

HelixDtec™ CSFV & ASFV Assay

문서번호 : IFU-CASF-P

1. 사용목적

'HelixDtec™ CSFV & ASFV Assay'는 돼지의 전혈, 혈청, 조직시료 및 세포배양액 검체에서 돼지 열병바이러스(CSFV)의 백신주(LOM)와 야외주 및 아프리카돼지열병 바이러스(ASFV)를 실시간역전사중합효소연쇄반응법(qRT-PCR)으로 동시에 검출하여 감별진단 및 정성분석하는 동물용 체외진단 시약이다. 본 제품은 가축방역기관, 병성감정기관 및 연구기관 등에서 전문가만이 사용해야 한다.

2. 작용 원리

One-tube Multiplex Real-Time PCR 기술을 기반으로 한 시약으로, 돼지열병바이러스(CSFV)에 존재하는 유전자(5'UTR)와 아프리카돼지열병바이러스(ASFV)의 유전자(P72)를 증폭한다. 증폭된 유전자는 각각의 유전자에 특이적으로 결합하는 TaqMan Probe의 5'말단에 결합된 fluorophore (FAM, VIC, Texas Red, Cy5)와 3'말단에 결합된 quencher의 작용에 의해 발생하는 형광신호를 Real-Time PCR Detection System로 측정하여 실시간으로 확인한다.

돼지열병바이러스(CSFV)의 백신주(LOM)와 야외주는 5'UTR 유전자를 표적으로 allele specific probe를 사용함으로써 감별된다. 대조로써 IC(Internal Control)은 돼지의 Actin을 표적유전자로 설정함으로써 IC의 Ct값 확인을 통하여 핵산 추출 및 PCR 정상 작동 여부를 판단할 수 있도록 하였다.

3. 제품 구성

HelixDtec™ CSFV & ASFV Assay (100 tests)	
Cat. No.	CASFV-T100
2x qRT-PCR Premix (CASF)	1.0 ml * 1 ea
4x Oligo Mix (CASF)	0.5 ml * 1 ea
PC (CASF)	0.05 ml * 1 ea
RNase free Water	1.0 ml * 1 ea
IPC	0.5 ml * 1 ea
사용자 설명서	1 ea

4. 저장 및 사용기간

- 1) 본 제품은 -20°C 이하의 온도에서 보관한다.
- 2) 유통 기한은 제조일로부터 12개월이다.
- 3) 냉동 및 해동은 5회로 제한한다.
- 4) 시약은 개봉 후 30일 이내로 제한한다.

5. 부가적으로 필요한 실험 재료 및 장비

Instrument	Bio-Rad CFX96™ Real-time PCR detection system
Materials	<p>Micropipettes, adjustable</p> <p>Aerosol barrier, RNase- and DNase-free tips</p> <p>PCR tube (8-tube/cap strip, 96 well plate)</p> <ul style="list-style-type: none"> • Low-Profile PCR Tubes 8-Tube Strip, white (Cat. No. TLS0851, Bio-Rad) • Optical Flat 8-Cap Strips (Cat. no. TCS0803, Bio-Rad) <p>Microtubes 1.5ml or 2ml</p> <p>Latex Gloves</p> <p>Vortex mixer</p> <p>Micro Centrifuge</p>

6. 검사 시료 준비

1) 검체 준비

- 검체는 돼지의 전혈, 혈청, 조직시료 및 세포배양액을 준비한다.
- 오랜 기간 보관하거나 냉동과 해동을 반복하면, 검사의 민감도가 떨어질 수 있으므로 주의하며, 장기 보관 시 잔류 검체는 -70도 이하로 보관한다.
- -20도 이하의 온도에서 보관된 검체는 완전히 해동하여 사용한다.
- 사용하기 전 5~10초가량 Vortex하여 잘 혼합한 후 spin-down하여 사용한다

2) 핵산 추출

- 핵산 추출은 시판 중인 QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen' 또는 QIAamp RNA Mini Kit, Qiagen' 혹은 'QIAamp Viral Kit, Qiagen'을 사용하여 분석을 실시하며, 사용자가 임의로 사용하는 핵산 추출 시약에 대한 Q.C.는 자체 검증을 거쳐서 사용한다.
 - 핵산 추출은 각 제품의 매뉴얼에 따라 시행한다.
- ※ 주의: 검체의 핵산 분리 및 추출에 사용되는 lysis solution에 IPC 5ul를 첨가한 후 핵산 추출을 진행한다(검체에 직접 IPC를 첨가하지 않도록 한다).

7. 검사 방법

1) PCR Mixture 제조

※ 주의 : Real-Time PCR tube는 clear tube 사용 시 형광 검출 저하로 인해 결과 판정에 영향을 줄 수 있어, white tube 사용을 권장한다.

① PCR Master Mix를 준비한다.

* 실험 진행 시, 적어도 1개 이상의 Negative Control(RNase free Water)와 Positive Control (PC(ASF))가 포함되어야 한다.

* PCR Master Mix의 양은 Test와 control(Positive + Negative)의 수보다 최소 1~2개 반응수를 더 추가하여 준비한다.

Component	Volume (1 test)
2x qRT-PCR Premix (CASF)	10.0 μ L
4x Oligo Mix (CASF)	5.0 μ L
Total volume per reaction	15.0μL

② PCR Master Mix를 5~10초 가량 vortex하여 잘 혼합한 후 spin-down 한다.

③ PCR tube에 준비된 PCR Master Mix를 15 μ L씩 분주하고, template*를 5 μ L씩 분주한다.

* 실험 검체: 검체로부터 추출한 핵산 5 μ L

* Positive Control (PC): PC (CASF) 5 μ L

* Negative Control (NC): RNase free Water 5 μ L

Component	Volume (1 test)
PCR Master Mix	15.0 μ L
Template	5.0 μ L
Total volume per reaction	20.0μL

④ PCR tube의 뚜껑 닫고 spin-down한다.

2) PCR 조건 및 형광채널 설정

① Target별 형광채널 설정

Target	CFX96	ABI
LOM 백신주	FAM	FAM
야외주	VIC	JOE
아프리카돼지열병	Texas Red	Texas Red
돼지 control (Internal control, IC)	Cy5	Cy5

② PCR 조건

Step	Condition	Cycle(s)
cDNA synthesis	50°C for 10 min	1
Enzyme activation	95°C for 5 min	1
PCR Amplification	95°C for 5 sec	40
	62°C for 20~25 sec Collect the fluorescence data	

8. 결과분석 및 판정

1) Threshold setting

Instrument	Fluorescence	Threshold (RFU)	Base start-end
CFX 96	FAM, VIC	200	-
	Texas Red	500	-
	Cy5	100	-
ABI	FAM, JOE, Texas Red, Cy5	5,000	3-15

2) 결과분석

① Interpretation criteria quality control

* Quality control인 Negative Control(NC)와 Positive Control(PC)의 결과는 검체 결과를 해석하기 전에 수행하여야 한다. Quality control의 시험 결과가 유효하지 않으면 검체 결과를 해석할 수 없다. 이럴 경우, 'Troubleshooting'에 따라 다시 실험을 수행하여야 한다. Quality control 시험 결과 해석은 아래 표에 작성된 기준에 따른다.

Control	Target(Fluorescence) and Ct Value			Interpretation
	VIC	Texas Red	Cy5 (IC)	
PC(CASF)	< 32	< 32	< 32	Valid
NC	N/A	N/A	N/A	Valid

② Interpretation criteria for specimen: 각 target의 Ct value

Target	Fluorescence	Ct value	Interpretation
LOM 백신주	FAM	≤ 38	Positive (+)
		> 38or N/A	Negative (-)
야외주	JOE or VIC	≤ 38	Positive (+)
		> 38or N/A	Negative (-)
아프리카돼지열병	Texas Red	≤ 38	Positive (+)
		> 38or N/A	Negative (-)
돼지 control (IC)	Cy5	≤ 38	Positive (+)
		> 38or N/A	Negative (-)

3) 결과해석

Case	FAM	VIC	Texas Red	Cy5	Interpretation	Comment
1	+	-	-	+	돼지열병 양성 (LOM 백신주)	- 모든 Target 결과는 유효함
2	-	+	-	+	돼지열병 양성 (야외주)	
3	-	-	+	+	아프리카 돼지열병 양성	
4	+	+	-	+	돼지열병 양성 (야외주, LOM 백신주)	- 모든 Target 결과는 유효함 - 재검사 확인을 권장함
5	+	+	+	+	돼지열병 양성 (야외주, LOM 백신주) 아프리카 돼지열병 양성	
6	-	+	+	+	돼지열병 양성 (야외주) 아프리카 돼지열병 양성	
7	+	-	+	+	돼지열병 양성 (LOM 백신주) 아프리카 돼지열병 양성	
8	-	-	-	-	Invalid/Retest	- 결과가 유효하지 않으므로, 재검사를 실시. - 재검사에도 동일한 결과일 경우, 핵산추출 또는 검체 채취부터 다시 수행하여 재검사 실시.
9	-	-	-	+	돼지열병, 아프리카돼지열병 음성	

4) Trouble shooting

① Target과 IPC의 형광신호가 나타나지 않는 경우

문제 원인	해결방안
검체 채취가 잘못된 경우	검체 채취를 다시 수행한다.
핵산 추출이 잘못된 경우	핵산을 다시 추출한다.
PCR의 조건이 잘못 설정된 경우	PCR의 조건을 다시 확인하고, 잘못 설정되었을 경우 조건을 올바르게 설정한 후 재시험한다.
형광 신호를 잘못 설정한 경우	사용설명서에 기재되어 있는 각 Target의 형광 신호를 올바르게 설정한다.
시약의 오류	보관 조건 및 유효기간을 확인하고, 새로운 시약을 사용한다.
저해 물질이 존재하는 경우	핵산을 다시 추출하거나, 추출된 핵산을 RNase free Water로 10~100배 희석한다.

② Negative Control 형광신호가 나타난 경우

문제 원인	해결방안
교차 오염이 발생한 경우	검사 장비와 검사 공간을 모두 닦아 오염을 제거한다. 전체 시험 과정에서 filter tip을 사용하고, 새로운 시약을 사용하여 핵산 추출 과정부터 다시 시험을 수행한다.
시약이 오염된 경우	새로운 시약을 사용하여 재시험을 수행한다.

③ Positive Control 형광신호가 나타나지 않는 경우

문제 원인	해결방안
시약의 오류	새 제품을 사용하여 재시험한다. 제품을 권장된 조건에서 보관하고 사용한다.
PCR의 조건이 잘못 설정된 경우	PCR의 조건을 다시 확인하고, 잘못 설정되었을 경우 조건을 올바르게 설정한 후 재시험한다.
형광 신호를 잘못 설정한 경우	사용설명서에 기재되어 있는 각 Target의 형광 신호를 올바르게 설정한다.
PCR mixture를 잘못 만든 경우	PCR mixture 제조시, 사용설명서에 따라 올바르게 혼합하여 시험한다.

9. 사용 시 주의사항

- 1) 본 제품은 동물용 제외 진단용으로만 사용한다.
- 2) 본 제품은 질병진단에 사용되는 동물용 제외진단시약으로 가축방역기관 및 병성감정기관과 연구기관 등에서 전문가만이 사용해야 한다. (축산농가 사용제외)
- 3) 검체 및 양성대조물질 등 검사 결과에 영향을 미칠 수 있는 물질들은 잠재적 감염성이 있으므로, 전염성 물질과 같은 방법으로 주의하여 취급한다.
- 4) 감염 물질의 취급 시에는 실험용 가운과 장갑(개인 보호 장비)을 반드시 착용하고 취급 후 손을 깨끗이 씻는다.
- 5) 감염 물질을 다루는 장소에서 취식하거나 담배를 피우거나 화장품을 바르거나 콘택트 렌즈를 취급하지 않는다.
- 6) 유효 기간이 지난 제품은 사용하지 않는다.
- 7) 제품은 -20 °C 이하에 보관하고, 냉해동은 5회 이상 반복하지 않는다.
- 8) 타 제품의 시약 및 동일 제품의 Lot번호가 다른 시약을 혼용하지 않는다.
- 9) 오염을 방지하기 위해 aerosol barrier, RNase, DNase-free filter tip의 사용을 권장한다.
- 10) PCR을 사용하기 전에 사용설명서에 기술된 PCR 조건과 형광 신호의 선택이 올바르게 설정되어 있는지 확인한다.
- 11) PCR은 매우 민감한 분석 방법이므로 교차 오염에 주의한다.
- 12) 규정에 따라 사용하지 않는 시약, 폐기물 및 검체를 폐기한다.
- 13) 시약이 눈에 들어간 경우 즉시 물로 행구고 의사의 지시를 따른다.
- 14) 시약이 피부에 닿으면 즉시 물로 행군다.
- 15) PCR 기기는 제조사의 지시에 따라 주기적으로 관리한다.
- 16) 본 제품의 검사 결과는 다른 임상결과 및 실험결과와 함께 전문 수의사가 종합적으로 판단하여 최종진단을 내려야 한다.

10. 기술 지원

- 기술 지원 및 제품 관련 문의는 본사의 전략마케팅사업부로 연락 바랍니다.
- 전화번호 : 042-867-9055
- 이메일 주소 : info@nanohelix.net

LOT	제조번호(Lot Number)	REF	모델명 (Catalogue Number)
	사용기한		저장온도
	경고		제조자
	사용설명서		