

체외진단의료기기

1. 품목정보

허가(신고)번호	체외 수인 18-4607 호	
품 목 명	자가면역질환검사시약	
분류번호(등급)	K03010.01(2)	
모 델 명	cANCA 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
제조원	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

2.2 별도판매구성품

해당 없음.

3. 작용원리

cANCA IFA plus는 에탄올고정 사람 과립구를 이용하여 인간 혈청에 존재하는 호중구세포질항원에 대한 IgG 항체를 간접면역형광분석법으로 검출하는 제품이다.

희석된 환자검체 및 컨트롤의 항체는 슬라이드에 배양되어 고정화된 항원과 특이적으로 반응한다. 실온에서 30분간 배양한 후에 결합되지 못한 혈청성분들은 세척단계에서 제거된다. 결합된 항체들은 FITC에 결합된 항-사람 IgG와 특이적으로 반응한다. 실온에서 30분간 배양한 후에, 잔여의 접합체는 추가적인 세척단계에 의해 고상면역복합체로부터 분리된다.

염색된 슬라이드는 형광현미경(여과파장: 490nm, 방출파장: 520nm)으로 관독한다. 에탄올고정과립구에서 항원의 조직학적 정렬에 따라 특이적 세포질 혹은 핵주변의 형광염색이 검출된다.

4. 사용목적

사람의 혈청에서 항 호중구세포질항체(anti-neutrophil cytoplasmic antibodies)를 간접면역형광분석법(IIFA; Indirect immunofluorescence assay)으로 정성 및 반정량하고, 전신성혈관염(systemic vasculitis) 진단에 도움을 주는 체외진단용 의료기기

5. 성능

번호	성능 항목	결과
1	상관성	<p>1) 타사제품과 비교</p> <p>본 제품은 2개의 타사 제품과 비교되었다.</p> <p>*비교제품 1: The Binding Site (Birmingham, United Kingdom)</p> <p>*비교제품 2: INOVA (San Diego, California, USA)</p> <p>각 제품의 사용자설명서에 따라 시험이 실시되었으며, 다음의 표에 각 제품의 형광강도평가 결과가 나타난다.</p>

		<table border="1"> <tr> <td></td> <td>GA</td> <td>Bio-Diagnostics</td> <td>INOVA</td> </tr> <tr> <td>cANCA</td> <td>☑+</td> <td>☑+</td> <td>☑+</td> </tr> <tr> <td>pANCA</td> <td>☑+</td> <td>☑+</td> <td>☑+</td> </tr> </table>		GA	Bio-Diagnostics	INOVA	cANCA	☑+	☑+	☑+	pANCA	☑+	☑+	☑+																																				
			GA	Bio-Diagnostics	INOVA																																													
cANCA	☑+	☑+	☑+																																															
pANCA	☑+	☑+	☑+																																															
<p>형광패턴은 구별가능 하였고, 형광강도는 각 제품마다 다르게 나타났다. INOVA 제품이 가장 밝게 나타났고, GA cANCA IFA plus 가 중간, The Binding Site가 가장 약하게 나타났다.</p> <p>2) 시험 방법 비교</p> <p>시험 방법 비교를 하기 위해 335개의 혈청이 GA cANCA IFA plus와 ELISA anti-PR3로 분석되었다. 두 시험 모두 사용자 설명서에 따라 실시되었고, 염색된 진단 슬라이드는 육안으로 측정되었다. ELISA 시험은 양성과 음성 결과로 평가되었고, 네 칸의 표로 결과가 표현된다. WGga 환자 51명, WGgi 환자 20명, WGIa 환자 10명, WGIi 환자 10명, CSSa 환자 20명, CSSi 환자 20명, MPA 환자 20명, SLE 환자 40명, RA 환자 30명, RV 환자 10명, CAV 환자 10명, SSc 환자 38명, 건강한 혈액 기증자 45명, AAV 환자 11명을 포함하여, 총 335개의 혈청이 분석되었다.</p> <p>335 혈청이 검사되었고, 15개의 혈청이 위음성 또는 위양성으로 측정되었다. 위음성 및 위양성의 비율은 4.5%이다.</p>																																																		
2	정밀도	<p>1) Intra-assay precision</p> <p>: Intra-assay 정밀도 시험에서, 9번의 측정에서 형광강도의 변화가 없었다. 모든 측정에서 형광강도 2+의 결과를 보였다. 따라서 허용기준을 만족한다.</p> <p>Control에 대한 6번의 측정에서 측정결과에 변화가 없었으므로, 허용기준을 만족한다.</p> <p>2) Inter-assay precision</p> <p>: Inter-assay 정밀도 시험에서, 6번의 측정에서 형광강도 +/-1 이내로 나타났다. 모든 측정에서 2+ 혹은 3+의 결과를 보였다. 따라서 허용기준을 만족한다.</p>																																																
3	컷오프	1:20																																																
4	간섭	<p>1) 내부 간섭(Endogenous)</p> <p>: 간섭물질로 인한 약간의 영향이 발견되었다. 모든 내부간섭 물질에서 관측 가능한 간섭이 보였다. hemolytic, icteric과 fatty 혈청 사용을 피하는 것을 권장한다.</p> <table border="1"> <tr> <th>Dilution</th> <th>HS in PBS</th> <th>NS in H+PBS</th> <th>NS in B+PBS</th> <th>NS in F+PBS</th> <th>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> <table border="1"> <tr> <th>Dilution</th> <th>PS in HS+PBS</th> <th>PS in H+PBS</th> <th>PS in B+PBS</th> <th>PS in F+PBS</th> <th>PS in PBS(1:80)</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> <p>2) 외부 간섭(Exogenous)</p> <p>: EDTA는 혈청에서 간섭을 보이지 않았고, 혈청이 포함되지 않은 컨트롤은 음성 반응을 보였다.</p>	Dilution	HS in PBS	NS in H+PBS	NS in B+PBS	NS in F+PBS	PBS	1	+/-	+/-	-	++	-	10	-	-	-	++	N/A	100	-	-	-	+	N/A	Dilution	PS in HS+PBS	PS in H+PBS	PS in B+PBS	PS in F+PBS	PS in PBS(1:80)	1	++++	+++	++/+++	+++	++++	10	++++	+++/++++	++++	++++	N/A	100	+++	++++	++++	++++	N/A
Dilution	HS in PBS	NS in H+PBS	NS in B+PBS	NS in F+PBS	PBS																																													
1	+/-	+/-	-	++	-																																													
10	-	-	-	++	N/A																																													
100	-	-	-	+	N/A																																													
Dilution	PS in HS+PBS	PS in H+PBS	PS in B+PBS	PS in F+PBS	PS in PBS(1:80)																																													
1	++++	+++	++/+++	+++	++++																																													
10	++++	+++/++++	++++	++++	N/A																																													
100	+++	++++	++++	++++	N/A																																													
5	교차반응	<p>교차반응은 양성 혹은 음성으로 측정되는 샘플의 개수를 세어 도출한다. 전체 샘플 수 대비 음성 결과 비율이 계산된다.</p> <table border="1"> <tr> <th>Infection</th> <th>n</th> <th>positive results</th> <th>negative results</th> <th>Rate of cross reactivity</th> </tr> <tr> <td>EBV</td> <td>3</td> <td>3</td> <td>0</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>Toxoplasmosis</td> <td>16</td> <td>2</td> <td>14</td> <td>12.5%</td> </tr> <tr> <td>HCV</td> <td>1</td> <td>1</td> <td>0</td> <td>100%</td> </tr> <tr> <td>CMV</td> <td>25</td> <td>1</td> <td>24</td> <td>4.0%</td> </tr> <tr> <td>Rubella</td> <td>5</td> <td>0</td> <td>5</td> <td>0%</td> </tr> </table> <p>EBV와 HCV에 대한 교차반응은 논문을 통해 알려져 있다. 다른 결과들은 허용기준을 만족한다.</p>	Infection	n	positive results	negative results	Rate of cross reactivity	EBV	3	3	0	100%	Toxoplasmosis	16	2	14	12.5%	HCV	1	1	0	100%	CMV	25	1	24	4.0%	Rubella	5	0	5	0%																		
Infection	n	positive results	negative results	Rate of cross reactivity																																														
EBV	3	3	0	100%																																														
Toxoplasmosis	16	2	14	12.5%																																														
HCV	1	1	0	100%																																														
CMV	25	1	24	4.0%																																														
Rubella	5	0	5	0%																																														

체외진단의료기기

6. 사용방법

6.1 검체 준비 및 저장방법

1) 검체 채취 및 저장방법

혈액은 정맥천자를 통해 채취한다. 혈청은 원심분리에 의해 응고된 후에 분리된다. 검체는 2-8℃에서 2일간 보관할 수 있다. 장기보관이 필요할 경우, -20℃에 보관한다. 검체의 냉해동을 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 놔둔다.

6.2 검사 전 준비과정

1) 시약의 준비

사용 전에 모든 시약을 실온으로 놔둔다. 기질슬라이드는 밀봉된 파우치 내에 개별적으로 포장되어 있다. 파우치를 개봉하기 전에 슬라이드를 실온에 방치한다.

●PBS 버퍼 준비: one-liter PBS packet의 내용물을 volumetric flask에 넣고, 증류수를 mark에 첨가한다. 교반하거나 흔들어서 건조된 물질을 용해한다. 용해된 버퍼액은 반드시 pH 7.4± 0.2 범위여야 한다.

용액은 25℃ 또는 그 이하에서 보관한다. 최소 2년간 안정하다. pH가 바뀌거나 용액이 혼탁해지거나 혹은 침전물이 형성되면 사용하지 말아야 한다.

접합체가 빛에 노출되지 않도록 한다.

2) 검체 희석

■정성검사(Screening) : 환자혈청은 사용 전에 1:20(v/v)으로 희석되어야 한다. e.g. 10ul 환자혈청 +190ul 환자혈청(B)

■반정량검사(Titration) : 희석액(B)으로 1:20(v/v)희석에 대해 4배 계단희석을 준비한다. e.g. 50ul 환자혈청+150ul 희석액(B) : 1:20, 1:80, 1:320, 1:1280 etc.

6.3 검사과정

*환자검체는 검사요구에 따라 희석한다.(선별/역가)

*검사가 진행되는 동안 기질슬라이드가 마르지 않도록 한다.

1. 사용 전에 모든 시약을 실온에 놔두고(18-25℃), 거품이 형성되지 않도록 부드럽게 섞어준다. 사용 직전에 슬라이드를 파우치에서 꺼내고 마킹펜으로 슬라이드를 확인한다.

2. 파이켓

양성/음성 대조용액 1방울(25 ul)과 희석된 환자검체 25 ul을 각각의 웰에 분주하고, 고상화된 조직절편을 완전히 덮는다. 항원표면을 만지지 않는다.

3. 습윤챔버 내에서 실온으로 30분간 배양한다.(20-25℃)

4. 눌러서 잘 수 있는 세척통을 사용하여 PBS용액(C에서 만들어진)으로 부드럽게 행귀준다. PBS용액을 웰 위에 직접적으로 흘러보내지 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. 탭플릿(F)을 사용하여 웰 주변을 조심스레 건조한다. 접합체 1방울(25 ul)을 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 행군다. 잔여 PBS를 방출하고, 탭플릿(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 판독한다. FITC 형광퇴색을 최소화하기 위해 한 가지범위에 오래 노출시키지 마라.

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

※ 주의사항

형광강도의 정도는 임상 적으로 관련이 없으며 역가의 지표로서 제한된 가치 밖에 없다. 현미경 광학, 필터 및 광원의 차이로 인해 +1 이상의 차이가 발생할 수 있다.

① 정성검사(양/음성) 판정

■양성결과

: 과립구의 세포질 (cANCA) 또는 핵 주변 영역 (pANCA)에서 1+ 이상의 강도로 형광 염색이 관찰되면 혈청 희석이 ANCA 양성으로 간주된다. 세포질 패턴은 cANCA의 존재를 보여준다. pANCA 항체는 포르말린 고정 과립구 (pANCA IFA plus, REF (87161))를 사용하여 확인해야한다. 이는 핵 주위 패턴이 항핵 항체에 의해 유발되는 경우가 있기 때문이다.

■음성결과

: 혈청희석은 1+ 보다 적은 형광을 보일 경우와 세포에 특이형광 패턴(cANCA, pANCA)이 부족해 보일 경우 음성으로 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

체외진단의료기기

참고 값	
cANCA IFA plus	Titer
negative	< 20
positive	≥ 20

※ 결과판정 시 주의사항

각 실험실마다 혈청레벨에 대해 고유의 병리학적 ANCA 참고 범위를 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 1+형광 미만을 나타내야 하고 특이형광염색이 부족해야 한다. 세포는 대조염색에 의한 붉은 오렌지형광을 나타내야 한다.

양성컨트롤: 과립구의 세포질형광

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 형성할 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 위험성을 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 내리서는 안 되며, 전문의는 진단할 수 있는 모든 임상 및 검사소견을 고려해야 한다.
14. Endpoint titer 결정은 사용된 형광 현미경의 유형 및 조건 그리고 실험자의 주관적 판단에 따라 달라질 수 있다.
15. 1:20 - 1:40의 역가에서 희미한 형광염색, 또는 임상적 징후와 관련된 모호성은 3-4주 뒤에 모니터링 되어야 한다.

8. 저장방법 및 사용기한

용기 등의 기재사항 참조.