


바이오토티 A형 인플루엔자 항체 엘리자

동물용 의료기기

[제품명]

인수공통전염병면역검사시약[3]

[형명]

BIONOTE AIV Ab ELISA

[검사 원리]

본 제품은 닭, 오리, 칠면조, 개 및 돼지의 혈청, 혈장, 닭과 오리 종란의 난황에서의 A형 인플루엔자 바이러스에 대한 항체를 검출하는 엘리자 키트입니다.

바이오토티 A형 인플루엔자 항체 엘리자는 경쟁적 효소 면역 측정법으로 여러 축종에서 혈청학적 검사를 할 수 있는 장점이 있습니다. 조류인플루엔자 바이러스 A type 항원이 흡착된 플레이트에 가검 혈청을 넣고 효소가 표지된 또 다른 검체(접합체)를 첨가한 후 30 분간 37°C에서 가검혈청과 접합체가 서로 경쟁적으로 마이크로플레이트에 결합되어 있는 항원과 반응하게 하였습니다. 그 후 기질액을 첨가하여 실온에서 10 분 동안 반응시킨 후 측정파장 450nm, 참조파장 620nm 에서 발색 정도를 측정하여 조류인플루엔자 바이러스에 대한 항체 음, 양성을 구별할 수 있습니다. 이같은 경쟁적 효소면역 측정법은 현재 국내외적으로 수행되고 있는 AGP(민감도가 낮음)나 간접 효소면역 측정법의 단점(축종마다 접합체액이 바뀌어야 함.)들을 보완 해 줄 수 있는 시험법입니다.

[제품의 구성표]

번호	명칭	세부구성	외관상 특징
1	인플루엔자 항원 흡착 플레이트	1. 8wells * 12 스트립/장 2. 96wells	무색 평면 바닥 형태의 폴리스틸렌 플레이트
2	음성 대조액	단일	연한 파랑 내지 파랑색의 액상제제
3	양성 대조액	단일	연한 빨강 내지 빨강색의 액상제제
4	농축세척액 (10 배 농축액)	단일	무색 내지 옅은 담황색의 액상 제제
5	접합체액	단일	초록 내지 진한 초록색의 액상 제제
6	기질액	단일	갈색 불투명 플라스틱 병에 담겨진 무색 내지 미황색의 액상 제제
7	반응 정지액	단일	무색의 액상 제제

[원재료 또는 성분 및 분량]

번호	명칭	배합목적	원재료(명) 또는 성분(명)	분량
1	인플루엔자 항원 흡착 플레이트	주성분	뉴클레오프로테인에 대한 단클론항체와 정제 인플루엔자 항원	1 μ g/ml
2	음성대조액	주성분	정상 닭 혈청	0.3ml
		보존제	프로클린	0.05%
3	양성대조액	주성분	H9형 인플루엔자 닭 양성 혈청	0.3ml
		보존제	프로클린	0.05%
4	농축 세척액 (10 배 농축액)	주성분	폴리소르베이트 20	2%
		희석액	농축 인산염 생리식염 완충액	적량
		보존제	프로클린	0.05%
5	접합체액	주성분 1	단일클론 항 인플루엔자-과산화효소 접합액	0.02%
		주성분 2	인산염생리식염 완충액	8ml
		보존제	프로클린	0.05%
6	TMB 기질액	주성분 1	테트라메칠벤지딘	적량
		주성분 2	과산화수소수	적량
7	반응 정지액	주성분	1N 황산	20 μ l/ml

[사용 목적]

엘리자 방법에 의한 닭, 오리, 칠면조, 개 및 돼지의 혈청, 혈장, 닭과 오리 종란의 난황에서의 A 형 인플루엔자 바이러스에 대한 항체 검출.

[사용 방법]

1. 검체 준비 및 저장방법

- 1) 각 동물의 혈청 혹은 혈장을 검체로 사용할 수 있으나 심하게 용혈 된 검체는 쓸 수 없습니다. 혈구나 혈액 응고 성분 등의 고형물이 있는 검체는 비특이 반응을 유발하므로 가능한 사용하지 않습니다.
- 2) 혈청 및 혈장을 2~8°C에서 보관 할 경우 15 일까지 본 시약을 이용한 검사에 사용 가능하며, 3 일 이상 보관 시에는 -20°C에 보관합니다.
- 3) 용혈이 심하거나 미생물에 오염된 검체의 경우는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 주의합니다.
- 4) 검체 중에 Sodium azide 가 첨가된 경우 결과에 영향(음성 혈청임에도 불구하고 흡광도가 낮아 위양성이 나올 수 있음)을 미칠 수 있으므로 주의합니다.
- 5) 난황 검체의 경우 난황 2 ml과 PBS(pH7.2) 2 ml을 Vortex 로 강하게 혼합한 후 3000rpm 에서 30 분 동안 원심분리 한 후 상청을 취하여 검체로 사용합니다.

2. 검사 전 준비사항

- 1) 시약을 약 30 분 전에 실온(18~25°C)에 꺼내어 둡니다. 시험 종료까지 제품에 포함된 각종 용액은 실온에 두도록 합니다.

2) 시험 후 남은 항원흡착플레이트는 자체 은박포에 실리카겔 포와 함께 잘 밀봉하여 2~8°C에서 냉장 보관합니다.

3) 검체는 사용 전에 충분히 혼합하여 사용합니다.

4) 시액의 조제

(1) 세척액의 준비

농축세척액(10 배 농축액)을 정제수(탈이온수나 증류수)로 10 배 희석합니다. (예, 증류수 450 ml 농축 세척액 50 ml을 첨가하여 세척액을 조제합니다.) 농축 세척액은 냉장 보관 시 결정이 생성, 이는 제품의 이상이 아니며, 37°C에서 약 30 분 정치 후 결정이 용해되면 사용하도록 합니다.

(2) 조제한 시액의 보관조건 및 보존기간은 다음과 같습니다.

조제시액	보관조건	보존기간
세척액	실온, 2~30°C	1 주일

5) 키트의 구성물을 다른 제품과 혼용하여 사용하지 않습니다.

3. 검사과정

1) 검체의 분주

(1) 플레이트의 각 well 에 음성대조액(혈청), 양성대조액(혈청), 검사하고자 하는 시료 원액을 50 μ l씩을 각각 분주합니다.

(2) 접합체액을 음, 양성대조액과 검체가 들어있는 well 에 50 μ l씩 첨가(첨가 시 접합체액이 well 의 벽면에 묻지 않도록 합니다.)한 후 약 10 초 이상 시료들이 well 바깥으로 튀지 않게 조심스럽게 흔들여 준 후 플레이트를 첨부된 밀봉테이프로 밀봉합니다.

※ (1)과 (2)의 순서가 바뀌지 않도록 하며, 100 건 이상의 시료를 검사할 경우 희석용 플레이트에서 검체 55 μ l와 접합체액 55 μ l를 혼합 한 후 100 μ l를 취하여 항원 코팅 플레이트에 분주하여 시험하는 것을 권장합니다.

2) 밀봉한 플레이트를 37°C에서 30 분 동안 반응시킵니다.

3) 세척액을 '시액의 조제'항에 따라 조제합니다.

4) 반응 후 각 well 의 내용물을 흡입하고 세척액으로 6 회 세척합니다. well 내의 내용물을 흡입장치로 제거한 후, 세척액을 well 에 완전히 채우고(well 당 약 350 μ l씩)다시 세척액을 흡입하는 방법으로 6 회 반복한 다음, 잔여 용액을 제거합니다.(잔여 용액 제거 후 바로 TMB 기질액을 첨가하도록 합니다. 5 분 이상 정치할 경우 흡광도 값이 낮아집니다.)

5) TMB 기질액을 모든 well 에 100 μ l씩 분주하고 빛을 차단한 후 10 분간 실온에서 반응시킵니다.

6) 5)의 반응이 끝난 플레이트에 반응정지액을 well 당 100 μ l씩 넣고 잘 혼합하여 청색이 노란색으로 완전히 변하도록 합니다.

7) 공기를 맹검으로 하여(Air blank) 음성대조액, 양성대조액 그리고 각 검체의 흡광도를 측정합니다. 이때 흡광도의 측정 파장은 450nm 로 하고, 이중 파장흡광도 측정기(dual wavelength reader)를 사용할 경우 참조파장은 620nm 로 하며 반응 정지액을 넣고 30 분 이내에 흡광도 값을 측정합니다.

4. 결과 판정

1) 판정 기준값 (Percent Inhibition : PI) 계산

(1) 음성대조액 평균값 계산

상기 검사방법에 따라 음성대조액의 흡광도를 얻은 다음 그 세 값의 평균값을 산출합니다.

(2) 양성대조액 평균값 계산

상기 검사방법에 따라 양성대조액의 흡광도를 얻은 다음 그 두 값의 평균값을 산출합니다.

(3) PI 값 계산

$$PI\ value = [1 - (\text{샘플 흡광도} / \text{음성대조액 평균 흡광도})] \times 100$$

※ PI value 가 '-(minus)'로 나올 경우 '0'으로 간주합니다.

예) 샘플 흡광도 = 1.950, 음성대조액의 평균 흡광도 = 2.040

$$PI\ value = [1 - (1.950 / 2.040)] \times 100 = 4.4$$

결과 판정 : 음성

2) 결과의 판정

(1) 음성 : 판정 기준값 미만의 PI 값을 나타내는 검체는 음성으로 판정합니다.

(2) 양성 : 판정 기준값 이상의 PI 값을 나타내는 검체는 양성으로 판정합니다.

(3) 1 차 검사에서 양성 판정 검체는 2 wells 이상 재검사 하고 재검 결과에서 1well 이상 양성으로 판정되면 최종양성으로 판정합니다.

(4) 판정 기준값(PI Value)

동물	닭	오리	칠면조	오리난황	개	돼지
양성 PI 값	50 이상	50 이상	85 이상	50 이상	50 이상	50 이상
음성 PI 값	50 미만	50 미만	85 미만	50 미만	50 미만	50 미만

※백신접종 12 일 후부터 calculation 민감도 97.9%(n=530), 특이도 100%(n=60)

5. 정도관리

- 음성대조액은 3 wells 을 이용하여 시험하며, 평균 흡광도 값은 1.0 이상이어야 하며, 만약 1 개의 값 이 범위를 벗어났을 경우 나머지 2 개 값의 평균값으로 산출합니다. 만약 2 개 이상의 값이 위 범위를 벗어났을 경우 재 실험을 하여야 합니다.
- 양성대조액의 2 wells 을 이용하여 시험하며, 평균 흡광도 값은 -0.005 이상 0.5000 이하이어야 합니다. 평균 흡광도 값이 위 범위를 벗어난 경우에는 검사과정이나 시약에 문제가 있는 것이므로 그 원인을 확인한 후 재검사 하여야 합니다.

[사용 시 주의사항]

- 체외진단용 시약으로만 사용합니다.
- 서로 다른 로트의 구성물과 혼합하여 사용하지 않도록 주의합니다.
- 유효기간이 지난 제품은 사용하지 않습니다.
- 제품 내 시약이 다른 시약이나 검체에 오염되지 않도록 주의합니다.
- 검체는 인플루엔자의 감염 가능성이 있는 것이므로 취급에 주의합니다.
- 용혈이 심하거나 미생물이 심하게 오염된 검체는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 신선한 검체를 시료로 사용합니다.

7. 검체 내의 혈구 찌꺼기, 혈액 응고성분 등의 고형물은 세척할 때 완전히 제거되지 않으면 well 의 한 부분으로부터 시작되는 비특이 반응을 유발하므로 특히 주의해야 합니다.
8. 만약의 경우 well 의 한 부분에서부터 발색반응이 나오기 시작하면 음성으로 간주하지 않습니다.
9. 감염 가능물질을 취급할 때는 1 회용 비닐장갑 등을 착용하고 취급 후에는 손을 세정제로 깨끗이 닦습니다.
10. 기질액과 반응정지액은 피부에 닿지 않도록 주의합니다.
11. 실험에 사용한 고형 폐기물은 121°C에서 15 분 이상 고압 증기 멸균하여 폐기합니다.
12. 실험에 사용되었던 액체 폐기물은 차아염소산나트륨용액을 1% 이상 되도록 첨가하여 12 시간 이상 담가 감염성을 완전히 제거한 후에 폐기합니다.
13. 가축 방역기관 및 병성감정기관에 한해서만 사용 가능합니다.
14. 본 제제는 여러 가지 요인으로 위양성, 위음성 결과의 가능성을 완전히 배제할 수 없으므로 본 제품의 결과만으로 최종 진단할 수 없습니다.
15. 전문 의사가 사용하며, 다른 검사결과와 임상소견에 근거하여 최종 진단하여야 합니다.

[포장 단위]

포장단위 원료약품	96 tests/kit (8wells X 12 스트립/장)	480 tests/kit (8wells X 12 스트립/장)	960 tests/kit (8wells X 12 스트립/장)
항원흡착플레이트	1 장	5 장	10 장
음성대조액	1 병 (0.3 ml/병)	1 병 (1.5 ml/병)	1 병 (3.0 ml/병)
양성대조액	1 병 (0.3 ml/병)	1 병 (1.5 ml/병)	1 병 (3.0 ml/병)
농축 세척액 (10 배)	1 병 (50 ml/병)	1 병 (250 ml/병)	2 병 (250 ml/병)
접합체액	1 병 (8 ml/병)	1 병 (40 ml/병)	1 병 (80 ml/병)
TMB 기질액	1 병 (12 ml/병)	1 병 (60 ml/병)	1 병 (120 ml/병)
반응정지액	1 병 (15 ml/병)	1 병 (80 ml/병)	1 병 (150 ml/병)
플레이트 밀봉테이프	2 장	10 장	20 장

[저장 방법 및 사용기한]

구성시약	개봉여부	보관조건	유효기간	비고
항원흡착플레이트	미개봉	온도 2~8°C, 밀봉, 실리카겔	18 개월	완제품
	개봉	온도 2~8°C, 재밀봉, 실리카겔	7 일	가급적 빠른 시일 내 사용
각종 용액	미개봉	온도 2~8°C, 밀폐	18 개월	완제품
	개봉	온도 2~8°C, 재밀폐	18 개월	

※ 검사키트는 냉동보관하지 않도록 주의

발행일: 2017 년 09 월 05 일
문서번호.: I4502-11K



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