

GeneFinder™ HLA-B*27 Plus RealAmp kit (질환진단용조직적합성유전자검사시약 N04020.01[2])

본 제품은 [체외진단의료기기] 임.

1. 사용목적

사람의 전혈에서 추출한 DNA에서 HLA-B*27 대립유전자 유전형을 실시간 중합효소연쇄반응법으로 정성하여, 질환진단용조직적합성유전자 검사에 도움을 주는 체외진단 의료기기

2. 시약의 명칭 및 구성

본 제품은 체외진단용 시약 GeneFinder™ HLA-B*27 Plus RealAmp kit (B27 Plus RM, B27 Plus PM, B27 Plus PC)으로 구성된다. 본 제품은 1 kit 당 100회 혹은 50회 테스트가 가능하다.

일련 번호	명 칭	세부 구성	외관상 특징	Cap color	Volume
1	B27 Plus RM	단일 구성	투명한 플라스틱 용기에 담겨있는 무색 투명의 액상시약	연보라색	1 X 1,000 μ l
2	B27 Plus PM	단일 구성	암갈색 플라스틱 용기에 담겨있는 연파란색 액상시약	흰색	1 X 500 μ l
3	B27 Plus PC	단일 구성	투명한 플라스틱 용기에 담겨있는 무색 투명의 액상시약	붉은색	1 X 50 μ l
사용설명서 1 부 (Quick Manual)					
100 Tests/kit					

일련 번호	명 칭	세부 구성	외관상 특징	Cap color	Volume
1	B27 Plus RM	단일 구성	투명한 플라스틱 용기에 담겨있는 무색 투명의 액상시약	연보라색	1 X 500 μ l
2	B27 Plus PM	단일 구성	암갈색 플라스틱 용기에 담겨있는 연파란색 액상시약	흰색	1 X 250 μ l
3	B27 Plus PC	단일 구성	투명한 플라스틱 용기에 담겨있는 무색 투명의 액상시약	붉은색	1 X 50 μ l
사용설명서 1 부 (Quick Manual)					
50 Tests/kit					

3. 사용방법

1) 검체 준비 및 저장방법

- 검체 준비: 본 제품에 사용되는 검체는 항응고제 (EDTA)가 첨가된 혈액에서 추출한 genomic DNA 이다. 혈액 샘플은 반드시 실험실 가이드라인에 따라서 수집해야 한다.
- 저장 방법: 혈액샘플은 2°C ~ 8°C에서 냉장 보관하고 3 일 이내의 신선한 혈액에서 DNA 추출을 권장한다.

2) 검사 전 준비 과정

(1) DNA 추출

DNA 추출 시 QIAamp® DNA blood mini kit (Qiagen, Germany, Cat # 51106) 등의 상용화된 제품을 사용할 것을 권장한다. DNA 추출 시 반드시 제조사의 사용자 설명서에 따라서 추출하시오. 본 제품에 사용할 DNA 권장 농도는 10-100 ng/ μ l 이다.

(2) 유전자증폭장치

Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR (유전자증폭장치, A22520.01, [2], 제 수인 12-365 호) 또는 Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR (유전자증폭장치, A22520.01, [2], 제 수인 12-468 호) 또는 CFX96-IVD real-time PCR detection system (유전자증폭장치, A22520.01, [2], 제 수인 10-205 호) 또는 SLAN®-96 Real-Time PCR system (유전자증폭장치, A22520.01, [2], 제 수인 12-373 호) 또는 QuantStudio 5 Real-Time PCR Instrument (유전자증폭장치, A22520.01, [2], 체외 수인 15-1382 호)의 장비 매뉴얼을 참고한다.

증폭반응을 시작하기 전에 장비의 매뉴얼에 따라 PCR 조건을 아래와 같이 설정한다.

Step	Temperature	Time	Cycle
1	96 °C	5 min	1 cycle
2	96 °C	25 sec	5 cycles
	70 °C	45 sec	
	72 °C	30 sec	
3	96 °C	25 sec	30 cycles
	65 °C*	45 sec	
	72 °C	30 sec	

*3 Step 중 두 번째 단계인 65°C에서 data collection ON 을 하도록 선택한다.

(3) 시약의 준비

실험을 실시하기 직전에 B27 Plus RM, B27 Plus PM 및 B27 Plus PC 시약을 상온에서 완전히 녹이고 5 초간 원심 분리하여 실험에 즉시 사용한다.

3) 검사 과정

(1) Master mixture 를 제조하기 위하여 필요한 양만큼의 B27 Plus RM, B27 Plus PM 시약을 준비한다.

Note. 1 test 용 준비 시 B27 Plus RM 10 μ l, B27 Plus PM 5 μ l 를 혼합한다.

(2) Master mixture 를 잘 혼합한 후 96 well plate 또는 PCR tube 에 15 μ l 씩 분주한다.

(3) 검사하고자 하는 샘플을 5 μ l 씩 분주한다.

(4) PCR 과정의 오류를 확인하기 위하여 B27 Plus PC(positive control) 5 μ l 를 분주하고 No template control(NTC)로 D.W 5 μ l 를 분주한다.

(5) Real-Time PCR 장비에 넣고 PCR 조건에 따라 증폭 반응을 실시한다.

4) 결과 판정

증폭반응에서 HLA-B*27 대립유전자에 특이적인 probe 및 internal control 에 특이적인 probe 에 의해 방출된 형광 기록 수치는 장비의 소프트웨어에 의해 분석된다.

(1) 반응완료 후 analysis 를 선택하고, 분석하고자 하는 channel 을 선택한다.

채널 (Channel)	B*27타겟	Internal Control 타겟
	FAM	Cy5
Reference Dye*	ROX	

비고. *ABI 7500, ABI 7500 Fast, QuantStudio 5 장비의 경우에만 Reference Dye 를 선택한다.

(2) 각 장비 별로 다음과 같은 기준을 적용하여 데이터 분석을 실시한다.

장비	Threshold 설정		Baseline 설정
	HLA-B*27 (FAM)	Internal control (Cy5)	
ABI 7500	0.1	0.1	6-15
ABI 7500 Fast	0.1	0.1	6-15
Bio-Rad CFX96	500	300	6-15
SLAN-96P	0.05	0.2	1-15
QuantStudio 5	0.1	0.1	6-15

(3) 장비에서 측정된 샘플의 Ct 값을 확인하여 B27 대립유전자 양성 또는 음성을 다음 표를 참조하여 결과를 판독한다.

Ct 값		결과	비고
HLA-B*27 (FAM)	Internal control (Cy5)		
16-26	≤ 30 or U.D*	B*27 양성	IC 의 Ct 값이 범위를 벗어나더라도 B*27 대립유전자에 대한 타겟 Ct 값이 기준 범위에 포함된다면 B*27 결과는 양성으로 판정한다.
U.D or <16 or >26	≤ 30	B*27 음성	-
U.D or <16 or >26	U.D	유형하지 않음	핵산추출 과정부터 실험을 다시 실시한다.

Note. U.D*: * Undetermined 약자로 ABI7500, ABI7500 fast, QuantStudio 5 장비의 display 에서 표기된다. 장비에 따라 증폭하지 않은 값을 표기하는 방식이 다르다.

Note. Bio-Rad CFX96 : N/A, Not applicable, SLAN-96P : No Ct

5) 정도관리

B27 Plus PC(Positive Control) 및 No Template control(Ultrapure Water)을 이용하여 사용방법에 따라서 실험 시 결과가 다음과 같이 측정되어야 한다. 결과 값은 모든 장비에 적용된다

B27 Plus PC (Positive control, Kit 에 함께 제공됨)

Target	HLA-B*27 (FAM)	Internal control (Cy5)
Ct 값 범위	18 $\pm$ 3	18 $\pm$ 3

No Template control (Kit 에 포함되지 않음)

Target	HLA-B*27 (FAM)	Internal control (Cy5)
Ct 값 범위	U.D*	U.D

Note. U.D* : * Undetermined 약자로 ABI7500, ABI7500 fast, QuantStudio 5 장비의 display 에서 표기된다. 장비에 따라 충족하지 않은 값을 표기하는 방식이 다르다.
Note. Bio-Rad CFX96 : N/A, Not applicable, SLAN-96P : No Ct

4. 성능

번호	성능 항목	결과
1	분석적 민감도 (LoD)	UCLA Immunogenetics Center (USA)의 UCLA DNA Reference Panel 중 HLA-B*27 양성표준물질 4종을 선정하여 150 ng/μl, 100 ng/μl, 10 ng/μl, 2 ng/μl, 1 ng/μl, 0.5 ng/μl의 6단계 농도로 희석하여 진행하였다. 제품 3개 로트를 이용하여 총 5대의 PCR장비(ABI7500, ABI7500 Fast, CFX96, SLAN-96P, QuantStudio 5)에서 농도별로 8회 반복 실험한 결과, 모든 샘플에서 양성으로 나타나는 구간은 2 ng/μl로 측정된다.
2	분석적 특이도 (교차반응)	UCLA Immunogenetics Center (USA)의 UCLA DNA Reference Panel 중 검출목표인 HLA-B*27 유전자 외 HLA type 131종을 대상으로 실험을 하였습니다. 제품 3개 로트와 10 ng/μl농도의 표준물질 이용하여 총 5대의 PCR 장비(ABI7500, ABI7500 Fast, CFX96, SLAN-96P, QuantStudio 5)에서 2회 반복 시험한 결과 모든 표준물질에서 교차반응이 일어나지 않음을 확인하였다.
3	분석적 특이도 (간섭반응)	HLA-B*27 검사에 사용할 Human genomic DNA 를 추출함에 있어 전혈(whole blood)에서 유래할 수 있는 간섭물질 3 종(Hemolytic, Icteric, Lipemic)과 항응고제 유래성분 4 종(K2-EDTA plasma, K3-EDTA plasma, Li-heparin plasma, sodium citrate plasma) 총 7 종을 선별하여 반복 실험한 결과 Li-heparin plasma 를 제외하고 간섭반응이 없음을 확인하였다.
4	정밀도 (반복성)	UCLA Immunogenetics Center (USA)의 UCLA DNA Reference Panel 중 HLA-B*27 양성표준물질 4종을 선정하여 고농도, 중농도 및 저농도인 100 ng/μl, 50 ng/μl, 10 ng/μl의 농도로 1개 로트의 자사 제품을 대상으로 총 5대의 PCR장비(ABI7500, ABI 7500 Fast, QuantStudio 5, CFX 96, SLAN-96P)에서 20일간 하루에 2회씩, 2회 반복 시험을 진행하였다. 반복성 실험한 결과 CV%는 5%이내로 확인되었으며 100% 양성 검출하여 반복성을 확인하였다.
5	정밀도 (재현성)	UCLA Immunogenetics Center (USA)의 UCLA DNA Reference Panel 중 HLA-B*27 양성표준물질 4 종을 선정하여 고농도, 중농도 및 저농도인 각각 100 ng/μl, 50 ng/μl, 10 ng/μl의 농도로 Lot 간(3 개 로트, 5 일, 5 반복), 검사자간(1 개 로트, 5 일, 검사자 3 명, 5 반복), 시험장소간(1 개 로트, 5 일, 장소 3 곳, 5 반복) 시험을 진행하였다. 재현성 시험 결과 CV%는 5% 이내로 확인되었으며 100% 양성 검출하여 재현성을 확인하였다.
6	상관성	표준물질 110 종을 이용하여 기허가 제품과의 Cohen's kappa 일치도 확인을 통해 동등성을 비교하였다. 시험결과 HLA-B*27 양성 11 건 검출 및 HLA-B*27 음성 99 건 불검출의 동일한 결과를 통해 k-value 는 1.00(거의 완벽한 일치(good))으로 나타나 두 제품이 동등함을 확인하였다.

5. 사용시 주의사항 [경고 및 주의사항]

본 제품은 체외진단용으로 사용해야 한다.

일반적인 경고 및 주의사항

- 제품을 사용하기 전에 반드시 사용자 매뉴얼을 읽고 숙지하시기 바랍니다.
- 0.1% v/v 치아염소산나트륨(sodium hypochlorite)을 이용하거나 또 다른 소독제를 사용하여 검체가 사용된 주변을 청소하고 소독하시기 바랍니다.
- 사용한 모든 검체, 시약 또는 다른 잠재적인 오염 물질을 규제에 따라서 처리하고 폐기하시기 바랍니다.
- 실험 시 보편적인 주의사항을 반드시 따르며, 검체를 다룰 시 감염을 일으킬 수 있는 가능성을 내포하고 있으므로 조심하여 취급하시기 바랍니다.
- 본 제품 및 검체를 다루는 동안 마스크, 일회용 장갑 등의 보호 장비를 착용하여 주십시오. 실험 후에는 반드시 손을 깨끗하게 세척하시고 사용한 일회용

장갑은 생물학적 위험 폐기물로 처리하시기 바랍니다.

- 생물학적 샘플과 접촉한 모든 구성물은 반드시 폐기 전에 120°C에서 20~30분 동안 고온멸균 후 폐기 처분하십시오.
- 본 제품 및 검체를 다루는 공간에서는 흡연, 음식을 섭취, 음료수 섭취 및 화장을 하지 마십시오.
- 절대로 입으로 파이펫팅 하지 마십시오.
- 제품 박스 및 모든 구성품의 라벨에 적혀 있는 유효기간을 준수하여 사용하시기 바랍니다.
- 유효기간이 지난 제품은 사용하지 마십시오.
- Aerosol-resistant tip을 사용하고 시약 사용 시 매번 새로운 tip을 사용하시기 바랍니다.
- 모든 구성 시약은 반드시 권장 온도에서 보관하시기 바랍니다.
- 서로 다른 배치의 제품의 구성물을 혼합하여 사용하지 마십시오.
- 제품은 DNA 오염원으로부터 멀리 떨어진 곳에 보관하시기 바랍니다.
- 모든 실험실 소모품 등은 반드시 멸균된 것을 사용하고 재사용을 금합니다.
- 제품이나 구성품의 변형 또는 파손이 일어난 경우 제품의 안정성이 떨어지거나 손상이 나타날 수 있습니다.
- 모든 기구 및 장비는 주의 깊게 다루며, 정돈관리 및 캘리브레이션 등에 대해서는 제조사의 매뉴얼을 따르시기 바랍니다.
- 실험에 사용되는 본 제품의 구성 시약 및 샘플의 양을 임의로 변형하거나 사용방법에서 권장하는 방법이 아닌 다른 방법을 사용하지 마십시오.
- 이 제품에 의해 산출되는 결과는 다른 임상적, 실험적 결과와 함께 해석되어야 합니다. 제조사에서 권장하지 않은 실험 방법에 의한 잘못된 결과는 사용자에게 책임이 있습니다.
- 이 제품은 사람의 생물학적 샘플을 사용하므로 이에 알맞은 방법에 의해 gDNA가 추출되어야 합니다.
- 오염된 gDNA를 이용하여 이 제품에 사용하지 마십시오. 유효하지 않은 결과가 발생할 수 있습니다.
- 약제에 의한 저해효과에 대한 데이터는 제공하지 않습니다.
- 헤파린과 같은 물질은 PCR 저해제이므로 사용을 금합니다.

6. 보관방법 및 사용기간

제품명	개봉여부	보관조건	유효기한 (제조일로부터)
GeneFinder™ HLA-B*27Plus RealAmp kit	미개봉	-20±5°C (냉동보관)	12 개월
	개봉	-20±5°C (냉동보관)	개봉일로부터 6 개월

- 냉·해동 가능 횟수: 12회
- 사용기한은 용기의 외장 또는 박스를 참조하시기 바랍니다.

7. 기호(Symbol)

	체외진단분석기용 시약 (IN VITRO DIAGNOSTIC MEDICAL DEVICE)
	사용설명서 (CONSULT INSTRUCTIONS FOR USE)
	온도 상한선 (The upper and lower limits of temperature range)
	경고 (CAUTION)
	사용기한 (USE BY)
	제조사 (MANUFACTURER)
	로트(배치)번호 (BATCH CODE)
	카탈로그 번호 (CATALOGUE NUMBER)
	테스트 횟수 (Number of tests)

8. 제조번호 및 사용기한: 제품 외장에 표기

제조원: ㈜오상헬스케어

14040 경기도 안양시 동안구 안양천동로 132

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

제품명: GeneFinder™ HLA-B*27 Plus RealAmp Kit

모델명: IFMR-64

제조업허가번호: 체외 제 652호
 제조품목허가번호: 체외 제인 22-4301호

MSK-64, Rev.2024-04 (05)