96	1	25.91±
>96	0	-
P for trend		0.806
<i>EGFR</i>	304	26.82±2.63
Formalin fixation time (hr)		
<24	234	26.69±2.58
24~48	34	26.47±2.81
48~72	10	27.59±1.26
72~96	21	28.12±2.92
>96	5	28.41±2.84
P for trend		0.008
<i>KRAS</i>	423	27.18±2.05
Formalin fixation time (hr)		
<24	227	27.13±2.19
24~48	98	27.02±2.18
48~72	32	27.27±1.11
72~96	62	27.44±1.56
>96	4	29.29±2.38
P for trend		0.129

상샘 조직병리 검체에 대한 *BRAF* 검사는 고정시간 차이에 따른 Ct값의 차이를 보기 어려웠다($P=0.806$).

4. 재검유무에 따른 Non-PNA Ct값과 10% 중성 포르말린 고정시간의 평균 비교

전체 검체 중 재검 유무에 따라 Non-PNA Ct값을 비교하면 재검을 하지 않은 검사 1,723건에서 평균 26.68의 Ct값이 나온 반면 재검한 검사 49건에서 27.50으로 평균 Non-PNA Ct값이 증가하는 경향을 보였다($P=0.110$). 특히, *EGFR* 검사 중 무재검 검사 277건에서 26.73, 재검사 27건에서 27.75의 평균값이 나왔으며, *KRAS* 검사 중 무재검 검사 414건에서 27.10, 재검 검사 9건에서 30.42의 평균값의 차이를 보였다(Table 4). 통계적으로 유의하지 않았지만($P=0.342$), 재검 검사에서 Non-PNA Ct값이 높다는 것은 처음 검체부터 DNA의 품질이 좋지 않아 재검을 했다는 증거로 볼 수 있다.

5. 검체 채취방법 구분에 따른 Non-PNA Ct 값 비교

전체 검사 중 검체의 채취 방법 구분에 따라 침생검, 수술조직, 세포 검체로 분류하면, Non-PNA Ct값 평균치가 침생검 검체 242건 26.79, 수술조직 검체가 981건 26.39으로 비슷하였으나, 세침흡인 세포 검체 549건은 27.22로 Non-PNA Ct값이 증가한 것을 알 수 있었다($P<0.001$) (Table 5). 이것은 넓게 조직검체와 세포검체로 분류하여 추정해보면, 종양세포의 개수 즉 세포 밀집도가 DNA품질과 관련이 있는 것으로 판단된다. 단, *BRAF*는 세포와 수술조직 2군, *EGFR*은 세포, 생검, 수술조직 3군, *KRAS*는 생검과 수술조직 2군으로 각각 비교하였다.

Table 4. Average comparison of non-PNA Ct value and formalin fixation time with or without retest

Variable	Test	Retest	P-value
Total			
N	1,723	49	
Non-PNA Ct	26.68±2.28	27.51±3.52	0.110
Formalin fixation time (hr)	1.28±0.77	1.39±0.86	0.342
<i>BRAF</i>			
N	1,032	13	
Non-PNA Ct	26.50±2.3	24.98±2.143	0.018
Formalin fixation time (hr)	1.00±0.09	1±0	0.318
<i>EGFR</i>			
N	277	27	
Non-PNA Ct	26.73±2.56	27.75±3.16	0.054
Formalin fixation time (hr)	1.45±0.96	1.48±1.01	0.862
<i>KRAS</i>			
N	414	9	
Non-PNA Ct	27.12±1.94	30.42±3.87	0.033
Formalin fixation time (hr)	1.87±1.13	1.67±0.87	0.602

Table 5. Comparison non-PNA Ct value by specimen type

Specimen type	Biopsy	Resection	Cytology	P-value
Total N	242	981	549	
Non-PNA Ct	26.79±2.37	26.39±2.16	27.22±2.49	<0.001
<i>BRAF</i>	0	508	537	
Non-PNA Ct	-	25.61±1.76	27.29±2.45	<0.001
<i>EGFR</i>	162	130	12	
Non-PNA Ct	26.97±2.69	26.93±2.45	23.72±1.6	0.021
<i>KRAS</i>	80	343	0	
Non-PNA Ct	26.45±1.46	27.35±2.14	-	<0.001

Table 6. Comparison non-PNA Ct value by pathological diagnosis

	N	Non-PNA Ct	P-value
<i>BRAF</i>	1,045		<0.001
- Scanty	66	27.67±2.76	
- Benign	254	27.47±2.45	
- AUS, FLUS	113	27.13±2.34	
- Papillary carcinoma	603	25.78±1.84	
- Other malignancy	9	28.41±4.45	
<i>EGFR</i>	304		0.387
- Lung carcinoma	227	26.93±2.47	
- Metastatic carcinoma	73	26.45±2.77	
- Others (negative)	4	27.92±6.94	
<i>KRAS</i>	423		0.410
- Adenocarcinoma	412	27.19±2.06	
- Non-adenocarcinoma	11	26.68±1.53	

Abbreviations: AUS, atypia of undetermined significance; FLUS, follicular lesion of undetermined significance.

6. 진단에 따른 Non-PNA값 비교

BRAF 검사에서는 유두상갑상샘암종(PTC)으로 진단된 검체와 그 외 검체로 구분이 가능하였다. PTC 진단된 검체 603건(57.7%)은 Non-PNA 평균이 25.78, PTC 진단 외 검체 442건(42.3%)은 27.12 이상의 평균을 보여 두 군간에 의미있는 차이가 있었다($P<0.001$) (Table 6). 이는 종양의 크기 및 성상, 초음파유도 세침흡인을 하는 시술자의 술기, 악성종양 여부 등 세포검체의 양을 결정하는 여러 요인이 작용하였을 것으로 추정하며, 추후 세부적인 분석이 필요할 것으로 사료된다.

EGFR 검사 검체는 전이를 포함한 악성종양진단 300건(98.7%), 비악성 진단 4건(1.3%)간의 Non-PNA Ct값 차이가 없었으며($P=0.387$), *KRAS* 검사 검체는 대부분 대장암의 샘암종으로 최종진단된 검체이므로 진단별로 Non-PNA Ct값의 차이는 유의하지 않았다($P=0.41$).

고찰

병리과에서 분자병리 검사에 대해 적절한 질관리를 하기 위해서는, 조직 및 세포 검체의 보관과 처리 과정 중 어떤 인자들이 영향을 미치는지 파악하는 것이 매우 중요하다. 본 연구에서는 *BRAF*, *EGFR*, *KRAS* 등 분자병리 검사실에서 많이 시행하는 유전자 검사의 결과에 영향을 미칠 수 있는 10% 중성 포르말린 고정시간, 재검 유무, 조직 및 세포검체 종류 등 인자들과 Non-PNA Ct값의 관련성을 파악하였다. 먼저 10% 중성 포르말린 고정시간이 길어지면 DNA 변성이 증가[8, 9]한다고 알려져 있으며, 통계적으로 돌연변이 검출에는 영향이 없었으나, 10% 중성포르말린 고정시간이 증가할수록 Non-PNA Ct값이 증가하는 것을 확인하였다. 이는 이전 연구[4]와 마찬가지로, DNA 돌연변이 검출에는 큰 영향은 없으나, 10% 중성 포르말린 고정시간이 검체의 DNA품질에 영향을 미치는 중요한 인자 중 하나라는 것을 시사하는 소견으로 판단된다. 각 검사중 한번 이상 재검한 검체에서 *BRAF* 유전자 검사의 경우 세포검체가 조직검체보다 높았으며 모두 검체에 포함된 세포의 밀집도가 낮았

다. 그리고 재검 검체의 Non-PNA Ct값이 높아졌다는 것은 DNA 품질 자체에 문제가 있었을 것으로 추정되는데, 이중 수술로 적출한 조직검체는 수술실부터 병리과에서 포르말린에 고정 처리를 하기 전까지 냉장보관시간이 길었던 것이 원인이었을 것으로 생각된다. 그리고 조직과 세포 등 검체 종류에 따라 Real-time PCR결과 Non-PNA Ct값의 차이를 볼 수 있었다. 주로 세침흡인세포 검체보다 파라핀 포매 조직검체를 포함한 수술로 절제한 조직검체가 DNA 품질이 더 우수했는데, 이는 검사에 포함된 악성종양세포의 밀집도가 세포검체보다 조직검체에서 높기 때문인 것으로 생각된다. 다른 연구에서도 검체에서 종양의 세포밀도가 유전자 돌연변이를 검출하는데 있는 중요한 요소로 보고되고 있다[10]. 본 연구에서는 포르말린 고정 전 수술 조직검체의 냉장보관 시간 및 세포검체 채취 후 병리과 세포검사실에서 검사하기 전까지 검사 전 보관시간 등, 검사 지연으로 인한 DNA 품질에 대한 영향 평가를 하지 못하였는데, 분자병리검체의 DNA 품질에 미치는 인자들에 대한 정확한 평가를 위해 추후 연구가 필요하다. 결론적으로 최적의 포르말린 고정시간을 관리하고, 최대한 신속하게 분자병리 검사를 시행하면 검사에 필요한 적절한 DNA 품질을 얻을 수 있으며, 검체 종류에 따라 DNA 품질이 달라질 수 있으므로, 검사전에 세포의 밀집도를 평가하고, 이러한 요소들을 잘 관리한다면 정확한 검사 결과를 얻는데 도움을 줄 수 있을 것이다.

요약

정확한 분자병리검사를 위해 검체에 대한 질관리의 중요성이 강조되고 있다. 본 연구에서 *BRAF*, *EGFR*, *KRAS* 돌연변이 검사에 대해, 검체 종류 및 처리과정 중 DNA 품질에 영향을 미치는 인자를 알아보고자 하였다. 모두 1,772건의 분자병리검사에 대해, 검체의 종류, 포르말린 고정시간, 재검기록 등 DNA 품질에 영향을 미칠 수 있는 임상병리학적 요소를 조사하였다. 세포검체는 고정액으로 처리를 한 검체보다 생리식염수에 보관한 검체가 DNA 품질이 좋았다. 조직검체는 10% 중성 포르말린에 24시간 이내에 고정된 검체가 그 이상 고정된 검체보다 DNA 품질이 좋았다. 검체 종류 중 신선조직검체, 그리고 종양세포밀도가 높은 조직검체가 파라핀포매조직 및 세침흡인액상 세포검체보다 상대적으로 DNA 품질이 좋았다. 10% 중성 포르말린에 24시간 이상 오래 고정된 검체일수록 Non-PNA Ct값이 비례 증가하여, 포르말린 고정시간이 검체 DNA 품질에 영향을 준다는 것을 확인하였다. 결론적으로 종양세포의 밀도 및 적절한 포르말린 고정시간이 DNA 품질을 유지하는데 가장 중요한 요소

이며, 신속하고 정확한 분자병리진단을 위해 이들 요소를 적절히 관리하여 최적의 DNA 품질을 유지하도록 해야 한다.

Acknowledgements: The author would like to thank the members of the Department of Pathology, Kangbuk Samsung Hospital for publishing this paper, especially Seoung-Wan Chae, professor of pathology department for valuable discussion and correction, and Mi-yeon Lee, senior specialist of the Medical Statistics Division, Kangbuk Samsung Hospital for statistical analysis.

Conflict of interest: None

Author's information (Position): Yun HG, M.T.; Kim BR, M.T.; Lee JM, M.T.; Song EH, M.T.; Kim DH, M.D./Ph.D.

REFERENCES

1. Cree IA, Deans Z, Ligtenberg MJ, Normanno N, Edsjö A, Rouleau E, et al. Guidance for laboratories performing molecular pathology for cancer patients. *J Clin Pathol*. 2014;67:923-931. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2014-202404>
2. Hunt JL. Molecular pathology in anatomic pathology practice: a review of basic principles. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132:248-260. [https://doi.org/10.1043/1543-2165\(2008\)132\[248:MPIAPP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1043/1543-2165(2008)132[248:MPIAPP]2.0.CO;2)
3. Carithers IJ, Agarwal R, Guan P, Odeh H, Sachs MC, Engel KB, et al. The biospecimen preanalytical variables program: a multi-assay comparison of effects of delay to fixation and fixation duration on nucleic acid quality. *Arch Pathol Lab Med*. 2019;143:1106-1118. <https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0172-OA>
4. Yun HG, Lee HJ, Kim BR, Lee JH, Lee JH, Kim K, et al. Factors affecting *KRAS* mutation detection in colorectal cancer tissue. *Pathol Res Pract*. 2019;215:1071-1075. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.02.018>
5. Zhao J, Liu P, Yu Y, Zhi J, Zheng X, Yu J, et al. Comparison of diagnostic methods for the detection of a *BRAF* mutation in papillary thyroid cancer. *Oncol Lett*. 2019;17:4661-4666. <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10131>
6. Yatabe Y, Kerr KM, Utomo A, Rajadurai P, Tran VK, Du X, et al. *EGFR* mutation testing practices within the Asia Pacific region: results of a multicenter diagnostic survey. *J Thorac Oncol*. 2015;10:438-445. <https://doi.org/10.1097/JTO.0000000000000422>
7. Shackelford RE, Whitling NA, McNab P, Japa S, Coppola D. *KRAS* testing: a tool for the implementation of personalized medicine. *Genes Cancer*. 2012;3:459-466. <https://doi.org/10.1177/1947601912460547>
8. Prentice LM, Miller RR, Knaggs J, Mazloomian A, Aguirre Hernandez R, Franchini P, et al. Formalin fixation increases deamination mutation signature but should not lead to false positive mutations in clinical practice. *PLoS One*. 2018;13:e0196434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196434>
9. Taguchi M, Inoue H, Motani-Saitoh H, Yajima D, Hayakawa M,

- Otsuka K, et al. DNA identification of formalin-fixed organs is affected by fixation time and type of fixatives: using the AmpF l STR(R) Identifiler(R) PCR amplification kit. *Med Sci Law*. 2012;52:12-16. <https://doi.org/10.1258/msl.2011.010140>
10. Dudley JC, Gurda GT, Tseng LH, Anderson DA, Chen G, Taube JM, et al. Tumor cellularity as a quality assurance measure for accurate clinical detection of BRAF mutations in melanoma. *Mol Diagn Ther*. 2014;18:409-418. <https://doi.org/10.1007/s40291-014-0091-6>