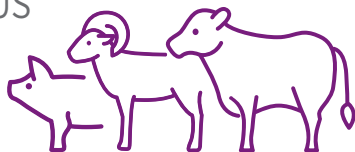


바이오노트 구제역 NSP 항체 엘리자

FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS
NON-STRUCTURAL PROTEIN
ANTIBODY ELISA



목차

• 제품명	3
• 개요	3
• 사용 목적	3
• 제품의 구성표	4
• 사용 방법	5
- 검체 준비 및 보관	5
- 검사 전 준비사항	5
- 시액의 조제	5
- 검사 방법	6
• 결과 해석	7
- 정도 관리 기준	7
- 결과의 계산	8
- 결과의 판정	8
• 사용 시 주의사항	9
• 포장 단위	10
• 저장 방법 및 사용기한	10
• Trouble Shooting	11

제품명

- 제품명 : 고위험성동물전염병면역검사시약 [3]
- 형명 : 바이오노트 구제역 NSP 항체 엘리자 (BIONOTE FMD NSP Ab ELISA)

개요

본 제품은 소, 돼지, 염소의 혈청이나 혈장에서 구제역 바이러스(FMDV)의 비구조단백질(NSP)에 대한 항체를 검출하는 엘리자 키트입니다.

키트 내에 있는 검사용 플레이트에는 유전자 재조합 과정을 통해 만든 FMDV NSP가 코팅되어 있고, 접합체액에는 FMDV NSP에 대한 마우스 유래 단클론 항체에 HRP라는 효소가 접합된 conjugate가 들어있습니다.

검체 중 NSP 항체가 없는 경우, conjugate가 플레이트의 NSP와 반응하여 결합하게 되고 conjugate의 HRP에 의해 발색이 나타나게 됩니다. 하지만 검체 중 NSP 항체가 있는 경우, 그 NSP 항체와 conjugate가 플레이트의 NSP와 경쟁적으로 결합하게 됩니다. 본 엘리자 키트는 이 경쟁적 반응 원리를 이용하여 FMDV NSP 항체에 대한 정성 검사를 가능하게 합니다.

사용 목적

엘리자 방법에 의한 소, 돼지 및 염소의 혈청 및 혈장에서의 구제역 바이러스 비구조단백질에 대한 항체를 검출합니다.

제품의 구성표



	명칭	세부구성	외관상 특징
1	항원 흡착 플레이트(1)	96wells	무색 평면 바닥 형태의 폴리스틸렌 플레이트
2	음성대조액(2)	단일	연한 파랑 내지 파랑색의 액상 제제
3	양성대조액(3)	단일	연한 빨강 내지 빨강색의 액상 제제
4	10배농축세척액(4)	단일	무색 내지 옅은 담황색의 액상 제제
5	101배농축접합체액(5)	단일	담황색 내지 미황색의 액상 제제
6	접합체희석액(6)	단일	초록 내지 진한초록색의 액상 제제
7	TMB기질액(7)	단일	갈색 불투명 플라스틱 병에 담겨진 무색 내지 미황색의 액상 제제
8	반응정지액(8)	단일	무색의 액상 제제

사용 방법

[검체 준비 및 보관]

- 1) 각 동물(소, 돼지, 염소)의 혈청 혹은 혈장을 검체로 사용할 수 있으나 심하게 용혈된 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 14일(2주)까지 본 시약을 이용한 검사에 사용 가능하며, 3일 이상 보관이 필요할 경우 -20°C에 냉동 보관합니다.
- 3) 용혈이 심하거나 미생물에 오염된 검체의 경우는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 주의합니다.
- 4) Sodium azide가 첨가된 검체의 경우, 음성 혈청임에도 불구하고 흡광도가 낮아 위양성이 나오는 등 결과에 영향을 미칠 수 있으므로 주의합니다.

[검사 전 준비사항]

- 1) 검체와 모든 시약은 실험시작 약 15~30분 전에 실온(18~25°C)에 꺼내어 두어 실온에 적응된 것을 확인한 후 사용합니다. 시험 종료까지 제품에 포함된 각종 용액은 실온에 두도록 합니다.
- 2) 시험 후 남은 항원흡착플레이트(1)는 자체 은박포에 실리카겔과 함께 잘 밀봉하여 냉장보관(2~8°C)합니다.



- * 검체는 사용 전에 충분히 혼합하여 사용합니다.
- * 키트의 구성물을 다른 제품 또는 다른 로트의 구성물과 혼용하여 사용하지 않습니다.

[시액의 조제]

- 1) 접합체액의 준비
 - 101배농축접합체액(5)을 접합체희석액(6)으로 101 배 희석합니다. (표 1. 참고 예시) 접합체희석액(6) 6 ml에 101배농축접합체액(5) 60 μ l을 첨가하여 접합체액을 조제합니다.

표 1. 101배농축접합체액(5)과 접합체희석액(6)의 혼합 비율

플레이트 검사 수	101배농축접합체액(5)	접합체희석액(6)
1장	60 μ l	6 ml
2장	120 μ l	12 ml
3장	180 μ l	18 ml
4장	240 μ l	24 ml
5장	300 μ l	30 ml

2) 세척액의 준비

- 10배농축세척액(4)을 정제수(탈이온수나 증류수)로 10 배 희석합니다.

예시) 증류수 450 ml에 10배농축세척액(4) 50 ml을 첨가하여 세척액을 조제합니다.



참고

* 10배농축세척액(4)은 냉장 보관 시 결정이 생성될 수 있습니다. 이는 제품의 이상이 아니며, 37°C에서 약 30분 간 정치 후 결정이 용해되면 사용하도록 합니다.

3) 조제한 시액의 보관조건 및 보존기간

조제된 시액	보관온도	사용기한
조제 후 접합체액	냉장(2~8°C)	8 시간
조제 후 세척액	실온(2~30°C)	1 주일

[검사 방법]

모든 시액은 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.



주의

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

• 플레이트 준비

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

• 검체의 분주

- 1) 항원흡착플레이트(1)의 각 well 에 음성대조액(2), 양성대조액(3), 검사하고자 하는 시료 원액 50 µl 씩 분주합니다.
- 2) **사용 방법** 의 [시액의 조제] 항에 따라, 조제한 접합체액을 음성대조액(2), 양성대조액(3)과 검체가 들어있는 well 에 50 µl 씩 첨가(이 때, 접합체액이 well 의 벽면에 묻지 않도록 주의)한 후 약 10 초 이상 조심스럽게 흔들어(이 때, 시료들이 well 바깥으로 튀지 않도록 주의)준 다음 밀봉테이프로 항원흡착플레이트(1) 뒷면을 밀봉합니다.
- 3) 밀봉된 항원흡착플레이트(1)를 37 °C에서 90분 동안 반응시킵니다.

· 세척과정

- 1) 반응이 끝난 후 플레이트 well 안에 있는 검체를 제거한 다음 **사용 방법**의 **[시액의 조제]** 항에 따라, 미리 조제한 세척액을 350 μl /well씩 분주합니다.
- 2) well 안의 세척액을 제거하고, 세척액을 분주하는 과정을 반복합니다. (총 6회 세척)
- 3) 마지막 세척액을 제거한 후, 흡습지 또는 흡습타월에 항원흡착플레이트(1)를 강하게 털어서 well 안의 세척액 잔여물을 제거합니다.

· 기질액의 반응

- 1) TMB기질액(7)을 각 well에 100 μl 씩 넣습니다.
- 2) 빛을 차단한 후 실온(18~25°C)에서 15분간 반응시킵니다.



- * well에 세척액 잔여물이 남아있는 상태로 TMB기질액(9)을 주입할 경우 부정확한 결과를 초래할 수 있습니다.
- * 검사에 사용했던 밀봉테이프는 재사용하지 않습니다.

· 반응정지 및 결과측정

- 1) 반응정지액(8)을 각 well에 100 μl 씩 분주합니다.
- 2) 공기를 맹검(Air blank)으로, 대조액 및 검체의 흡광도를 측정합니다. 흡광도의 측정은 측정파장 450 nm, 참조파장은 620 nm 로 측정합니다. 반응 정지액을 넣고, 가능한 즉시 흡광도를 측정합니다. (최대 30분 이내에 흡광도 값을 측정합니다.)

결과 해석

[정도 관리 기준]

- 1) 음성대조액(2)은 3 well 을 이용하여 시험하며 평균 흡광도 값은 1.0 이상이어야 합니다. 만약 1 개의 값이 범위를 벗어났을 경우, 나머지 2 개 값의 평균값으로 산출합니다. 만약 2 개 이상의 값이 위 범위를 벗어난 경우에는 검사 과정이나 시약에 문제가 있을 수 있으므로 그 원인을 확인한 후 재검사 하여야 합니다.
- 2) 양성대조액(3)의 2 well 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.

[결과의 계산]

· 판정 기준값 (Percent Inhibition : PI) 계산

1) 음성대조액(2) 평균값 계산

상기 검사 방법에 따라 음성대조액(2)의 흡광도를 얻은 다음 그 세 값의 평균값을 산출합니다.

음성대조액(2) 번호	흡광도(측정파장 450 nm, 참조파장 620 nm)
1	1.889
2	1.886
3	1.878
합계	5.653

* 음성대조액(2)의 평균 흡광도 : $NCx = 5.653/3 = 1.884$

2) 양성대조액(3) 평균값 계산

상기 검사 방법에 따라 양성대조액(3)의 흡광도를 얻은 다음 그 두 값의 평균값을 산출합니다.

양성대조액(3) 번호	흡광도(측정파장 450 nm, 참조파장 620 nm)
1	0.006
2	0.007
합계	0.013

* 양성대조액(3)의 평균 흡광도 : $PCx = 0.013/2 = 0.007$

3) PI 값 계산

PI value = $[1 - (\text{샘플 흡광도} / \text{음성대조액(2) 평균 흡광도})] \times 100$

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

예시) 샘플 흡광도 = 1.737, 음성대조액(2)의 평균 흡광도 = 1.884 일 경우,

PI value = $[1 - (1.737/1.884)] \times 100 = 7.83$

→ 검체는 **음성**으로 판정

[결과의 판정]

- 음성 : 판정 기준값 미만의 PI 값을 나타내는 검체는 음성으로 판정합니다.
- 양성 : 판정 기준값 이상의 PI 값을 나타내는 검체는 양성으로 판정합니다.
- 1 차 검사에서 양성 판정 검체는 2 well 이상 재검사하고 재검 결과에서 1 well 이상 양성으로 판정되면 최종 양성으로 판정합니다.
- 검체에 대한 본 제품의 판정 결과 및 다른 검사결과와 임상소견을 종합적으로 판단하여 전문 수의사가 최종 진단을 내려야 합니다.
- 판정 기준값 (Cut-off)

동물	소	돼지	염소
양성 PI 값	50 이상	50 이상	50 이상
음성 PI 값	50 미만	50 미만	50 미만

사용 시 주의사항

- 1) 검체와 모든 시약은 실험시작 약 15~30분 전에 실온(18~25°C)에 꺼내어 두어 실온에 적응된 것을 확인한 후 사용합니다.
- 2) 검체와 모든 시약은 사용 전 충분히 흔들어 사용합니다.
- 3) 체외진단용 시약으로만 사용합니다.
- 4) 제품의 사용 후 남은 구성물은 즉시 냉암소에 다시 보관합니다.
- 5) 서로 다른 로트의 구성물과 혼합하여 사용하지 않도록 주의합니다.
- 6) 유효기간이 지난 제품은 사용하지 않습니다.
- 7) 제품 내 시약이 다른 시약이나 검체에 오염되지 않도록 주의합니다.
- 8) 검체는 구제역 바이러스의 감염 가능성이 있는 것이므로 취급에 주의합니다.
- 9) 용혈이 심하거나 미생물이 심하게 오염된 검체는 부정확한 결과를 나타낼 수 있으므로 신선한 검체를 시료로 사용합니다.
- 10) 검체 내의 혈구 찌꺼기, 혈액 응고 성분 등의 고형물은 세척할 때 완전히 제거되지 않으면 well 의 한 부분으로부터 시작되는 비특이 반응을 유발하므로 특히 주의해야 합니다.
- 11) 만약의 경우, well 의 한 부분에서부터 발색 반응이 나오기 시작하면 음성으로 간주하지 않습니다.
- 12) 감염 가능 물질을 취급할 때는 1 회용 비닐 장갑 등을 착용하고 취급 후에는 손을 세정제로 깨끗이 닦습니다.
- 13) TMB기질액(7)과 반응정지액(8)은 피부에 닿지 않도록 주의합니다.
- 14) 실험에 사용한 고형폐기물은 121°C에서 15분 이상 고압 증기 멸균하여 폐기합니다.
- 15) 실험에 사용되었던 액체 폐기물은 차아염소산나트륨용액을 1% 이상 되도록 첨가하여 12시간 이상 담가 감염성을 완전히 제거한 후에 폐기합니다.
- 16) 본 제제는 여러 가지 요인으로 위양성, 위음성 결과의 가능성을 완전히 배제할 수 없으므로 본 제품의 결과만을 기초로 최종 진단할 수 없습니다.
- 17) 반드시 전문 수의사가 사용해야 하며, 본 제품의 결과 및 다른 검사결과와 임상소견에 근거하여 최종 진단을 내려야 합니다.
- 18) 본 시약은 반자동 분석 장비를 사용하는 경우에 적합하도록 제조 되어진 것이므로 전자동 분석 장비를 사용할 경우, 시험결과에 차이가 있을 수 있습니다. 전자동 분석 장비를 사용할 경우에는 시험 조건을 재설정하여 사용하여야 합니다.

포장 단위

원료약품/포장단위	96 Tests/kit	480 Tests/kit	960 Tests/kit
항원흡착플레이트(1)	1 장 (8 wells X 12 스트립/장)	5 장 (8 wells X 12 스트립/장)	10 장 (8 wells X 12 스트립/장)
음성대조액(2)	1병 (0.3 ml/병)	1병 (1.5 ml/병)	1병 (3.0 ml/병)
양성대조액(3)	1병 (0.3 ml/병)	1병 (1.5 ml/병)	1병 (3.0 ml/병)
10배농축세척액(4)	1병 (50 ml/병)	1병 (250 ml/병)	2병 (250 ml/병)
101배 농축접합체액(5)	1병 (0.3 ml/병)	1병 (1.2 ml/병)	1병 (3.0 ml/병)
접합체희석액(6)	1병 (8 ml/병)	1병 (40 ml/병)	1병 (80 ml/병)
TMB기질액(7)	1병 (12 ml/병)	1병 (60 ml/병)	1병 (120 ml/병)
반응정지액(8)	1병 (15 ml/병)	1병 (80 ml/병)	1병 (150 ml/병)
밀봉테이프	2장	10장	20장
인서트	1장	1장	1장

저장 방법 및 사용기한

구성시약	개봉여부	보관조건	유효기간	비고
항원흡착 플레이트(1)	미개봉	온도 : 2~8°C, 밀봉, 실리카겔	18개월	완제품
	개봉	온도 : 2~8°C, 재밀봉, 실리카겔	7일	가급적 빠른 시일 내 사용
각종 용액	미개봉	온도 : 2~8°C, 밀폐	18개월	완제품
	개봉	온도 : 2~8°C, 재밀폐	18개월	N/A

Trouble Shooting

만약 검사결과에 이상이 있을 경우에는 실험이 설명서 대로 바르게 실행 되었는지 아래와 같이 검토한 다음, 문제가 있을 경우 재검사 하도록 합니다.

1. 기질액 반응 후에 발색이 되지 않습니다.

- 접합체액이 오염되었을 경우
- 접합체액을 well 에 분주 하지 않았을 경우
- TMB기질액(7)이 아닌 반응정지액(8)이 첨가되었을 경우
- 세척액이 아닌 반응정지액(8)으로 세척한 경우

2. 음성대조액(2)의 흡광도가 1.0 미만으로 측정됩니다.

- 항원흡착플레이트(1) 세척 후 기질액 분주까지 10분 이상 지연될 경우
- TMB기질액(7)을 사용하기 전에 실온으로 warming up 되지 않았을 경우
- 항온기의 온도가 정확하지 않았을 경우

3. 양성대조액(3)의 흡광도가 0.5 이상 또는 음성대조액(2)의 흡광도가 3.0 을 초과하거나 리더기에 측정되지 않습니다.

- 세척이 불완전할 경우
(세척시 자동 세척기를 사용하는 것을 권장하며 반드시 6 회, 350 μ l/well 이 되도록 시행합니다.)
- 기질액이 접합체액에 오염되었을 경우
(항원흡착플레이트(1)에 첨가하기 전 기질액이 파란색을 나타내면 그 용기에 들어있는 기질액은 사용하지 마십시오.)

4. 발색이 제대로 되지 않거나, 고르지 못합니다.

- 숙련되지 못한 실험자가 피펫팅과 세척을 할 경우
- 시액의 제조 시 제대로 혼합하지 않을 경우
- 사용하는 실험 튜브나 실험 기구가 깨끗하지 않을 경우

문서번호: I4801-17K
발행일 : 2021. 04. 23

FMD NSP Ab ELISA Quick guide

ELISA 검사

1 플레이트에
검체 분주

검체(혈청 및 혈장 50 μ l,
음/양성 대조액 50 μ l)를 분주

2 접합체액

조제한 접합체액 50 μ l를 분주

37°C에서 90분 반응,
6회 세척

3 기질액 반응

세척된 플레이트에 기질액 100 μ l를 분주

빛 차단 후,
실온, 15분

4 반응 정지액

반응 정지액 100 μ l를 분주

5 흡광도 판독

측정파장 450 nm, 참조파장 620 nm
반응정지 후 즉시 수행