

GeneFinder™ HPV PCR Plus Kit (고위험성감염체유전자검사시약 N05030.01[3])

본 제품은 [체외진단의료기기] 임.

1. 사용목적

여성의 질내 분비물 또는 cervical swab 에서 추출된 DNA에서 중합효소 연쇄반응을 이용하여 32종 인유두종바이러스 (Human papillomavirus, HPV) 타입을 정성적으로 검출하는 체외진단용 시약이다.

2. 시약의 명칭 및 구성

본 제품은 체외진단분석기용 시약 GeneFinder™ HPV Plus PCR Kit (HPV Plus Reaction Mixture, HPV Plus Primer Mixture, HPV Plus Positive Control, HPV Plus Negative Control)으로 구성된다.

일련 번호	명 칭	세부 구성	외관상 특징	시약 용기	Volume
1	HPV Plus Reaction Mixture	단일 구성	연보라색 두경의 투명한 플라스틱 용기에 담겨 무색 투명의 용액	무색 튜브	1 X 1060 µl
2	HPV Plus Primer Mixture	단일 구성	암갈색 두경의 투명한 플라스틱 용기에 담겨 무색 투명의 용액	암갈색 튜브	1 X 530 µl
3	HPV Plus Positive Control	단일 구성	빨간색 두경의 투명한 플라스틱 용기에 담겨 무색 투명의 용액	무색 튜브	1 X 50 µl
4	HPV Plus Negative Control	단일 구성	초록색 두경의 투명한 플라스틱 용기에 담겨 무색 투명의 용액	무색 튜브	1 X 50 µl
사용설명서 1부 100 Tests/Kit					

3. 사용방법

1) 필요한 장비 및 재료

- PCR Machine
- Sheath fluid
- Hybridization incubator
- Pipettes
- Vortex mixer
- Pipettes tips with aerosol barrier
- Centrifuge with rotor for microtiter plates
- Disposable powder-free gloves

2) 검체 준비 및 저장방법

- (1) Cervical swab 또는 질내 분비물 검체는 상온에서 운반하여 최대 1주일 동안 2~8℃에서 보관할 수 있다. 그렇지 않을 경우, -20℃에서 3달 동안 보관할 수 있다.
- (2) Cervical swab 또는 질내 분비물의 DNA 를 추출한다. 상용화된 DNA prep Kit [Qiagen DNA mini Kit (Qiagen, Germany)] 사용을 권장한다.

위에 언급하지 않은 Kit 를 사용 후 진행했을 경우 실험 오류에 대하여 책임을 지지 않는다.

3) 검사 전 준비 과정

- (1) 해당 장비의 준비과정
유전자 증폭장치(PCR machine)를 매뉴얼을 참고하여 PCR 온도를 설정한다.
예) GeneAmp PCR System9700 (유전자 증폭장치, 수허 10-99 호)
- (2) 시약
냉동 보관 시약은 검사하기 전에 상온에서 완전히 녹인 후 사용한다.

4) 검사 과정

- (1) HPV Plus Reaction Mixture 10 µl 당 HPV Plus Primer Mixture 를 5 µl 혼합하여 필요한 만큼의 PCR Master Mixture 를 다음과 같이 제조한다.

표 1. PCR Master Mixture

II. 1. PCR Master Mixture					
Solution	No. of Samples	1	3	5	Total vol. of Master Mixture
HPV Plus Reaction Mixture		10 μ l	30 μ l	50 μ l	10 x (n+3)
HPV Plus Primer Mixture		5 μ l	15 μ l	25 μ l	5 x (n+3)
Total (PCR Master Mixture)		15 μ l	45 μ l	75 μ l	15 x (n+3)

- Pipetting error 로 인한 Master Mixture 의 부족함을 막기 위해 1 sample 분량을 여분으로 더 준비한다.
- Total Master Mixture number = n sample + 1 positive control + 1 negative control + 1 extra

- (2) PCR Master mixture 15 µl씩 각각의 well 에 분주하고, 여기에 검체에서 추출한 DNA 5 µl를 넣어 pipetting 하여 잘 섞는다. HPV Plus Positive Control, HPV Plus Negative Control 도 동일한 방식으로 준비한다.
- (3) PCR machine(유전자 증폭장치, A22520.01[2])에 넣고 다음과 같은 조건을 설정하여 증폭 반응을 실시한다.

표 2. PCR 반응조건

Temperatures / Times	Cycles
95℃ / 12 min	1 cycle
95℃ / 30 sec	10 cycles
60℃ / 30 sec	
72℃ / 30 sec	
95℃ / 30 sec	
50℃ / 60 sec	40 cycles
72℃ / 30 sec	
72℃ / 5 min	
	1 cycle

- (4) 반응이 완료되면 2% agarose gel 을 준비한다.
- (5) PCR 이 완료된 후 PCR 산물을 5 µl씩 250volt 에서 20 분간 전기영동을 실시한다.
- (6) UV transilluminator 에서 PCR product 의 size 를 확인한다.

표 3. PCR product size

구분	size
HPV	약 200 bp
Internal Control	약 150 bp

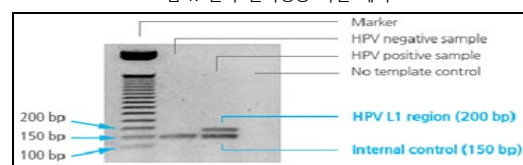
5) 결과 판정

- (1) 아래의 표와 전기영동 사진을 참고하여 결과를 판정한다.

표 4. 결과 예시

case	구분	검사 결과 (PCR size)	판정 기준
1	PCR product (Internal Control)	약 150bp	양성
	PCR product (HPV)	약 200bp	
2	PCR product (Internal Control)	약 150bp	음성
	PCR product (HPV)	No band	
3	PCR product (Internal Control)	No band	재검사
	PCR product (HPV)	약 200bp	
4	PCR product (Internal Control)	No band	재검사
	PCR product (HPV)	No band	

그림 1. 결과 전기영동 사진 예시



(2) 결과 판정 시 주의사항

- Internal Control(150bp) size 확인이 되지 않았으나 HPV(200bp) size 확인이 되었을 경우, GeneFinder™ HPV PCR Plus Kit 를 사용하여 유전자 증폭 재시험을 권장한다.
- Internal Control (150bp) size 와 HPV (200bp) size 확인이 되지 않았을 경우, DNA 추출과정부터 재시험을 권장한다.
- Negative Control 이 No band 가 아닐 경우, 재시험을 권장한다.

6) 정도관리 (Quality Control)

- (1) Kit 구성품인 HPV Plus Positive Control와 HPV Plus Negative Control을 매뉴얼에 따라 검사하고, 다음과 같은 결과를 얻어야 한다.
 - HPV PCR Product: 약 200bp에서 band 확인
 - Internal Control PCR Product: 약 150bp에서 band 확인
 - Negative Control PCR Product: No band
- (2) 정도관리는 제품의 Lot No. 가 바뀔 경우, 사용자의 필요 여부에 따라 실시한다.

4. 성능

번호	성능 항목	결과									
1	분석적 특이도	분석적 특이도는 아래표에 해당하는 30 종의 표준균주에서 추출한 DNA 를 대상으로 실험을 하였습니다. 각 DNA 농도를 1ng/ul 로 조절하여 3 회 반복 시험한 결과 PCR 증폭이 되지 않아 모두 음성 결과로 판정 되었습니다.									
		No.	Organism		자원번호	농도	No.	Organism		자원번호	농도
			종류	균주명		(ng/μℓ)		종류	균주명		(ng/μℓ)
		1	Bacteria	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	KCTC 3164	1	16	Virus	<i>Proteus spp.</i>	경상대 2242	1
		2		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCTC 35494	1	17		<i>Pseudomonas spp.</i>	KCTC 1750	1
		3		<i>Staphylococcus aureus</i>	KNRRC CCARM3792	1	18		<i>Bacteroids spp.</i>	경상대 4913	1
		4		<i>Streptococcus faecalis</i>	경상대 79	1	19		<i>Bifidobacterium spp.</i>	KCTC 3202	1
		5		<i>Streptococcus pyogenes</i>	경상대 1783	1	20		<i>Fusobacterium spp.</i>	경상대 5075	1
		6		<i>Streptococcus agalactiae</i>	경상대 1724	1	21		<i>Gardnerella vaginalis</i>	KCTC 5096	1
		7		<i>Corynebacterium spp.</i>	경상대 5057	1	22		<i>Mycoplasma hominis</i>	ATCC 23114D	1
		8		<i>Chlamydia trachomatis</i>	ATCC VR-878D	1	23		<i>Ureaplasma urealyticum</i>	ATCC 27618	1
		9		<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 700825D-5	1	24		<i>Adenovirus</i>	KBPV-VR-58	1
		10		<i>Escherichia coli</i>	KCTC 2441	1	25		<i>Cytomegalovirus</i>	KBPV-VR-7	1
		11		<i>Enterococcus spp.</i>	KCTC 3206	1	26		<i>Epstein Barr virus</i>	SNU-817EBV	1
		12		<i>Clostridium spp.</i>	경상대 4941	1	27		<i>Herpes simplex virus 1</i>	KBPV-VR-52	1
		13		<i>Peptostreptococcus spp.</i>	경상대 4727	1	28		<i>Herpes simplex virus 2</i>	KBPV-VR-53	1
		14		<i>Klebsiella spp.</i>	KCTC 2208	1	29		<i>Candida albicans</i>	KCTC 7270	1
15	<i>Enterobacter spp.</i>	KCTC 23920		1	30	<i>Trichomonas vaginalis</i>	ATCC 30001D		1		
2	분석적 민감도	식약처 표준품을 대상으로 클로닝 및 인공합성 한 32 종 HPV 타입에 대한 특이적 DNA 클론 (HPV 표준물질)을 희석하여 1000, 100, 10, 1 copy/reaction 농도에서 시험을 2 회 반복 실시하였습니다. 4 가지 농도 중 10 copies/reaction 의 몇몇 type 에서 음성을 나타내었으나, 1000, 100 copies/reaction 에서는 PCR 증폭 양성 100 % 결과를 확인했습니다. 따라서 PCR 시 32 개 HPV 유전형을 모두 검출해 낼 수 있는 최소 검출 한계 (Limit of detecton)는 100 copies/reaction 으로 설정 하였습니다.									
3	재현성	동일한 농도의 표준물질을 대상으로 제조일이 서로 다른 Lot 간 재현성을 확인하기 위한 유전형을 검정한 결과 양성 판정 100%를 나타내었습니다.									

5. 사용시 주의사항 [경고 및 주의사항]

- 본 제품은 체외진단용으로만 사용해야 합니다.
- 일반적인 경고 및 주의사항
 - 1) 제품을 사용하기 전에 반드시 사용자 매뉴얼을 읽고 숙지하시기 바랍니다.
 - 2) 본 제품의 서로 다른 Lot 의 구성 시약을 섞어서 사용하지 않습니다.
 - 3) 모든 구성 시약은 반드시 권장 온도에서 보관하시기 바랍니다.
 - 4) 제품 박스 및 모든 구성품의 라벨에 적혀있는 유효기간을 준수하여 사용하시기 바랍니다. 유효기간이 지난 제품은 사용하지 않습니다.
 - 5) 검체를 다룰 시, 감염을 일으킬 수 있는 가능성을 내포하고 있으므로 취급에 주의 하십시오.
 - 6) 10% bleach 를 이용하거나 또 다른 소독제를 사용하여 검체가 사용된 주변을 청소하고 소독하시기 바랍니다.
 - 7) 본 제품 및 검체를 다루는 공간에서는 흡연, 음식물 섭취, 잡담 및 화장을 하지 않아야 합니다.
 - 8) 본 제품 및 검체를 다루는 동안 마스크, 일회용 장갑 등의 보호 장비를 착용하고, 실험 후에는 손을 깨끗하게 세척하십시오.
 - 9) 실험에 사용되는 본 제품의 구성 시약 및 샘플의 양을 임의로 변형하거나 사용방법에서 권장하는 방법이 아닌 다른 방법으로 실험하지 않습니다.
 - 10) PCR 은 민감도가 매우 높은 방법이므로 carry-over 오염에 주의해야 합니다. 특히 Positive Control 사용 시 주의하십시오.
 - 11) 시약 튜브의 뚜껑을 열거나 내용물을 꺼낼 때 미생물에 오염이 되지 않도록 주의하십시오.
 - 12) 모든 실험실 소모품 등은 반드시 멸균된 것을 사용하고 재사용을 금합니다.
 - 13) 모든 기구 및 장비는 주의 깊게 다루며, 정도관리 및 캘리브레이션 등에 대해서는 제조사의 매뉴얼을 따르시기 바랍니다.
 - 14) 생물학적 샘플과 접촉한 모든 폐기물은 반드시 120℃에서 1 시간동안 고온 멸균하여 폐기처리 하십시오.
 - 15) DNA 추출 시 권장한 DNA prep Kit 를 사용하지 않을 경우, 결과에 이상이 나타날 수 있습니다.

6. 보관 및 취급방법

형명	개봉여부	보관조건	사용기한 (제조일로부터)	비고
HPV Plus Reaction Mixture	미개봉	-20℃(냉동보관)	12 개월	완제품
	개봉	-20℃(냉동보관)	3 개월	
HPV Plus Primer Mixture	미개봉	-20℃(냉동보관)	12 개월	완제품
	개봉	-20℃(냉동보관)	3 개월	
HPV Plus Positive Control	미개봉	-20℃(냉동보관)	12 개월	완제품
	개봉	-20℃(냉동보관)	3 개월	
HPV Plus Negative Control	미개봉	-20℃(냉동보관)	12 개월	완제품
	개봉	-20℃(냉동보관)	3 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)
	사용기한 (USE BY)
	제조사 (MANUFACTURER)
	로트(배치)번호 (BATCH CODE)
	카탈로그 번호 (CATALOGUE NUMBER)

8. 참고문헌(Reference)

- 1) Baay, M. F. D., W. F. V. Quint, J. Koudstaal, H. Hollema, J. M. Duk, M. P. M. Burger, E. Stolz, and P. Herbrink. 1996. Comprehensive study of several general and type-specific primer pairs for detection of human papillomavirus DNA by PCR in paraffin-embedded cervical carcinomas. J. Clin. Microbiol. 34:745-747.
- 2) Bosch, F. X., M. M. Manos, N. Munoz, M. Sherman, A. Jansen, J. Peto, M. Schiffman, V. Moreno, R. Kurman, K. Shah, and I. S. Group. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. J. Natl. Cancer Inst. 87:796-802.
- 3) Guerrero, E., and K. V. Shah. 1991. Polymerase chain reaction in HPV diagnosis. Papillomavirus Rep. 2:115-118.

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 제허 13-111호

MSK-01-1 Rev. 2021-06-03