

### 01 제품 개요

Opti PED/TGE/RotaAC Multi-qPCR은 돼지로타바이러스 (Porcine Rotavirus) A/C형 감별, 돼지 유행성 설사 (Porcine epidemic diarrhea; PED) 및 돼지전염성위장염 (Porcine Transmissible gastroenteritis; TGE) 감염이 의심되는 시료에 대해 특이 유전자를 실시간 중합효소연쇄반응법(Real-time PCR)으로 증폭하여 바이러스의 존재 여부를 검사하는 체외진단시약입니다.

### 02 제품 특성

- (1) Opti PED/TGE/RotaAC Multi-qPCR은 유전자증폭 (PCR)에 필요한 Primer, 형광 Probe, RT mix, Taq Polymerase 등 RNA로부터 유전자를 증폭하기 위한 필수 구성요소가 들어있습니다.

### 03 제품 구성

| NO. | REAGENTS              | 96T            |
|-----|-----------------------|----------------|
| 1   | 8-strip               | 8*12 strip     |
| 2   | Positive control (PC) | 100µl/vial, 1개 |

### 04 검사 준비

#### 4.1 검체 준비 및 저장방법

- (1) 돼지에서 유래된 분변, 조직 유제액 등을 무균용기에 넣어 밀봉된 상태로 채취한 후, 즉시 RNA를 추출하도록 합니다.

! 검체 채취 후 4°C를 유지하며 24시간 이내에 검사소로 송부하여, 바로 RNA를 추출해야 합니다. 검체를 오랜 기간 보관하거나 냉동과 해동을 반복하면 검사 민감도가 떨어질 수 있습니다.

#### 4.2 검체 전처리 및 핵산 추출 등

- (1) 100~200µl 혈액, 혈청 및 조직 등에서 RNA를 추출하며, RNA 추출 방법은 각 제조사의 설명서를 참고하십시오.
- (2) 추출한 RNA는 PCR을 수행할 때까지 -20°C에 보관하며, 냉동 보관된 모든 검사 시약은 실험 전에 아이스에서 녹입니다.

! 본 제품은 RNA를 추출하는 별도의 시약을 제공하지 않으며, 사용하는 RNA 추출 Kit의 해당 사용 설명서에 따라 진행하시길 바랍니다.

- (3) Real-time PCR 기기를 95°C로 예열합니다.

### 05 PCR 검사

#### 05.1 PCR Master mixture 조성

- (1) 검사하려고 하는 시료의 수, 양성대조군, 음성대조군에 여분을 고려하여 8-strip을 준비하도록 합니다.
- (2) 8-strip에 template 및 양성 대조액을 5µl를 각각 분주합니다.

Opti PED/TGE/RotaAC Multi-qPCR

User Manual

## (Cat. No. SWVM-015)

(3) 뚜껑을 닫고 살짝 tapping하여 섞어준 후 원심분리 (spin-down)를 합니다

(2) 음성 대조군이 음성으로, 양성대조군(PC)이 양성(Ct값 18±3)으로 판독되었을 때에 정상적인 결과 판정을 진행하며, Ct값 35 이하의 범위 내에서의 결과를 양성으로 판독합니다.

### 05.2 PCR 증폭 진행

(1) 샘플을 Real-time PCR 기기에 넣어 다음 표의 조건으로 반응을 진행합니다.

(3) 결과 분석은 다음 표와 같습니다.

| NO. | 온도 및 시간                                | Cycle                           |
|-----|--|---------------------------------|
| 1   | 50°C, 10min<br>(Reverse transcription) | 1 cycle                         |
| 2   | 95°C, 3min<br>(Pre-denaturation)       | 1 cycle                         |
| 3   | 95°C, 3sec<br>(Denaturation)           | 10 cycle                        |
| 4   | 60°C, 30sec<br>(Annealing)             |                                 |
| 5   | 95°C, 3sec<br>(Denaturation)           | 40 cycle<br><b>(plate read)</b> |
| 6   | 55°C, 30sec<br>(Annealing)             |                                 |

| Amplification Signal     | 결과 분석                      |
|--------------------------|----------------------------|
| FAM 양성                   | 양성 (Rotavirus A형)          |
| Cal Red 610              | 양성 (Rotavirus C형)          |
| HEX 양성                   | PED 양성                     |
| Cy5 양성                   | TGE 양성                     |
| FAM 양성,<br>Cal Red610 양성 | 양성 (Rotavirus A, C 혼합감염)   |
| FAM 양성,<br>HEX 양성        | 양성 (Rotavirus A, PED 혼합감염) |
| FAM 양성,<br>Cy5 양성        | 양성 (Rotavirus A, TGE 혼합감염) |
| PC 양성<br>나머지 음성          | 음성                         |

PCR 기계에서 dye 설정 시에는, FAM/HEX(VIC)/Cal Flour Red 610(ROX)/Cy5 한 well 에서 설정될 수 있도록 지정합니다.

### 06 결과판정

(1) 반응의 결과는 Real-time PCR 기기에서 실시간으로 측정되며, threshold은 자동으로 설정된 값을 기준으로 Ct값을 확인합니다.

### 07 사용 기간

Opti PED/TGE/RotaAC Multi-qPCR은 -20°C에서 제조일로부터 12개월(유효기간)이내에 사용해야 하며, 시약의 반복적인 냉동과 해동은 검사의 민감도에 영향을 미칠 수 있습니다.

### <사용 시 주의사항>

#### 1. 주의사항

- ① 본 제품은 질병진단에 사용되는 동물용 체외 진단시약으로 병성감정기관 등에서만 사용합니다.(축산농가 사용제외)
- ② 검체는 위험성동물전염병으로 사용자에게 대한 안전사항 및 검사 후 실험실 내외 질병이 확산되지 않도록 주의하여 다루도록 합니다.
- ③ 본 키트로 확인된 결과는 확진용으로 사용할 수 없으며, 다른 검사방법과 임상소견에 근거한 수의사의 판단에 의해서 최종진단을 내려야 합니다.
- ④ 본 제품은 일회용 의료기기이므로 재사용을 금지합니다.

#### 2. 제품 취급 및 보관상의 주의사항

- ① 검사에 적용 가능한 검체는 돼지에서 유래된 혈액, 혈청, 조직시료 등을 사용합니다.
- ② 검체를 채취 및 수거 시에는 반드시 개인 보호장비(보호복, 마스크, 장갑, 보안경, 모자 및 신발 등)를 착용 후 수행하고 채취한 검체는 4°C를 유지하여 빠른 시간 내 (24시간 이내) 검사소로 송부합니다.
- ③ 검사 후 남은 의심검체, 오염된 실험재료 및 기구 등을 폐기하고자 하는 경우 고압증기멸균 처리등으로 불활성화하여 폐기하며, 작업테이블 등을 70% 에탄올을 이용하여 10~30분간 소독처리하여 실험실 내외 질병이 확산되지 않도록 합니다.
- ④ 검사에 사용하기 위한 RNA 추출물은 -20°C에서 보관하고, 냉동 보관된 모든 검사 시약은 실험 전에 아이스에서 녹이도록 합니다.
- ⑤ 시약의 반복적인 냉동과 해동은 검사의 민감도에 영향을 미칠 수 있습니다.

⑥ 검사를 자주하지 않을 경우, 시약의 일정량을 분주하여 냉동 보관하여 사용합니다.

⑦ 본 제품의 시약이 핵산 추출물, PCR 산물, 양성 대조군 (Positive control, PC)에 의해 오염되지 않도록 주의합니다.

#### 3. 적용상의 주의사항

- ① 양성결과가 나올 수 있는 물질(검체, 양성대조군, 그리고 증폭산물 등)은 다른 모두 검사 시약들과 분리 보관합니다. 그리고 반응혼합물에 검체 및 양성대조군은 분리된 장소에서 혼합하며, 시약들의 오염을 방지하기 위해서 필터팁의 사용을 추천합니다.
- ② Real-time PCR에 사용하는 튜브는 Taqman probe 전용으로 사용해야 합니다. (Bio-Rad사 CFX96 기준 Taqman probe 전용 PCR tube-Cat No. TLS0851 / MLL9651)
- ③ 동일 제품에 대해 다른 Lot 혹은 동일 Lot의 시약 간 혼합을 금합니다.
- ④ 유효기간이 지난 제품은 사용하지 않습니다.
- ⑤ 본 제품 시약들의 오염을 방지하기 위해서 일회용 필터 팁의 사용을 권장합니다.
- ⑥ 타겟 핵산이 고농도로 존재하거나, 저해물질이 존재할 경우 Internal control(IC)가 증폭되지 않을 수 있습니다. 멸균수로 핵산을 희석하여 재검사를 수행합니다.
- ⑦ Roche 사 LightCycler®96 의 경우, 기기 상의 오류가 발생할 수 있기 때문에 본 제품을 이용한 진단 시 사용을 권장하지 않습니다.