

GeneFinder™ HLA-ABDR RealAmp kit
(수혈및이식용조직유전자검사시약 N04010.01[3])

본 제품은 [체외진단의료기기] 임.

1. 사용목적: 인체 전혈로부터 추출된 유전자(DNA)에서 HLA Class I (A, B), HLA Class II(DRB1)의 대립유전자형을 실시간유전자검출기법 (Real time PCR)으로 정성하여 저해상도 수준의 조직적합성항원을 검사하는 체외진단용 의료기기

2. 시약의 명칭 및 구성

1) 구성: 본 제품은 체외진단분석기용 시약 GeneFinder HLA-ABDR RealAmp kit (HLA-ABDR Rxn, HLA-ABDR pol., HLA-ABDR 96 Well plate)으로 구성된다. 본 제품은 1kit 당 20 회 테스트가 가능함.

일련 번호	명칭	세부 구성	외관상 특징	시약용기	Volume
1	HLA-ABDR Rxn	단일 구성	암갈색 플라스틱 용기에 담겨있는 연보라색 액상시약	암갈색튜브	20 tube X 492 µl
2	HLA-ABDR pol.	단일 구성	투명한 플라스틱 용기에 담겨있는 무색 투명한 액상시약 (파란뚜껑)	무색튜브	2 tube X 88 µl
3	HLA-ABDR 96 Well plate	단일 구성	각 well 마다 primer 및 probe 가 건조되어 있는 96 well PCR plate	-	2 plate X 5 pouch
사용설명서 1부					
20 Tests/kit					

3. 사용방법

1) 검체 준비 및 저장방법

본 진단제품에 사용될 샘플은 혈액에서 추출된 DNA 이며, 혈액 채취 시 sodium citrate 와 EDTA 같은 항응고제가 들어있는 튜브를 이용한다.

간섭물질

헤파린이 함유된 혈액샘플은 PCR 증폭반응에 장애가 유발될 수 있기에 사용하지 않아야 한다.

혈액 샘플은 2°C ~ 8°C에서 1 주일간 보관 가능하며, 추출된 DNA 는 -20°C 에서 1 년 간 보관 시 HLA 분석 결과에 영향을 주지 않는다.

DNA 추출 시 상용화된 제품인 Qiagen DNA blood mini kit, Exgene Cell SV mini kit 또는 QuickGene DNA whole blood kit 를 사용할 것을 권장한다. 추출된 DNA 샘플의 권장 농도는 50~100 ng/uL 이며 DNA 샘플의 A260/A280 값을 1.6~2.0 이내로 맞춰서 사용한다.

2) 검사 전 준비 과정

(1) 해당 장비의 준비과정

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Instrument System (유전자증폭장치, A22520.01, [2], 제수허 12-365 호)의 장비 매뉴얼을 참고한다.

① 아래 표와 같이 형광을 셋팅한다.

Target	Detector	
	5' end	3' end
A	FAM	None
B	JOE	None
DRB1	FAM	None
IC	ROX (CalRed610)	None

② PCR 반응 조건을 아래 표와 같이 설정한다.

Cycle	Stage	Temp.	Time
5 cycles	Denaturation	96 °C	5 분
	Denaturation	96 °C	25 초
	Annealing	70 °C	45 초
32 cycles	Extension	72 °C	30 초
	Denaturation	96 °C	25 초
	Annealing	65 °C	45 초
	Extension*	72 °C	30 초

* 32 cycles-Extension (72 °C) 단계에서 Data collection 을 하도록 선택한다.

(2) 시약의 준비

① 실험하려는 검체수와 동일한 수량의 HLA-ABDR Rxn 튜브를 꺼내어 녹인 뒤 잘 섞어주고 원심분리를 이용하여 약 5 초간 spin-down 하여 시약이 바닥에 잘 모이도록 한 뒤 얼음에 꽂아둔다.

② ABDR DNA pol. 튜브 1 개를 잘 섞어주고 원심분리를 이용하여 약 5 초간 spin down 한 뒤 얼음에 꽂아둔다.
③ HLA-ABDR 96 well plate 를 밀봉 파우치에서 꺼내 놓는다.

3) 검사 과정

- ① HLA-ABDR Rxn 튜브 1 개를 상온에 잠시 두어 녹인 뒤 vortex 로 잠시 섞어주고 ABDR DNA pol. 8ul 를 넣어준다.
주의) 플레이트 1 개는 2 개 샘플에 대하여 검사할 수 있으므로 샘플 2 개를 검사하는 경우, HLA-ABDR Rxn 튜브 2 개를 사용한다.
- ② 검사하고자 하는 샘플 DNA 50uL 를 ①의 튜브에 넣고 거품이 생기지 않도록 2~3 회 파이펫팅으로 섞거나 vortex 를 이용하여 잘 섞은 뒤 원심분리를 이용하여 튜브의 모든 액상을 가라앉힌다.
- ③ HLA-ABDR 96 Well plate 의 A1 부터 D12 까지 준비된 mixture 를 각 well 마다 10 uL 씩 넣어준다.
- ④ 96 well plate adhesive film 을 이용하여 plate 를 정확하게 밀봉한다. 밀봉한 HLA-ABDR 96 Well plate 는 원심분리를 이용하여 2000 rpm 에서 2 분간 원심 분리 한 뒤 시료가 플레이트 바닥에 가라앉았는지 확인한다.
- ⑤ HLA-ABDR 96 Well plate 를 Real time PCR 장비에 옮겨 놓은 뒤 설정한 PCR 프로그램에 따라서 실험을 시작한다.
주의) 사용하지 않은 플레이트는 파우치에 담아 다음 사용을 위해 밀봉한다.

4) 결과 판정

- ① 증폭반응이 이루어지는 동안 각 locus 에 특이적인 probe 및 Internal control (IC)에 특이적인 probe 에 의해서 방출된 형광은 장비에서 실시간으로 기록되고 소프트웨어에 의해 그 값이 확인된다.
- ② 특이적인 HLA allele 가 증폭된다면 반응이 일어난 well 에서 형광이 방출되어 장비로부터 각각의 Ct 값이 측정된다.
- ③ 증폭이 완료되면 아래 표에 따라서 분석 셋팅을 설정하고 결과를 확인한다.

Target	Threshold	Baseline	
		Start	End
A	150,000	6	15
B	150,000	6	15
DRB1	150,000	6	15
IC	150,000	6	15

④ 다음의 판독 기준에 따라서 양성으로 증폭된 well 을 확인한다.

유전자좌	형광	Ct 값 허용범위	결과	Comment
A	FAM	16~28	양성	Ct 값이 범위 내에 있는 경우 양성으로 판정합니다.
B	JOE	16~28	양성	
DRB1	FAM	16~28	양성	
IC	ROX (CalRed610)	≤32	양성	타겟의 증폭이 많이 일어난 경우, PCR 경쟁으로 인하여 IC 신호는 감소되거나 나타나지 않을 수 있습니다.

⑤ 양성 피크가 나타난 well 을 allele 정보가 표시된 pattern chart 를 이용하여 타이핑 결과를 확인한다.
주의) 양성 결과가 나타나는 well 에서는 internal control 의 피크가 약하거나 보이지 않을 수 있다.

- * 다음과 같이 실험결과가 유효하지 않은 경우 재 실험할 것을 권장한다.
- ① A, B, DRB1 및 Internal control 의 Ct 값이 모두 Undetermined 로 측정된 경우
- ② No typing 결과가 나오는 경우

제품의 한계

GeneFinder™ HLA-ABDR RaelAmp kit 는 모든 대립형질 유전자조합을 나타내지 않는다. 사용자 설명서에서 '이상결과의 해석' 부분을 참고하여 원인과 해결책을 파악해야 한다. 해결되지 않는 경우, 다른 제조사의 분석키트를 사용하여 결과를 비교 분석하여 확인한다.

DNA 의 품질과 정량에 따라 증폭이 달라질 수 있으므로 사용방법에서 권장한 사항을 따르지 않을 경우 시험 결과에 영향을 미칠 수 있다.

5) 정도관리 (Quality Control)

제조된 각 로트별 제품은 표준 DNA 물질 (Class I, Class II UCLA DNA Reference Panel)을 이용하여 확인할 수 있습니다. DNA 샘플로부터 얻어진 대립유전자들은 본 제품내의 primer, probe 혼합물과 반드시 반응하며 요청 시 보고서를 보내드릴 수 있습니다.

- ① HLA-A, -B, -DRB1 에 대한 reference panel 타이핑 결과: 모두 일치해야 함
- ② 내부대조물질(internal control) 결과: Ct ≤ 32 이며 모든 well 에서 관찰이 되어야 함 (단, 양성 결과가 나타나는 well 에서는 internal control 의 피크가 약하거나 보이지 않을 수 있다.)

주의) 정도관리를 실시한 결과, 기준값에 적합하지 않은 결과가 나온 경우, 검체의 상태, 오염 여부 및 장비 체크를 실시한다.

4. 성능

번호	성능 항목	결과
1	분석적 민감도	서로 다른 대립유전자를 가지고 있는 표준물질 DNA (UCLA Reference Standard Panel) 8 가지를 이용하여 100 ng/uL, 50 ng/uL, 30 ng/uL, 25 ng/uL, 10 ng/uL 로 단계 희석하여 각 농도별로 24 회 반복시험을 진행하였다. 그 결과 8 개 샘플 모두 100% 민감도를 보이는 농도는 25 ng/uL 로 나타내어 최소 검출한계의 농도는 25 ng/uL 로 설정하였다.
2	분석적 특이도	71 개의 표준 DNA 물질(Class I, Class II UCLA Reference DNA Panel)을 이용하여 시험 후 UCLA Immunogenetics Center 에서 제공하고 있는 타이핑 결과 값과 비교하였을 때 HLA-A, B, DRB1 대립유전자 모두 100% (71/71)의 일치율을 보여주고 있음을 확인하였다.
3	재현성	재현성 검증을 위해 UCLA DNA Reference Panel 의 8 개 표준물질을 사용하였으며, 시험자간/실험간 각 4 회씩, 3 배치 Lot 간 각 3 회 및 날짜별 반복 실험을 진행한 결과, 시험자간/실험간 시험에서 HLA-A, B, DRB1 대립유전자에 대한 측정결과가 모두 일치하였으며 Lot 간 및 날짜별 재현성 시험에서도 실험결과와 UCLA 타이핑 결과와 모두 일치하여 재현성에 문제가 없음을 확인하였다.
4	임상적 일치도	GeneFinder™ HLA-ABDR RealAmp kit 의 HLA-A, -B, -DRB1 형별동정의 성능평가를 위해 각각 348 명 검체를 대상으로 한국인 빈발 대립유전자에서의 형별 동정 일치도를 HLA SSP kit 과 비교하였다. 그 결과, HLA-A, -B, -DRB1 각 유전자좌별 동정결과가 동등한 성능임을 확인하였다.

5. 사용시 주의사항 [경고 및 주의사항]

1. 일반적인 주의사항

- 1) 본 제품은 체외진단용으로만 사용 가능하다.
- 2) 검사는 숙련되거나 인가된 전문가에 의해 사용되어야 한다.
- 3) 모든 시약은 우수실험실관리기준(GLP)에 따라 관리되어야 하며, 모든 환자 검체들은 잠재적 감염 검체로서 다루어져야 한다.
- 4) 제품에 표시된 유효기간을 지켜야 한다.
- 5) 제품의 액상이 탁하거나 세균감염 시 사용을 금한다.

2. 생물학적 위험 경고

- 1) 모든 혈액 샘플은 잠재적인 감염성 검체로써 다루어야 한다. 인간 혈액으로부터 전달된 샘플이 감염원을 보유하고 있지 않다는 어떠한 보증도 없다.
- 2) 사용된 모든 PCR 플레이트는 잠재적 감염성으로 다루어져야 하며, 유효한 국가적 지침에 따라 파기되어야 한다.
- 3) 사용한 모든 검체, 시약 또는 다른 잠재적인 오염 물질을 규제에 따라서 처리하고 폐기해야 한다.
- 4) 실험 시 보편적인 주의사항을 반드시 따르며, 검체를 다룰 시 감염을 일으킬 수 있는 가능성을 내포하고 있으므로 조심하여 취급한다.
- 5) 본 제품 및 검체를 다루는 동안 마스크, 일회용 장갑 등의 보호 장비를 착용해야 한다.
- 6) 실험 후에는 반드시 손을 깨끗하게 세척하고 사용한 일회용 장갑은 생물학적 위험 폐기물로 처리해야 한다.
- 7) 생물학적 샘플과 접촉한 모든 구성물은 반드시 폐기 전에 120°C에서 1 시간동안 고온멸균하여 폐기 처분한다.
- 8) Aerosol-resistant tip 을 사용하고 시약 사용 시 매번 새로운 tip 을 사용해야 한다.
- 9) 제품은 DNA 오염원으로부터 멀리 떨어진 곳에 보관하도록 한다.
- 10) 모든 실험실 소모품 등은 반드시 멸균된 것을 사용하고, 재사용을 금한다.
- 11) 실험에 사용되는 본 제품의 구성 시약 및 샘플의 양을 임의로 변형하거나 사용방법에서 권장하는 방법이 아닌 다른 방법을 사용하지 않는다.

6. 보관 및 취급방법

형명	개봉여부	보관조건	사용기한 (제조일로부터)	비고
HLA-ABDR Rxn	미개봉	-20°C 이하 (냉동보관)	12 개월	원제품 (1 회용)
HLA-ABDR pol.	미개봉	-20°C 이하 (냉동보관)	12 개월	
	개봉	-20°C 이하 (냉동보관)	4 주	원제품
HLA-ABDR 96 Well plate	미개봉	-20°C 이하 (냉동보관)	12 개월	원제품
	개봉	-20°C 이하 (냉동보관)	4 주	

- 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)
	사용기한 (USE BY)
	제조사 (MANUFACTURER)
	로트(배치)번호 (BATCH CODE)
	카탈로그 번호 (CATALOGUE NUMBER)

8. 제조번호 및 사용기한: 제품 외장에 표기

제조원: (주)오상헬스케어

14040 경기도 안양시 동안구 안양천동로 132

TEL : (031) 460-0300 FAX : (031) 460-9933 Site: <http://www.osanghc.com>

제품명: GeneFinder™ HLA-ABDR RealAmp Kit

모델명: IFMR-10

제조업허가번호: 체외 제 652호
제조품목허가번호: 체외 제하 15-1415호

MSK-10 Rev. 2024-04 (04)