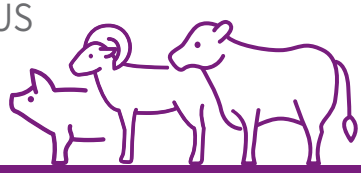
바이오노트

구제역 O형 항체 엘리자

FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS
TYPE O ANTIBODY ELISA



BIONOTE

목차

1. 개요 4

2. 사용 목적 4

3. 검사 원리 4

4. 제품 구성 5

5. 키트 내 제공되지 않지만 시험에 필요한 물품 6

6. 사용 시 주의사항 6

7. 사용 방법 7

- 검체 준비 및 보관 7

- 시액의 조제 8

- 검사 방법 8

8. 결과 해석 10

- 정도 관리 기준 10
- 결과의 계산 10
- 결과의 판정 10

9. 제한 사항 11

10. 키트의 저장 방법 및 사용 기한 11

11. 포장 단위 11

1. 개요

구제역은 소, 돼지, 염소 등 발굽이 둘로 갈라진 동물(우제류)이 감염되어 국가 경제에 큰 손실을 끼치는 질병입니다. 이 질병은 세계동물보건기구(OIE)에 의해 중요 가축 전염병으로 지정되어 있으며, 국내에서도 제 1종 법정전염병으로 분류되어 있습니다.

2. 사용 목적

본 제품은 소, 돼지, 염소의 검체에서 구제역바이러스 O형의 구조단백질(FMDV Type O SP)에 대한 특이 항체를 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)으로 정성 분석할 수 있는 체외진단 검사시약입니다.

3. 검사 원리

바이오노트 구제역 O형 항체 엘리자는 소, 돼지, 염소의 혈청 혹은 혈장 검체 내의 FMDV Type O SP에 대한 항체를 검출하는 키트입니다. SP항체를 검출하기 위해, 먼저 유전자 재조합 FMDV Type O SP 정제 항원을 코팅한 항원 흡착 플레이트에 검체와 접합체액을 동시에 첨가하여 반응시킵니다. 검체 내에 SP항체가 없으면 접합체(효소가 접합된 FMDV Type O SP항체)가 플레이트 표면의 항원과 결합하고, SP항체가 있으면 SP항체가 접합체와 경쟁적으로 플레이트 표면의 항원에 결합합니다. 세척 과정을 통해 결합되지 않은 항체들을 제거한 후 TMB 기질액을 첨가하여 반응시키면 접합체의 결합 정도에 따라 발색이 나타나게 됩니다. 그 후 흡광도를 측정함으로써 SP항체의 유무를 확인할 수 있습니다.

4. 제품 구성

명칭	세부 구성	외관상 특징
항원 흡착 플레이트 (1)	1. 8 wells*12 스트립/장 2. 96 wells	무색 평면 바닥 형태의 폴리스틸렌 플레이트
음성 대조액 (2)	단일	파란 캡 연한 파랑 내지 파랑색의 액상제제
양성 대조액 (3)	단일	빨간 캡 연한 빨강 내지 빨강색의 액상제제
검증 대조액1 (4)	단일	흰색 캡 엷은 담황색의 액상제제
검증 대조액2 (5)	단일	검은색 캡 엷은 담황색의 액상제제
10배 농축 세척액 (6)	단일	무색 내지 엷은 담황색의 액상 제제
101배 농축 접합체액 (7)	단일	갈색 유리바이알에 담긴 담황색 내지 엷은 담황색의 액상 제제
접합체 희석액 (8)	단일	초록색 내지 진한 초록색의 액상 제제
TMB 기질액 (9)	단일	갈색 불투명 플라스틱 병에 담겨진 무색 내지 미황색의 액상 제제
반응 정지액 (10)	단일	무색의 액상 제제
플레이트 밀봉테이프 (11)	단일	접착 씰이 적용된 무색 투명한 비닐
사용 설명서 (12)		

5. 키트 내 제공되지 않지만 시험에 필요한 물품

- ELISA 리더기
- 37 °C 항온기(인큐베이터)
- 마이크로파이펫(10~1000 μℓ) 및 팁
- 증류수 또는 탈이온수
- 흡습지 또는 흡습타올
- 타이머
- 일회용 튜브 혹은 컨테이너, 폐기물 용기
- 세척기(필수사항 아님)
- 개인용 보호장구(라텍스 장갑 등)

6. 사용 시 주의사항

** 재현성 있는 결과를 얻기 위해서는 다음 사항을 준수해야합니다.

1) 용혈이 심하거나 미생물에 오염된 검체의 경우는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 주의합니다.
2) 심하게 용혈된 검체는 사용할 수 없습니다. 혈구나 혈액 응고 성분 등의 고형물이 있는 검체는 비특이 반응을 유발하므로 가능한 사용하지 않습니다.
3) 감염 가능한 물질을 취급할 때는 1 회용 비닐장갑 등을 착용하고, 취급 후에는 손을 세정제로 깨끗이 닦습니다.
4) 검체와 모든 시약은 실험 시작 약 15~30분 전에 실온(18~25 °C)에 꺼내어 두어 실온에 적응된 것을 확인한 후 사용합니다.
5) 실험 후 남은 플레이트는 사용 즉시 실리카겔과 함께 파우치에 밀봉하여 냉장 보관(2~8 °C)하고, 가능한 빠른 시일 내 사용하여야 합니다. 용액을 분주한 microwell을 재사용하거나, 시약을 원래 병에 다시 붓지 않도록 합니다.
6) 서로 다른 로트의 구성물과 혼합하여 사용하지 않도록 주의합니다.
7) 반응 정지액 (10)은 화상 및 자극을 발생시킬 수 있으므로 피부와 눈에 닿지 않도록 주의합니다. 만약, 닿았을 경우 즉시 차가운 흐르는 물에 씻어 냅니다.
8) TMB 기질액 (9)을 직접 빛이나 산화제에 노출시키지 마십시오. 모든 TMB 기질액 (9) 용액은 깨끗한 일회용 용기를 사용하여 취급합니다.
9) 유효 기간이 만료된 시약은 사용하지 마세요.
10) 용기와 잔류물을 재사용 하지 마십시오. 제품 내 시약이 다른 시약이나 검체에 오염되지 않도록 주의합니다.
11) 이 프로토콜을 엄격하게 준수하면 최적의 결과를 얻을 수 있습니다. 정밀성과 정확성을 유지하기 위해서는 이 절차 전반에 걸쳐 신중한 피펫팅, 시간(타이밍) 및 세척을 해야합니다.
12) 실험에 사용한 고형폐기물은 121 °C에서 15분 이상 고압 증기 멸균하여 폐기합니다.
13) 실험에 사용되었던 액체 폐기물은 차아염소산나트륨용액을 1 %이상 되도록 첨가하여 12시간이상 담가 감염성을 완전히 제거한 후에 폐기합니다.
14) 본 제품은 백신 접종 후 채혈 시기에 따라 판정 결과가 다를 수 있습니다. 같은 시기에 채혈했더라도 접종한 백신주에 따라 결과값이 다를 수 있으며, 이는 제품 이상이 아닙니다.

15) 본 제품은 가축 방역기관 및 병성감정기관에 한해서만 사용 가능하며 일반 축산농가에서는 구매, 사용이 불가합니다.
16) 본 제제는 여러 가지 요인으로 위양성, 위음성 결과의 가능성을 완전히 배제할 수 없으므로 본 제품의 결과만을 기초로 최종 진단할 수 없습니다.
17) 본 시약은 반자동 분석 장비를 사용하는 경우에 적합하도록 제조 되어진 것이므로 전자동 분석 장비를 사용할 경우 시험 결과에 차이가 있을 수 있습니다. 전자동 분석 장비를 사용할 경우에는 시험 조건을 재설정하여 사용하여야 합니다.

7. 사용 방법

[검체 준비 및 보관]

본 키트의 검체로는 소, 돼지, 염소의 혈청 및 혈장을 사용합니다.

· **혈청**
1) 항응고제가 들어있지 않은 일반 튜브에 전혈을 수집한 다음, 혈액 응고를 위해 30분간 정치시킵니다. 그 후 3,000 rpm에서 최소 20분 동안 혈액을 원심분리하여 상청액의 혈청을 취합니다.
2) 혈청을 2~8 ℃에서 보관할 경우, 14일(2주)까지 사용 가능하며, 그 이상 보관이 필요할 경우 -20 ℃ 이하에서 냉동 보관합니다.
3) 보관했던 검체를 사용할 경우, 검체를 실온(18~25 ℃)에 최소한 30분 이상 꺼내어 두어 실온에 적응되어 냉기가 없는 것을 확인한 후 사용합니다.

· **혈장**
1) 헤파린, EDTA 또는 sodium citrate가 포함된 항응고제 튜브에 전혈을 수집합니다. 그 다음 3,000 rpm에서 최소 20분 동안 원심분리하여 상청액의 혈장을 취합니다.
2) 혈장을 2~8 ℃에서 보관할 경우, 14일(2주)까지 사용 가능하며, 그 이상 보관이 필요할 경우 -20 ℃ 이하에서 냉동 보관합니다.
3) 보관했던 검체를 사용할 경우, 검체를 실온(18~25 ℃)에 최소한 30분 이상 꺼내어 두어 실온에 적응되어 냉기가 없는 것을 확인한 후 사용합니다.

주의

* 용혈이 심하거나 오염된 검체를 사용할 경우 부정확한 결과를 나타낼 수 있습니다.
* 검체 중에 Sodium azide가 첨가된 경우 위양성의 부정확한 결과를 초래할 수 있습니다. (음성 혈청임에도 불구하고 HRP의 활성을 저해하여 흡광도가 낮아질 수 있음)

[시액의 조제]

· **접합체액의 조제**
- 101배 농축 접합체액 (7)을 접합체 희석액 (8)으로 101배 희석합니다. (표 1. 참고)
  예시) 접합체 희석액 (8) 11 ㎖에 101배 농축 접합체액 (7)을 110 ㎕을 첨가하여 접합체액을 조제합니다.

표 1.
접합체액의 조제 시 101배 농축 접합체액 (7)과 접합체 희석액 (8)의 혼합 비율

플레이트 검사 수	101배 농축 접합체액 (7)	접합체 희석액 (8)
1장	110 ㎕	11 ㎖
2장	220 ㎕	22 ㎖
3장	330 ㎕	33 ㎖
4장	440 ㎕	44 ㎖
5장	550 ㎕	55 ㎖

· **세척액의 조제**
- 10배 농축 세척액 (6)을 증류수나 탈이온수로 10배 희석합니다.
  예시) 10배 농축 세척액 (6) 100 ㎖와 증류수 900 ㎖를 혼합하여 세척액을 조제합니다.

참고

* 10배 농축 세척액 (6)은 냉장 보관 시 결정이 생성될 수 있습니다. 이는 제품의 이상이 아니며, 37 °C에서 약 30분 간 정치 후 결정이 용해되면 사용하도록 합니다.

· **조제한 시액의 보관조건 및 보존 기간**

조제한 시약	보관 온도	사용 기한
조제한 접합체액	2~8 °C	4 시간
조제한 세척액	2~30 °C	1 주일

[검사 방법]

모든 시약은 실험 시작하기 최소 30분 전에 실온(18~25 °C)에 꺼내어 두어 실온에 적응된 것을 확인한 후 사용합니다. 시험 종료까지 제품에 포함된 각종 용액은 실온에 두도록 합니다.

참고

* 검체 및 모든 시약은 사용 전에 충분히 혼합하여 사용합니다.
* 키트의 구성물을 다른 제품 또는 다른 로트의 구성물과 혼용하여 사용하지 않습니다.

· **플레이트 준비**

1) 밀봉된 플레이트 파우치를 개봉하여 항원 흡착 플레이트 (1)를 꺼냅니다. 필요한 만큼의 스트립을 꺼낸 후, 사용하지 않는 스트립은 동봉된 실리카겔과 함께 다시 파우치에 넣어 밀봉 보관합니다.

· **검체 및 접합체 반응**

1) 항원 흡착 플레이트 (1)의 A1, B1, C1 well에 음성 대조액 (2)을 25 µℓ씩 분주합니다.
2) D1과 E1 well에 양성 대조액 (3)을 25 µℓ씩 분주합니다.
3) F1 well에 검증 대조액1 (4)을 25 µℓ 분주합니다.
4) G1 well에 검증 대조액2 (5)를 25 µℓ 분주합니다.
5) 남은 well에 검사하고자 하는 검체를 25 µℓ씩 분주합니다.
6) **'시액의 조제'** 항에 따라 조제한 접합체액을 대조액과 검체가 들어있는 well에 100 µℓ씩 첨가합니다. 그 후 시료들이 잘 혼합될 수 있도록 조심스럽게 흔들어 주고 키트에 동봉된 밀봉테이프로 항원 흡착 플레이트 (1) 윗면을 밀봉합니다.
7) 밀봉된 항원 흡착 플레이트 (1)를 37 °C에서 90분 동안 반응시킵니다.

· **세척**

1) 반응이 끝난 후, well 안의 검체를 제거하고, **'시액의 조제'**항에 따라 미리 조제한 세척액으로 6회 세척합니다. (세척 방법 : 조제한 세척액을 매뉴얼 또는 ELISA 세척기를 이용하여 350 µℓ/well 분주하고 제거하는 과정을 6회 반복)
2) 마지막 세척액을 제거한 후, 흡습지 또는 흡습타올에 항원 흡착 플레이트 (1)를 강하게 털어서 well 안의 세척액 잔여물을 제거합니다.

* well에 세척액 잔여물이 남아있는 상태로 TMB 기질액 (9)을 주입할 경우 부정확한 결과를 초래할 수 있습니다.
* 검사에 사용했던 플레이트 밀봉테이프 (11)는 재사용하지 않습니다.

· **기질 반응**

1) 각 well에 TMB 기질액 (9)을 100 µℓ씩 분주합니다.
2) 빛을 차단한 후, 실온(18~25 °C)에서 15분 간 반응시킵니다.

· **반응 정지 및 흡광도 측정**

1) 기질 반응 이후, well에 반응 정지액 (10)을 100 µℓ씩 첨가합니다.
2) 공기를 맹검(air blank)으로하여 대조액 및 검체의 흡광도를 측정합니다. 흡광도의 측정은 측정파장 450 nm, 참조파장 620 nm로 측정합니다.
   * 반응 정지액 (10) 주입 후 가능한 즉시 흡광도를 측정합니다. (최대 30분 이내 흡광도 측정)

8. 결과 해석

[정도 관리 기준]

1) 음성 대조액 (2)은 3 well을 이용하여 시험하고, 평균 흡광도 값은 1.0이상 그리고 2.3미만이어야 합니다. 만약 3개 중 1개의 값이 위의 범위를 벗어났을 경우, 벗어난 1개 값은 제외하고, 나머지 2개의 평균값을 산출합니다.
2) 양성 대조액 (3)은 2 well을 이용하여 시험하고, 평균 흡광도 값은 0.2이하 그리고 PI값은 80 이상이어야 합니다.
3) 검증 대조액1 (4)의 PI 값은 60 초과로 양성으로 판정되어야 합니다.
4) 검증 대조액2 (5)의 PI 값은 40 미만으로 음성으로 판정되어야 합니다.
5) PI value가 마이너스"-"로 계산될 경우, 해당 값은 0으로 간주하여 처리하도록 합니다.
6) 만약, 상기의 범위를 벗어난 경우에는 검사 과정이나 시약에 문제가 있는 것이므로, 원인 파악 후 재검사하여야 합니다.

[결과의 계산]

1) 음성 대조액 (2)의 평균 흡광도 값을 계산합니다. ($=OC_{NCx}$)
2) 다음 계산식을 이용하여 PI (Percent Inhibition)값을 계산합니다.

$$\text{PI value} = \left(1 - \left(\frac{OD_{sample}}{OD_{NCx}}\right)\right) \times 100$$

[결과의 판정]

검체의 PI 값	결과
PI 값 $<$ 50	음성
PI 값 $\geq$ 50	양성

예시)
- 양성 대조액 (3)의 평균 흡광도: 0.028 / 음성 대조액 (2)의 평균 흡광도 : 2.013,
- 검증 대조액1 (4)의 흡광도 : 0.702 / 검증 대조액2 (5)의 흡광도 : 1.305,
- 검체의 흡광도 : 0.562 일 때,
- 양성 대조액 (3)의 PI 값= (1-(0.028/2.013)) X 100 = 98.6 (적합)
- 검증 대조액1 (4)의 PI 값 =(1-(0.702/2.013)) X 100 = 65.1 (적합)
- 검증 대조액2 (5)의 PI 값 =(1-(1.305/2.013)) X 100 = 35.2 (적합)

검체의 PI 값 = (1-(0.562/2.013)) X 100 = 72.1
→ 검체는 **양성**으로 판정

** 검체에 대한 본 제품의 판정 결과 및 다른 검사결과와 임상소견을 종합적으로 판단하여, 전문 수의사가 최종 진단을 내려야 합니다.

9. 제한 사항

1) 소, 돼지, 염소의 체외 진단용으로만 사용합니다.
2) 부적절한 검체의 사용 시 위음성이나 위양성 결과를 초래할 수 있습니다.
3) 최종적인 진단은 전문 수의사가 검체에 대한 본 제품의 판정 결과를 다른 검사결과 및 임상소견을 종합적으로 고려하여 이뤄져야 합니다.

10. 키트의 저장 방법 및 사용 기한

1) 모든 구성품은 냉장 보관(2~8 ℃) 해야 합니다.
2) 테스트 키트는 개봉되지 않은 상태로 패키지 및 각종 시약의 라벨에 인쇄된 유효 기간까지 안정적입니다.

11. 포장 단위

명칭	96 tests/kit	480 tests/kit	960 tests/kit
항원 흡착 플레이트 (1)	1 장	5 장	10 장
음성 대조액 (2)	1병 (0.3 ㎖/병)	1병 (1.0 ㎖/병)	1병 (2.0 ㎖/병)
양성 대조액 (3)	1병 (0.3 ㎖/병)	1병 (1.0 ㎖/병)	1병 (2.0 ㎖/병)
검증 대조액1 (4)	1병 (0.3 ㎖/병)	1병 (1.0 ㎖/병)	1병 (2.0 ㎖/병)
검증 대조액2 (5)	1병 (0.3 ㎖/병)	1병 (1.0 ㎖/병)	1병 (2.0 ㎖/병)
10배 농축 세척액 (6)	1병 (50 ㎖/병)	1병 (250 ㎖/병)	2병 (250 ㎖/병)
101배 농축 접합체액 (7)	1병 (0.3 ㎖/병)	1병 (1.2 ㎖/병)	1병 (2.5 ㎖/병)
접합체 희석액 (8)	1병 (15 ㎖/병)	1병 (80 ㎖/병)	1병 (200 ㎖/병)
TMB 기질액 (9)	1병 (12 ㎖/병)	1병 (60 ㎖/병)	1병 (120 ㎖/병)
반응 정지액 (10)	1병 (15 ㎖/병)	1병 (80 ㎖/병)	1병 (150 ㎖/병)
플레이트 밀봉테이프 (11)	2장	10장	20장
사용 설명서 (12)	1장	1장	1장

문서번호: I4803-5K
발행일 : 2023.01.09

FMD Type O Ab ELISA Quick guide

ELISA 검사

1 플레이트에 검체 분주	검체와 음/양성 및 검증대조액1, 2 25 µℓ 분주
2 접합체 반응	조제한 접합체액 100 µℓ 분주
37 ℃에서 90분 반응, 6회 세척	
3 기질 반응	세척된 플레이트에 TMB 기질액 100 µℓ 분주
빛을 차단하고, 실온(18~25 ℃), 15분	
4 반응 정지	반응 정지액 100 µℓ 분주
5 흡광도 판독	측정파장 450 nm, 참조파장 620 nm *반응 정지 후 즉시 수행*

BIONOTE (주)바이오노트 18449 경기도 화성시 삼성1로 4길 22
TEL: 031-211-0516 I FAX : 031-8003-0618 I www.bionote.co.kr