

GeneFinder™ TB & NTM Multiplex Real-time PCR kit
(고위험성감염체유전자검사시약 N05030.01[3])

본 제품은 [체외진단의료기기] 임.

1. 사용목적: 본 제품은 사람의 객담, 기관지세척액 또는 조직세포(fresh tissue, slide tissue)에서 추출한 DNA에서 실시간중합효소연쇄반응법 (Real-Time PCR)을 이용하여 Mycobacterium tuberculosis complex(TB) 및 non-tuberculosis mycobacteria(NTM) DNA를 정성적으로 검출하는 체외진단분석기용 시약이다.

2. 시약의 명칭 및 구성

1) 구성: 본 제품은 체외진단분석기용 시약, GeneFinder™ TB & NTM Multiplex Real-time PCR kit (TB & NTM Reaction Mixture, TB & NTM Probe Mixture, TB & NTM Positive Control, TB & NTM Negative Control)로 구성된다 본 제품은 1 kit 당 100 테스트가 가능함

일련 번호	명칭	세부 구성	외관상 특징	시약용기	Volume
1	TB&NTM Reaction Mixture	단일 구성	연보라색 뚜껑의 무색 마이크로튜브 용기에 담겨 있는 무색의 용액	무색튜브	1 X 1050 µl
2	TB&NTM Probe Mixture	단일 구성	암갈색 마이크로튜브 용기에 담겨 있는 연보라색 용액	암갈색튜브	1 X 525 µl
3	TB&NTM Positive Control	단일 구성	빨간색 뚜껑의 무색 마이크로튜브 용기에 담겨 있는 무색의 용액	무색튜브	1 X 50 µl
4	TB&NTM Negative Control	단일 구성	초록색 뚜껑의 무색 마이크로튜브 용기에 담겨 있는 무색의 용액	무색튜브	1 X 50 µl

100 Tests/kit

3. 사용방법

-필요한 장비 및 재료-

- CFX96_IVD real-time PCR detection system
- Applied Biosystems 7500 Real-time PCR Instrument system
- Pipettes
- Vortex mixer
- Pipettes tips with aerosol barrier
- Centrifuge with rotor for microtiter plates
- Disposable powder-free gloves

1) 검체 준비 및 저장방법

- 객담(Sputum), 기관지 세척액(Bronchial washing), 조직세포(fresh tissue, paraffin-embedded tissue, slide tissue)의 DNA를 상용화된 DNA prep kit을 사용하여 추출한다.
- 추출된 DNA는 -20℃ 이하에서 3개월 이내, 2℃ ~ 8℃ 이내에서는 1주일 이내를 권장한다.

2) 검사 전 준비 과정

(1) 해당 장비의 준비과정

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Instrument System(유전자증폭장치, A22520.01, [2], 수허 12-365 호), CFX96_IVD real-time PCR detection system(유전자증폭장치, A22520.01, [2], 수허 10-205 호) 장비를 사용할 수 있도록 warming up 및 software를 실행시킨다. 사용방법은 매뉴얼을 참고한다

(2) 시약

냉동 보관 시약은 검사하기 전에 상온에서 완전히 녹인 후 사용한다.

3) 검사 과정

(1) DNA 추출

① 상용화된 DNA prep kit [Qiagen DNA mini kit (Qiagen, Germany)] 사용을 권장한다.

(2) RT-PCR Master Mixture의 제조

① TB & NTM Reaction Mixture 10 µl와 TB & NTM Probe mixture 5 µl를 혼합하여 필요한 만큼의 RT-PCR Master Mixture를 제조한다. (표 1 참조)

표 1. RT-PCR Master Mixture

Solution	No. of Samples	No. of Samples			Total vol. of Master Mixture
		1	3	5	
TB&NTM Reaction Mixture	10	30	50	10 x (n+3)	
TB&NTM Probe Mixture	5	15	25	5 x (n+3)	
Total	15 µl	45 µl	75 µl	15 x (n+3)	

- Pipetting error로 인한 Master Mixture의 부족함을 막기 위해 1 sample 분량을 여분으로 더 준비한다.
- Total Master Mixture number = n sample + 1 positive control + 1 negative control + 1 extra
- ② RT-PCR Master mixture 15 µl를 각각의 well에 분주하고 추출한 DNA 5 µl를 pipetting하여 잘 섞는다. Positive control과 Negative Control도 동일한 방식으로 준비한다.
- ③ Real Time PCR 장비에 시약을 장착하여 "(3) Real-time PCR 조건 설정 및 실행" 조건에 따라 장비 매뉴얼에 따라 반응시킨다.

(3) Real-time PCR 조건 설정 및 실행

- ① 장비의 소프트웨어를 실행시킨다.
- ② 사용하려는 장비에 따라 다음과 같이 dye를 설정한다.

Target	Detector	
	ABI7500	CFX96
TB	FAM	FAM
NTM	JOE	HEX
IC (internal control)	Cy5	Cy5
Reference dye	ROX	-

③ 아래와 같이 PCR 조건을 입력하고 반응을 실시한다.

PCR 조건		
온도	시간	Cycles
50 °C	2 분	1 cycle
95 °C	10 분	1cycle
95 °C	15 초	40 cycle
60 °C	60 초	

4) 결과 판정

(1) 반응이 일어나는 동안 방출된 형광수치는 장비의 소프트웨어에 의해 분석된다.
- 아래조건에 따라 장비를 조정하여 분석을 수행하여야 한다.

(2) 결과 분석 전, 다음과 같이 설정값을 지정한다.

Target	Threshold setting	
	ABI7500	CFX96
TB	0.15	900
NTM	0.1	500
Internal control	0.05	200

(3) 아래 표를 참고하여 분석이 완료된 수치를 통해 검출 유무를 판단한다.

	TB (FAM)		NTM (JOE/HEX)		IC (Cy5)		증폭 결과	분석결과
	Ct	결과	Ct	결과	Ct	결과		
1	<40	양성	<40	양성	<40	양성	유효	TB 양성
2	<40	양성	<40	양성	UD	음성	유효	TB 양성
3	<40	양성	UD	음성	UD	음성	유효	TB 양성
4	UD*	음성	<40	양성	<40	양성	유효	NTM 양성
5	UD	음성	<40	양성	UD	음성	유효	NTM 양성
6	UD	음성	UD	음성	<40	양성	유효	음성(No target)
7	<40	양성	<40	양성	<40	양성	유효	TB,NTM 중복감염 (단, NTM Ct 값이 TB 보다 낮을 때)
8	UD	음성	UD	음성	UD	음성	무효	재검

* UD: Undetermined

※ 결과 분석 시 주의사항

Internal Control Target 증폭되지 않은 경우	Control signal 모두	과	Internal Control 및 Target signal 이 나타나지 않을 경우 DNA 추출과정에서 PCR 저해 물질이 삽입된 것으로 의심되어 다시 DNA를 추출하여 재시험한다.	재검
Internal signal 이 증폭되거나 약하거나	Control signal 이 약하거나	증폭되지 않은 경우	Target signal 이 강한 경우 PCR 경쟁반응에 의해서 signal 이 감소되거나 나타나지 않을 수 있다.	시험결과 유효
Negative Control 에서 Target signal 이 증폭되는 경우	증폭되는 경우	문제	실험장소나 도구의 오염유무를 확인하고 문제가 없을 경우 PCR 준비과정에서 Contamination 이 일어난 경우 이므로 재시험을 한다.	재검
Positive Control 에서 Target signal 이 증폭되지 않은 경우	증폭되지 않은 경우	문제	반복적인 냉동과 해동으로 Positive Control 이 Degradation 된 경우 이므로 Kit 의 교체가 필요하다.	재검

5) 정도관리 (Quality Control)

(1) 제품의 사용설명서에 따라 Positive control 을 시험한 결과가 다음과 같이 측정되어야 한다.

- ① Positive control 의 TB, NTM target Ct: <30
- ② internal control Ct: <40

(2) 제품의 사용설명서에 따라 Negative control 을 시험한 결과가 다음과 같이 측정되어야 한다.

- ① Negative control 의 Ct: Undetermined
- ② Internal control 의 Ct: <40

4. 성능

번호	성능 항목	결과																																																																														
1	특이도	GeneFinder™ TB & NTM Multiplex Real-time PCR kit의 특이도를 확인하기 위하여 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (TB)와 non-tuberculosis mycobacteria (NTM)에 해당하는 총 24 종의 표준물질로 시험한 결과 TB complex 양성 및 NTM 양성으로 각각 검출되어 특이도 100%임을 확인하였다. <table border="1"> <thead> <tr> <th>번호</th> <th>균주</th> <th>고유 번호</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>1</td><td><i>M. avium</i></td><td>25291</td></tr> <tr><td>2</td><td><i>M. microti</i></td><td>19422</td></tr> <tr><td>3</td><td><i>M. fortuitum</i></td><td>6847</td></tr> <tr><td>4</td><td><i>M. gstri</i></td><td>15754</td></tr> <tr><td>5</td><td><i>M. gordonae</i></td><td>14470</td></tr> <tr><td>6</td><td><i>M. intracellulare</i></td><td>13950D</td></tr> <tr><td>7</td><td><i>M. kansasii</i></td><td>12478</td></tr> <tr><td>8</td><td><i>M. malmoensa</i></td><td>29571</td></tr> <tr><td>9</td><td><i>M. chelonae</i> subsp. <i>Chelonae</i></td><td>35749</td></tr> <tr><td>10</td><td><i>M. nonchromogenicum</i></td><td>19530</td></tr> <tr><td>11</td><td><i>M. phlei</i></td><td>11758</td></tr> <tr><td>12</td><td><i>M. scrofulaceum</i></td><td>19981</td></tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>번호</th> <th>균주</th> <th>고유 번호</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>13</td><td><i>M. szulgai</i></td><td>35799</td></tr> <tr><td>14</td><td><i>M. abscessus</i></td><td>19977</td></tr> <tr><td>15</td><td><i>M. peregrinum</i></td><td>14467</td></tr> <tr><td>16</td><td><i>M. marinum</i></td><td>927</td></tr> <tr><td>17</td><td><i>M. lentiflavum</i></td><td>51985</td></tr> <tr><td>18</td><td>H37Rv</td><td>27294</td></tr> <tr><td>19</td><td><i>M. simiae</i></td><td>25275</td></tr> <tr><td>20</td><td><i>M. terrae</i></td><td>51476</td></tr> <tr><td>21</td><td><i>M. triviale</i></td><td>23292</td></tr> <tr><td>22</td><td><i>M. vaccae</i></td><td>15483</td></tr> <tr><td>23</td><td><i>M. gilvum</i></td><td>43909</td></tr> <tr><td>24</td><td><i>M. parafortuitum</i></td><td>19686</td></tr> </tbody> </table>	번호	균주	고유 번호	1	<i>M. avium</i>	25291	2	<i>M. microti</i>	19422	3	<i>M. fortuitum</i>	6847	4	<i>M. gstri</i>	15754	5	<i>M. gordonae</i>	14470	6	<i>M. intracellulare</i>	13950D	7	<i>M. kansasii</i>	12478	8	<i>M. malmoensa</i>	29571	9	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>Chelonae</i>	35749	10	<i>M. nonchromogenicum</i>	19530	11	<i>M. phlei</i>	11758	12	<i>M. scrofulaceum</i>	19981	번호	균주	고유 번호	13	<i>M. szulgai</i>	35799	14	<i>M. abscessus</i>	19977	15	<i>M. peregrinum</i>	14467	16	<i>M. marinum</i>	927	17	<i>M. lentiflavum</i>	51985	18	H37Rv	27294	19	<i>M. simiae</i>	25275	20	<i>M. terrae</i>	51476	21	<i>M. triviale</i>	23292	22	<i>M. vaccae</i>	15483	23	<i>M. gilvum</i>	43909	24	<i>M. parafortuitum</i>	19686
번호	균주	고유 번호																																																																														
1	<i>M. avium</i>	25291																																																																														
2	<i>M. microti</i>	19422																																																																														
3	<i>M. fortuitum</i>	6847																																																																														
4	<i>M. gstri</i>	15754																																																																														
5	<i>M. gordonae</i>	14470																																																																														
6	<i>M. intracellulare</i>	13950D																																																																														
7	<i>M. kansasii</i>	12478																																																																														
8	<i>M. malmoensa</i>	29571																																																																														
9	<i>M. chelonae</i> subsp. <i>Chelonae</i>	35749																																																																														
10	<i>M. nonchromogenicum</i>	19530																																																																														
11	<i>M. phlei</i>	11758																																																																														
12	<i>M. scrofulaceum</i>	19981																																																																														
번호	균주	고유 번호																																																																														
13	<i>M. szulgai</i>	35799																																																																														
14	<i>M. abscessus</i>	19977																																																																														
15	<i>M. peregrinum</i>	14467																																																																														
16	<i>M. marinum</i>	927																																																																														
17	<i>M. lentiflavum</i>	51985																																																																														
18	H37Rv	27294																																																																														
19	<i>M. simiae</i>	25275																																																																														
20	<i>M. terrae</i>	51476																																																																														
21	<i>M. triviale</i>	23292																																																																														
22	<i>M. vaccae</i>	15483																																																																														
23	<i>M. gilvum</i>	43909																																																																														
24	<i>M. parafortuitum</i>	19686																																																																														
2	분별 민감도	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex (TB), non - tuberculosis mycobacteria(NTM)의 plasmid DNA 가 각각 1ng/μl씩 TE buffer 에 희석된 혼합액을 기준으로 각각 3000 copies/μl, 300 copies/μl, 30 copies/μl, 10 copies/μl, 3 copies/μl 농도에서 3 배치 1 회 시험하여 농도별 총 69 회 test 하였다. 그 결과 10 copies/μl 이상 농도에서는 민감도 100%를 보여주었다. 따라서 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex, non - tuberculosis mycobacteria 를 모두 검출해낼 수 있는 최소 검출한계(Limit of detection)는 10 copies/μl로 설정하였다. 음양성 판별 시 양성으로 판정되도록 하기 위한 cut-off 설정은 40 Cycle threshold(Ct)로 정한다. <table border="1"> <thead> <tr> <th>sample</th> <th>No.</th> <th>Positive</th> <th>Negative</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="2">TB/NTM 10 copies/μl plasmid DNA</td> <td>TB</td> <td>69</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>NTM</td> <td>69</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	sample	No.	Positive	Negative	TB/NTM 10 copies/μl plasmid DNA	TB	69	0	NTM	69	0																																																																			
sample	No.	Positive	Negative																																																																													
TB/NTM 10 copies/μl plasmid DNA	TB	69	0																																																																													
	NTM	69	0																																																																													
3	재현성	300000/30000/3000/300/30/10copies/μl의 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex(TB), non - tuberculosis mycobacteria(NTM)의 plasmid DNA 혼합액을 대상으로 2 명의 연구원이 1 일 3 배치로 3 일간 실험하여 제조일이 서로 다른 Lot 간, 검사자간의 재현성을 확인하였다. 시험장소간 재현성은 3 배치 1 회 실험하여 자사 평균과 타기관에서의 평균값을 비교한 결과 최소 검출한계인 10 copies/μl 농도까지 결과가 확인되었다.																																																																														
4	교차반응성	해당 균주 DNA 가 아닌 다른 균주 DNA 의 교차 반응 가능성에 대하여 42 종의 표준물질을 이용하여 시험한 결과, 모두 음성으로 확인되어 교차반응성이 나타나지 않음을 확인하였다.																																																																														

5. 사용시 주의사항 [경고 및 주의사항]

- 본 시약은 체외진단용 시약이므로 다른 목적으로 사용하지 마십시오.
- 본 제품의 서로 다른 Lot 의 시약을 섞어서 사용하지 말아 주십시오.
- 검체는 감염성 질환에 대한 감염을 배제할 수 없으므로 취급에 주의 하십시오.
- 본 제품 및 검체를 처리하는 동안에는 항상 마스크와 일회용 수술용 고무장갑 또는 비닐장갑을 착용 하십시오.
- 본 제품 및 검체를 처리하는 동안에는 흡연, 잡담, 음식을 섭취 등을 삼가야 합니다.
- 시약 튜브의 뚜껑을 열거나 내용물을 꺼낼 때 미생물에 오염이 되지 않도록 주의합니다.
- PCR 은 매우 민감도가 높은 방법이므로 carry-over 오염에 주의하여야 합니다. 특히 positive control 사용 시 주의하기 바랍니다.
- 사용 후 남은 시약은 -20℃ 이하에 보관해야 합니다.
- 시험 후 발생한 폐기물은 120℃에서 20~30 분 동안 가열한 다음 생물학적 위험성 물질로 간주 하여 폐기 처분함으로써 간접적 접촉자의 감염 및 실험 결과물에 의한 차후 실험 결과의 오류를 예방하여야 합니다.
- DNA 추출 시 상용화된 DNA prep kit를 사용하지 않으면 결과에 이상이 나타날 수 있습니다.

6. 보관 및 취급방법

형명	개봉여부	보관조건	사용기한 (제조일로부터)	비고
TB & NTM Reaction Mixture	미개봉	-20℃(냉동보관)	12 개월	완제품
	개봉	-20℃(냉동보관)	5 개월	
TB & NTM Probe Mixture	미개봉	-20℃(냉동보관)	12 개월	완제품
	개봉	-20℃(냉동보관)	5 개월	
TB & NTM Positive Control	미개봉	-20℃(냉동보관)	12 개월	완제품
	개봉	-20℃(냉동보관)	5 개월	
TB & NTM Negative Control	미개봉	-20℃(냉동보관)	12 개월	완제품
	개봉	-20℃(냉동보관)	5 개월	

• 사용기한은 용기의 외장 또는 박스를 참조하시기 바랍니다.

7. 기호(Symbol)

	체외진단분석기용 시약 (IN VITRO DIAGNOSTIC MEDICAL DEVICE)
	사용설명서 (CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE)
	온도 상한선 (UPPER LIMIT OF TEMPERATURE)
	경고 (CAUTION)

8. 참고문헌(Reference)

1) Arya M, Shergill IS, Williamson N, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Exper Rev Mol Diagn.* 2005 Mar;5(2):209-219.

9. 제조번호 및 사용기한: 제품 외장에 표기

제조원: ㈜오상헬스케어

14040 경기도 안양시 동안구 안양천동로 132

TEL : (031) 460-0300 FAX : (031) 460-9933

http://www.osanghc.com

제조업허가번호: 체외 제 652호
제조품목허가번호: 체외 제하 13-287호

MSK-07 Rev. 2021-06-08