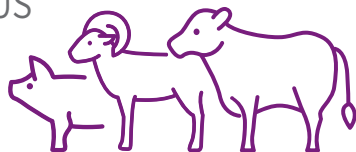


바이오토티 구제역 0형 항체 엘리자

FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS
TYPE O ANTIBODY ELISA



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 마이크로플레이트에 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 기질액을 첨가하여 반응시키면 접합체의 결합 정도에 따라 발색이 나타나게 됩니다. 그 후 흡광도를 측정함으로써 SP항체의 유무를 확인할 수 있습니다.

4. 제품 구성



명칭	배합 목적	원재료 또는 성분
항원흡착플레이트(1)	주성분	유전자 재조합 FMDV Type O SP 정제 항원
음성대조액(2)	주성분	정상 소 혈청
	보존제	프로클린 300
양성대조액(3)	주성분	FMDV Type O SP항체, 정상 소혈청
	보존제	프로클린 300
검증대조액1(4)	주성분	FMDV Type O SP항체, 정상 소혈청
	보존제	프로클린 300
검증대조액2(5)	주성분	FMDV Type O SP항체, 정상 소혈청
	보존제	프로클린 300
10배농축세척액(6)	주성분	폴리소르베이트 20
	희석액	농축 인산염 생리식염 완충액
	보존제	프로클린 300
	주성분	마우스 항 FMDV Type O SP 항체-과산화효소 접합액
101배 농축접합체액(7)	안정제	소혈청알부민
	보존제	프로클린
접합체희석액(8)	주성분	인산염생리식염 완충액
	보존제	프로클린
TMB기질액(9)	주성분	테트라메틸벤지딘
	보존제	과산화수소수
반응정지액(10)	주성분	1N 황산

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 준수해야 합니다.

- 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) 반응정지액(10)은 화상 및 자극을 발생시킬 수 있으므로 피부와 눈에 닿지 않도록 주의합니다. 만약, 닿았을 경우 즉시 차가운 흐르는 물에 씻어 냅니다.
- 8) TMB기질액(9)을 직접 빛이나 산화제에 노출시키지 마십시오. 모든 TMB기질액(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 해야 합니다.
- 12) 국가 및 지역 규정에 따라 용기 및 잔여물을 안전하게 폐기하세요.
- 13) 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 °C에서 보관할 경우, 14일(2주)까지 사용 가능하며, 그 이상 보관이 필요할 경우 -20 °C 이하에서 냉동 보관합니다.
- 3) 보관했던 검체를 사용할 경우, 검체를 실온(18~25 °C)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) 혈청을 2~8 °C에서 보관할 경우, 14일(2주)까지 사용 가능하며, 그 이상 보관이 필요할 경우 -20 °C 이하에서 냉동 보관합니다.
- 3) 보관했던 검체를 사용할 경우, 검체를 실온(18~25 °C)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

- 101배농축접합체액(7)을 접합체희석액(8)으로 101배 희석합니다. (표 1. 참고)
예시) 접합체희석액(8) 11 ml에 101배농축접합체액(7)을 110 µl을 첨가하여 접합체액을 조제합니다.

표 1.

접합체액의 조제 시 101배농축접합체액(7)과 접합체희석액(8)의 혼합 비율

플레이트 검사 수	101배농축접합체액(7)	접합체희석액(8)
1장	110 µl	11 ml
2장	220 µl	22 ml
3장	330 µl	33 ml
4장	440 µl	44 ml
5장	550 µl	55 ml

· 세척액의 조제

- 10배농축세척액(6)을 증류수나 탈이온수로 10배 희석합니다.
예시) 10배농축세척액(6) 100 ml와 증류수 900 ml를 혼합하여 세척액을 조제합니다.



참고

* 10배농축세척액(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 시액	보관 온도	사용 기한
조제한 접합체액	2~8 °C	8 시간
조제한 세척액	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.



참고

* 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.

• 검체 및 접합체 반응

- 1) 항원흡착플레이트(1)의 A1, B1, C1 well에 음성대조액(2)을 25 μl 씩 분주합니다.
- 2) D1과 E1 well에 양성대조액(3)을 25 μl 씩 분주합니다.
- 3) F1 well에 검증대조액1(4)을 25 μl 분주합니다.
- 4) G1 well에 검증대조액2(5)를 25 μl 분주합니다.
- 5) 남은 well에 검사하고자 하는 검체를 25 μl 씩 분주합니다.
- 6) '시액의 조제' 항에 따라 조제한 접합체액을 대조액과 검체가 들어있는 well에 100 μl 씩 첨가합니다. 그 후 시료들이 잘 혼합될 수 있도록 조심스럽게 흔들어 주고 키트에 동봉된 밀봉테이프로 항원흡착플레이트(1) 뒷면을 밀봉합니다.
- 7) 밀봉된 항원흡착플레이트(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 흡습타월에 항원흡착플레이트(1)를 강하게 털어서 well 안의 세척액 잔여물을 제거합니다.



주의

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

• 기질 반응

- 1) 각 well에 TMB기질액(9)을 100 μl 씩 분주합니다.
- 2) 빛을 차단한 후, 실온(18~25 °C)에서 15분 간 반응시킵니다.

• 반응 정지 및 흡광도 측정

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

8. 결과 해석

[정도 관리 기준]

- 1) 음성대조액(2)의 평균 흡광도는 1.0 이상, 2.3 미만이어야 합니다.
- 2) 양성대조액(3)의 평균 흡광도는 0.2 이하, PI 값은 80 이상이어야 합니다.
- 3) 검증대조액1(4)의 PI 값은 60 초과이어야 합니다.
- 4) 검증대조액2(5)의 PI 값은 40 미만이어야 합니다.
만약, 상기의 범위를 벗어난 경우에는 검사 과정이나 시약에 문제가 있는 것이므로, 원인 파악 후 재검사하여야 합니다.

[결과의 계산]

- 1) 음성대조액(2)의 평균 흡광도 값을 계산합니다. (=NCx)
- 2) 다음 계산식을 이용하여 PI (Percent Inhibition)값을 계산합니다.

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

[결과의 판정]

검체의 PI 값	결과
PI 값 < 50	음성
PI 값 ≥ 50	양성

예시)

- 양성대조액(3)의 평균 흡광도 : 0.028 / 음성대조액(2)의 평균 흡광도 : 2.013,
- 검증대조액1(4)의 흡광도 : 0.702 / 검증대조액2(5)의 흡광도 : 1.305,
- 검체의 흡광도 : 0.562 일 때,
- 양성대조액(3)의 PI 값 = $(1 - (0.028/2.013)) \times 100 = 98.6$ (적합)
- 검증대조액1(4)의 PI 값 = $(1 - (0.702/2.013)) \times 100 = 65.1$ (적합)
- 검증대조액2(5)의 PI 값 = $(1 - (1.305/2.013)) \times 100 = 35.2$ (적합)

$$\text{검체의 PI 값} = (1 - (0.562/2.013)) \times 100 = 72.1$$

→ 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 °C) 해야 합니다.
- 2) 테스트 키트는 개봉되지 않은 상태로 패키지 및 각종 시약의 라벨에 인쇄된 유효 기간 까지 안정적입니다.

11. 포장 단위

명칭	96 tests/kit	480 tests/kit	960 tests/kit
항원흡착플레이트(1)	1 장	5 장	10 장
음성대조액(2)	1병 (0.3 ml/병)	1병 (1.0 ml/병)	1병 (2.0 ml/병)
양성대조액(3)	1병 (0.3 ml/병)	1병 (1.0 ml/병)	1병 (2.0 ml/병)
검증대조액1(4)	1병 (0.3 ml/병)	1병 (1.0 ml/병)	1병 (2.0 ml/병)
검증대조액2(5)	1병 (0.3 ml/병)	1병 (1.0 ml/병)	1병 (2.0 ml/병)
10배농축세척액(6)	1병 (50 ml/병)	1병 (250 ml/병)	2병 (250 ml/병)
101배농축접합체액(7)	1병 (0.3 ml/병)	1병 (1.2 ml/병)	1병 (2.5 ml/병)
접합체희석액(8)	1병 (15 ml/병)	1병 (80 ml/병)	1병 (200 ml/병)
TMB기질액(9)	1병 (12 ml/병)	1병 (60 ml/병)	1병 (120 ml/병)
반응정지액(10)	1병 (15 ml/병)	1병 (80 ml/병)	1병 (150 ml/병)
밀봉테이프	2장	10장	20장
인서트	1장	1장	1장

문서번호: I4803-4K
발행일 : 2021. 03. 17

FMD Type O Ab ELISA Quick guide

ELISA 검사

1 플레이트에
검체 분주

검체와 음/양성 및 검증대조액1, 2
25 μ l 분주

2 접합체 반응

조제한 접합체액 100 μ l 분주

37 °C에서 90분 반응,
6회 세척

3 기질 반응

세척된 플레이트에
TMB기질액 100 μ l 분주

빛을 차단하고,
실온(18~25 °C), 15분

4 반응 정지

반응정지액 100 μ l 분주

5 흡광도 판독

측정파장 450 nm, 참조파장 620 nm
반응 정지 후 즉시 수행