

체외진단의료기기

1. 품목정보

허가(신고)번호	체외 수인 18-4014 호	
품 목 명	자가면역질환검사시약	
분류번호(등급)	K03010.01 (2)	
모 델 명	nDNA IFA plus	
포장단위	용기 등의 기재사항 참조.	
제조번호	용기 등의 기재사항 참조.	
제조연월	용기 등의 기재사항 참조.	
수입원	상 호	아산제약(주)
	주 소	서울특별시 동대문구 청계천로 485
	전화번호	02-3290-5700
	F a x	02-3290-5750
제조사	상 호	GA Generic Assays GmbH(독일)
	(국가)	

2. 구성

2.1 체외진단의료기기

번호	명칭	세부구성
1	Substrate Slides	단일
2	Diluent	단일
3	PBS Buffer	단일
4	Conjugate	단일
5	Mounting medium	단일
6	Blotting templates	단일
7	Cover Slips	단일
8	Positive control	단일
9	Negative control	단일

2.2 별도판매구성품

해당 없음.

3. 작용원리

nDNA IFA plus는 native 이중나선 DNA에 대한 IgG 항체를 검출하기 위한 간접면역형광분석법이다. 희석된 환자검체 및 컨트롤의 항체는 슬라이드에 고정화된 세포배양물의 항원과 특이적으로 반응한다. 실온에서 30분간 배양한 후에 결합되지 못한 혈청성분들은 세척단계에서 제거된다. 결합된 항체들은 Alexa Fluor 488에 결합된 항-사람 IgG와 특이적으로 반응한다. 실온에서 30분간 배양한 후에, 잔여의 접합체는 추가적인 세척단계에 의해 고상면역복합체로부터 분리된다. 염색된 슬라이드는 형광현미경(여기파장: 490nm, 방출파장: 520nm)으로 판독한다. Crithidia 내의 native DNA의 조직학적 배열에 따라 특이적 형광염색이 발견될 수 있다: Crithidia세포의 편모근처의 기저소체와 세포핵 사이에 위치한 동원질체의 염색.

4. 사용목적

사람의 혈청에서 이중나선(native double stranded) DNA에 대한 IgG 항체를 간접면역형광분석법(IIFA; Indirect immunofluorescence assay)으로 정성 및 반정량하고, 전신성홍반루푸스(SLE; Systemic lupus erythematosus) 진단에 도움을 주는 체외진단용 의료기기.

5. 성능

번호	성능 항목	결과
1	상관성	1) 타사 제품과 비교

		<table><tr><th>혈청(희석)</th><th>nDNA IFA plus GA</th><th>nDNA IFA Test Scimedx</th><th>Nova Lite dsDNA Crithidia luciliae</th></tr><tr><td>dsDNA</td><td>++</td><td>++</td><td>+++</td></tr><tr><td>ANA</td><td>++</td><td>++</td><td>+</td></tr><tr><td>Negative Control (1:10)</td><td>-</td><td>-</td><td>/</td></tr><tr><td>NHS (1:10)</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>EGPA (1:10)</td><td>-</td><td>-</td><td>/</td></tr><tr><td>INF (1:10)</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr><tr><td>Positive Control</td><td>+</td><td>++</td><td>++</td></tr><tr><td>Negative Control</td><td>-</td><td>-</td><td>-</td></tr></table>	혈청(희석)	nDNA IFA plus GA	nDNA IFA Test Scimedx	Nova Lite dsDNA Crithidia luciliae	dsDNA	++	++	+++	ANA	++	++	+	Negative Control (1:10)	-	-	/	NHS (1:10)	-	-	-	EGPA (1:10)	-	-	/	INF (1:10)	-	-	-	Positive Control	+	++	++	Negative Control	-	-	-								
혈청(희석)	nDNA IFA plus GA	nDNA IFA Test Scimedx	Nova Lite dsDNA Crithidia luciliae																																											
dsDNA	++	++	+++																																											
ANA	++	++	+																																											
Negative Control (1:10)	-	-	/																																											
NHS (1:10)	-	-	-																																											
EGPA (1:10)	-	-	/																																											
INF (1:10)	-	-	-																																											
Positive Control	+	++	++																																											
Negative Control	-	-	-																																											
		2) 시험방법 비교 <table><tr><td colspan="2">n=164</td><td colspan="2">GA a-dsDNA ELISA</td></tr><tr><td colspan="2"></td><td>pos</td><td>neg</td></tr><tr><td>GA nDNA IFA plus</td><td>pos</td><td>39</td><td>4</td></tr><tr><td></td><td>neg</td><td>7</td><td>114</td></tr></table> 위음성 혹은 위양성 비율은 6.7%이다.	n=164		GA a-dsDNA ELISA				pos	neg	GA nDNA IFA plus	pos	39	4		neg	7	114																												
n=164		GA a-dsDNA ELISA																																												
		pos	neg																																											
GA nDNA IFA plus	pos	39	4																																											
	neg	7	114																																											
2	정밀도	1) Intra-assay precision : Intra-assay 정밀도 실험에서 양성 컨트롤은 형광강도 2+와 3+의 결과를 보였고, 음성 컨트롤은 모두 음성 결과를 보였다. 따라서 허용기준을 만족한다. 2) Inter-assay precision : Inter-assay 정밀도 실험에서 6개 로트의 양성 컨트롤은 모두 형광강도 2+와 3+의 결과를 보였고, 음성 컨트롤은 모두 음성 결과를 보였다. 따라서 허용기준을 만족한다.																																												
3	킷오프	1:10																																												
4	민감도 및 특이도	방법비교 시험의 로우데이터로부터 진단적 민감도와 진단적 특이도가 산출되었다. SLE 환자 샘플 55개 중 43개가 양성으로 평가되었으므로, 민감도는 78.2%이다. 건강한 기증 혈액 109개 중 2개가 양성으로 평가되었으므로 특이도는 98.2%이다.																																												
5	간섭	1) 내부간섭(Endogenous) : 내부간섭물질은 형광강도 2+ 혹은 3+의 결과를 보였고, reference는 2+의 결과를 보였다. 형광강도가 +/- 1단계 내에서 변화하였으므로, 허용기준을 만족한다. <table><tr><th>Dilution</th><th>RS in HS+PBS</th><th>RS in H+ PBS</th><th>RS in HB+PBS</th><th>RS in F+PBS</th><th>RS in PBS</th></tr><tr><td>1</td><td>++</td><td>++</td><td>+++</td><td>++</td><td>++</td></tr><tr><td>10</td><td>++</td><td>+</td><td>++</td><td>+</td><td>N/A</td></tr><tr><td>100</td><td>+/-</td><td>+/-</td><td>+</td><td>+</td><td>N/A</td></tr></table> 2) 외부간섭(Exogenous) : 외부간섭물질은 형광강도 측정에 변화를 보이지 않았다. 대조군(dsDNA(PBS))과 샘플(PBS/EDTA가 포함된 dsDNA)은 측정결과 2+의 형광강도를 보였다. 혈청이 없는 대조군은 음성 반응을 보였다. 따라서 허용기준을 만족한다. <table><tr><th>Concentration EDTA[mM]</th><th>PBS/EDTA without serum</th><th>dsDNA with PBS/EDTA</th><th>Negative control(PBS) without serum</th><th>dsDNA (PBS)</th></tr><tr><td>1</td><td>-</td><td>++</td><td>-</td><td>++</td></tr><tr><td>0.1</td><td>-</td><td>++</td><td>N/A</td><td>N/A</td></tr><tr><td>0.01</td><td>-</td><td>++</td><td>N/A</td><td>N/A</td></tr></table>	Dilution	RS in HS+PBS	RS in H+ PBS	RS in HB+PBS	RS in F+PBS	RS in PBS	1	++	++	+++	++	++	10	++	+	++	+	N/A	100	+/-	+/-	+	+	N/A	Concentration EDTA[mM]	PBS/EDTA without serum	dsDNA with PBS/EDTA	Negative control(PBS) without serum	dsDNA (PBS)	1	-	++	-	++	0.1	-	++	N/A	N/A	0.01	-	++	N/A	N/A
Dilution	RS in HS+PBS	RS in H+ PBS	RS in HB+PBS	RS in F+PBS	RS in PBS																																									
1	++	++	+++	++	++																																									
10	++	+	++	+	N/A																																									
100	+/-	+/-	+	+	N/A																																									
Concentration EDTA[mM]	PBS/EDTA without serum	dsDNA with PBS/EDTA	Negative control(PBS) without serum	dsDNA (PBS)																																										
1	-	++	-	++																																										
0.1	-	++	N/A	N/A																																										
0.01	-	++	N/A	N/A																																										
6	교차 반응	감염증을 진단받은 환자 혈청은 모두 음성반응을 보였다. 대조군은 예상 값대로 양성 대조군은 양성 결과, 음성 대조군은 음성 결과를 보였다. 따라서 허용기준을 만족한다.																																												

체외진단의료기기

Sample	Result	Sample	Result
Syphilis 1	-	CMV 3	-
Syphilis 2	-	Borreliosis 1	-
Syphilis 3	-	Borreliosis 2	-
Syphilis 4	-	EBV 1	-
CMV 1	-	Positive Control	+
CMV 2	-	Negative Control	-

6. 사용방법

6.1 검체 준비 및 저장방법

1) 검체 채취 및 저장방법

혈액은 정맥전자를 통해 채취한다. 혈청은 원심분리에 의해 응고된 후에 분리된다. 검체는 2-8℃에서 2일간 보관할 수 있다. 장기보관이 필요할 경우, -20℃에 보관한다. 검체의 냉·해동을 반복하는 것을 금한다. 만일 검체를 여러 분석법에 사용해야 한다면, 처음에 검체를 분취하고 -20℃에서 보관한다.

※ 검체준비 시 주의사항

유미혈청은 세포기질을 덮는 막을 형성할 수 있으므로 사용해서는 안 된다. 오염된 혈청은 세포기질을 소화하는 단백질분해효소를 포함하고 있을 수 있으므로 사용해서는 안 된다.
사용 전에 모든 검체를 실온으로 녹인다.

6.2 검사 전 준비과정

1) 시약의 준비

- 사용 전에 모든 시약을 실온으로 둔다.
- 균질성을 보장하기 위해, 혈청 검체를 부드럽게 교반한다.
- PBS buffer 준비

: 1리터의 PBS packet의 내용물을 volumetric flask에 넣고, 증류수 또는 탈이온수를 mark에 첨가한다. (증류수 사용 권장) 교반하거나 흔들어서 건조된 물질을 용해한다. 용해된 버퍼액은 반드시 pH 7.4 ± 0.2 범위여야 한다. 용액은 25℃ 또는 그 이하에서 보관하며 최소 두 달간 안정하다. pH가 바뀌거나 용액이 혼탁해지거나 혹은 침전물이 형성되면 사용하지 않으며, 집합체가 빛에 노출되지 않도록 조심한다.

2) 검체 희석

- 정성검사(Screening) : 환자혈청은 사용 전에 1:10(v/v)으로 희석되어야 한다.

e.g. 10ul 환자혈청+90ul 희석액(B)

- 반정량검사(Titration) : 희석액(B)으로 1:10(v/v)희석에 대해 4배 계단희석을 준비한다.

e.g. 100ul 환자혈청+300ul 희석액(B)

: 1:10, 1:40, 1:160, 1:640 등.

6.3 검사과정

- 1) 사용 전에 모든 시약을 실온에 놔두고(20-25℃), 거품이 형성되지 않도록 부드럽게 섞어준다.

사용 직전에 슬라이드를 파우치에서 꺼내고 마킹펜으로 슬라이드를 확인한다.

- 2) 양성/음성 대조용액 20ul과 희석된 환자검체 20ul을 각각의 웰에 분주하고, 고상화세포배양을 덮고 항원표면을 만지지 않는다.
- 3) 습윤챔버 내에서 실온으로 30분간 배양한다.(20-25℃)
- 4) 눌러서 잘 수 있는 세척통을 사용하여 PBS용액으로 부드럽게 행귀 준다. PBS용액을 웰 위에 직접적으로 흘려보내지 않는다. 교차오염을 방지하기 위해 웰간 세척을 금한다. 여러 줄 슬라이드의 경우, 두 줄을 따라 연속 슬라이드의 중앙에서부터 가장자리까지 PBS스트림을 실시한다.

- 5) PBS용액을 바꿔서 coplin jars 혹은 staining dishes에서 2X5분 동안 세척하고, 제거 전에 전반적으로 흔들어 준다.

- 6) 슬라이드를 한 번에 하나씩 세척에서 제거하고, 흡수타올 위에 얹어진 슬라이드의 가장자리를 두드려 잔여 PBS를 방출한다. 템플릿(F)을 사용하여 웰 주변을 조심스레 건조한다. 집합체 1방울을 슬라이드의 각 웰에 분주하고 커버로 덮는다.

- 7) 직사광을 피해 습윤챔버 내에서 30분간 실온으로(20-25℃) 배양한다.

- 8) 눌러서 잘 수 있는 세척통을 사용하여 PBS용액(C에서 만들어진)으로 부드럽게 행귀준다. (4에 명시된 대로)

- 9) PBS용액을 바꿔서 coplin jars 혹은 staining dishes에서 2X5분 동안 세척하고, 제거 전에 전반적으로 흔들어 준다.

- 10) 슬라이드는 세척단계에서 제거하고, PBS용액으로 에반스 블루 솔루션을 행귀다. 잔여 PBS를 방출하고, 템플릿(F)을 사용하여 웰 주변을 건조한다.

슬라이드 전체에 봉입제 2-4방울을 분주한다. 봉입제가 커버슬립과 슬라이드 사이에 연속적인 층을 형성할 수 있도록 커버슬립의 가장자리 부분을 슬라이드의 아랫부분에 댄다. 공기방울이 생기지 않도록 슬라이드의 하단에서 슬라이드 상단으로 커버슬립을 부드럽게 넣는다.

흡습제로 슬라이드 가장자리에서 잔여 봉입제를 따라낸다.

- 11) 형광현미경을 사용하여 염색된 슬라이드를 관독한다. FITC 형광 퇴색을 최소화하기 위해 한 가지범위에 오래 노출시키지 말아야 한다.

6.4 결과판정

1) 결과판정 기준: 형광강도

형광강도는 다음의 가이드라인에 따라 반정량 된다. (CDC, Atlanta, USA)

4+ = 최고형광, 밝은 황록색

3+ = 조금 밝은 황록색 형광

2+ = 분명하게 구별 가능하지만, 흐린 황록색 형광

1+ = 매우 흐릿한 형광

① 정성검사(양/음성) 판정

- 양성결과: 혈청희석은 동원질체의 homogeneous 형광염색 또는 핵 및 동원질체가 Crithidai 세포 내에서 형광강도 1+ 혹은 그 이상에서 nDNA IgG 양성으로 간주한다.

- 음성결과: 혈청희석은 nDNA IgG가 1+ 보다 적은 형광을 보일 경우와 동원질체의 특이형광패턴이 부족해 보일 경우 음성으로 간주한다. Crithidia 세포의 핵, 핵 단독, Crithidia 세포의 기저소체의 형광 염색은 nDNA에 대한 항체가 음성인 것으로 간주한다.

② 반정량검사(역가) 판정

반정량 역가법이 실시된다면, 결과는 명확히 식별 가능한 패턴을 가진 1+apple-green 형광강도가 검출되는 마지막 희석배수의 역수로 보고되어야 한다. 권장되는 4-배 연속 희석법으로 endpoint titer를 추정할 수 있다:

1:10 = 3+

1:40 = 2+

1:160 = +/-

1:640 = -

추정 역가는 80

참고 값

nDNA IFA plus	Titer
negative	< 10
positive	≥ 10

※ 결과판정 시 주의사항

각 실험실마다 혈청레벨에 대해 고유의 병리학적 nDNA IgG 참고 범

체외진단의료기기

위를 설정할 것을 권장한다.

6.5 정도관리

본 시약에 제공되는 양성 및 음성 컨트롤은 반드시 각 검사마다 포함해야 한다. 본 컨트롤은 검사샘플을 판독하기 이전에 반드시 검사되어야 하며, 다음의 결과를 증명해야 한다.

음성컨트롤: 세포는 동원질체의 형광염색이 부족한 채로 1+형광 미만을 나타내야 한다. 세포는 대조염색에 의해 붉은-오렌지형광을 나타내야 한다.

양성컨트롤: 동원질체의 형광은 3+ to 4+ 강도를 나타내야 한다.

양성컨트롤 역가검사로 시약과 현미경광학시스템의 반응성뿐만 아니라 검사의 민감도도 확인할 수 있다. 라벨에 명시된 endpoint titer는 ± 1 이내에서 재현되어야 한다. 위에 언급된 품질관리기준을 충족하지 못할 시, 재검을 실시해야 하고, 검사절차가 올바르게 진행되었는지 확인해야 한다. (배양시간 및 온도, 검체 및 세척액 희석, 세척 단계 등). 결과가 반복해서 품질관리 기준을 충족하지 못하면 담당자에게 연락을 취한다. 문제해결 가이드는 실험실 검사절차를 확인하는데 사용될 수 있습니다.

7. 사용 시 주의사항

1. 체외진단용(전문가 사용)으로만 사용한다.
2. 검사지침을 주의 깊게 따른다.
3. GA GENERIC ASSAYS GmbH 및 대리점은 설명서에 기재된 절차를 변경하거나 수정함으로써 간접적으로 또는 결과적으로 초래된 손해에 대해 책임을 지지 않는다.
4. 본 키트는 숙련된 검사자만 사용해야 한다.
5. 개별라벨이 명시된 유효기간을 준수해야 하며, 명시된 유효기간은 재구성시약에 대해서도 동일하게 준수해야 한다.
6. 기질슬라이드는 밀봉된 파우치 안에 개별 포장되어 있다. 파우치에 구멍이 있으면 사용하지 않는다.
7. 다른 로트의 시약 혹은 다른 제조사의 시약을 혼합하여 사용할 경우 시험결과가 달라질 수 있다.
8. 시약을 파이펫 할 때 시간차를 주지 않는다.
9. 모든 시약은 사용 전에 2-8℃에서 보관해야 한다.
10. 몇몇 시약은 보존제로 소량의 Sodium azide(<0.1%)를 포함하고 있으므로 삼키거나 피부에 접촉해서는 안 된다. Sodium azide는 납 및 구리 배관과 반응하여 폭발성이 높은 금속아지드를 형성 할 수 있습니다. 배관에 잔여물이 남지 않도록 시약을 폐기할 때 충분한 물로 씻어낸다.
11. 본 시약을 제조하는데 사용된, 인간체액 혹은 기관에서 추출한 원료물질을 검사하여 HBsAg 및 HIV 뿐만 아니라 HCV항체에서도 음성임을 확인하였으나, 바이러스인자가 없음을 보장하는 것은 아니므로 모든 시약 및 환자검체는 잠재적 위험성을 가진 것으로 취급한다.
12. 본 시약은 잠재적 위해성을 가진 물질들을 함유하고 있으므로, 다음의 주의사항을 준수해야 한다.
 - 본 시약을 취급하는 동안, 흡연, 음식 및 음료를 섭취하지 않는다.
 - 항상 보호 장갑을 착용한다.
 - 구성품을 입으로 물지 않는다.
 - 유출물을 즉시 닦아내고, 오염된 표면을 제거제로 완전히 세척한다.
13. 본 시약을 사용하여 단독으로 임상적 진단을 내려서는 안 되며, 전문의는 진단할 수 있는 모든 임상 및 검사소견을 고려해야 한다.
14. Endpoint titer 결정은 사용 된 형광 현미경의 유형 및 조건 그리고 실험자의 주관적 판단에 따라 달라질 수 있다.

8. 저장방법 및 사용기한

용기 등의 기재사항 참조.