

VIROTECH Enterovirus IgG ELISA
(Enterovirus IgG ELISA)

Références : EC116G00

VIROTECH Enterovirus IgM ELISA
(Enterovirus IgM ELISA)

Références : EC116M00

VIROTECH Enterovirus IgA ELISA
(Enterovirus IgA ELISA)

Références : EC116A00

Codes couleur : IgG : brun/brun sombre
IgM : barrette de test brune
IgM : barrette de référence brune/transparente
IgA : incolore

POUR DIAGNOSTIC IN-VITRO UNIQUEMENT

Virotech Diagnostics GmbH
Waldstrasse 23 A2
63128 Dietzenbach, Germany

Tel.: +49(0)6074-23698-0
Fax.: +49(0)6074-23698-900
www.goldstandarddiagnostics.com



Sommaire

1. Usage prévu.....	3
2. Principe du test	3
3. Contenu.....	3
3.1 Kit IgG.....	3
3.2 Kit IgA.....	3
3.3 Kit IgM	3
4. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi	4
5. Mesures de précaution et mises en garde	4
6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)	4
7. Réalisation du test	5
7.1 Echantillons d'analyse.....	5
7.2 Préparation des réactifs	5
7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH	5
7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA	6
8. Interprétation du test	6
8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test (IgG et IgA).....	6
8.2 Contrôle du bon fonctionnement du test (IgM).....	6
8.3 Calcul des unités VIROTECH (VE) (IgG et IgA)	7
8.4 Calcul des unités VIROTECH (VE) (IgM)	7
8.5 Interprétation des résultats.....	7
8.6 Limites du test.....	9
9. Littérature	9
10. Schéma du déroulement du test	10

1. Usage prévu

Ce test ELISA est destiné à la détection d'anticorps IgG, IgM et IgA anti-entérovirus dans le sérum humain.

2. Principe du test

L'anticorps (IgG, IgA) recherché dans le sérum humain forme un immunocomplexe avec l'antigène coâté sur la plaque. Les immunoglobulines non fixées sont éliminées lavage. Le conjugué enzymatique se fixe à cet immunocomplexe. Les immunoglobulines non fixées sont à leur tour éliminées par lavage. Après l'ajout de substrat TMB en solution, l'activité enzymatique (peroxydase) engendre l'apparition d'un colorant bleu qui tourne au jaune lorsque l'on y ajoute la solution d'arrêt. L'anticorps (IgM) recherché dans le sérum humain réagit de la même façon que cela est décrit pour les IgA et IgG. Outre la microplaque (les barrettes) à revêtement antigénique, le produit contient une seconde microplaque (barrette de référence). La différence d'intensité de la couleur entre la barrette de test et la barrette de référence indique la quantité d'anticorps fixés.

3. Contenu

3.1 Kit IgG

1. **Une microplaque**, composée de 96 puits détachables à revêtement antigénique, lyophilisée
2. **Tampon de dilution PBS (bleu, prêt à l'emploi), 2 x 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
3. **Solution de lavage PBS (concentrée au facteur 20), 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
4. **Contrôle négatif des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
5. **Contrôle cut-off des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
6. **Contrôle positif des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
7. **Conjugué IgG (anti-humain), 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec stabilisants des protéines et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi
8. **Substrat de tétraméthylbenzidine en solution (TBM 3',5,5'), 11 ml**, prêt à l'emploi
9. **Solution d'arrêt au citrate, 6 ml**, contient un mélange à l'acide

3.2 Kit IgA

10. **Une microplaque**, composée de 96 puits détachables à revêtement antigénique, lyophilisée
11. **Tampon de dilution PBS (bleu, prêt à l'emploi), 2 x 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
12. **Solution de lavage PBS (concentrée au facteur 20), 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
13. **Contrôle négatif des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
14. **Contrôle cut-off des IgG, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
15. **Contrôle positif des IgA, 2000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
16. **Conjugué IgA (anti-humain), 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec sérum fœtal de veau (FCS) et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi
17. **Substrat de tétraméthylbenzidine en solution (TBM 3',5,5'), 11 ml**, prêt à l'emploi
18. **Solution d'arrêt au citrate, 6 ml**, contient un mélange à l'acide

3.3 Kit IgM

Boîte 1

1. **Une microplaque (barrette de test)**, composée de 96 puits détachables à revêtement antigénique, lyophilisée
2. **Tampon de dilution PBS (bleu, prêt à l'emploi), 3 x 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
3. **Substrat de tétraméthylbenzidine en solution (TBM 3',5,5'), 2 x 11 ml**, prêt à l'emploi

Boîte 2

1. **Une microplaque (barrette de référence)**, composée de 96 puits détachables à revêtement, lyophilisée
2. **Solution de lavage PBS (concentrée au facteur 20), 2 x 50 ml**, pH 7,2, avec conservateur et Tween 20
3. **Contrôle négatif des IgM, 4000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
4. **Contrôle cut-off des IgM, 4000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
5. **Contrôle positif des IgM, 4000 µl**, sérum humain avec stabilisants des protéines et conservateur, prêt à l'emploi
6. **Conjugué IgM (anti-humain), 2 x 11 ml**, conjugué à la peroxydase de raifort (chèvre ou mouton) avec sérum fœtal de veau (FCS) et conservateur en tampon tris, prêt à l'emploi

7. **Solution d'arrêt au citrate, 2 x 6 ml**, contient un mélange à l'acide.

4. Stockage et conservation du kit et des réactifs prêts à l'emploi

Stocker le kit à une température comprise entre 2 et 8 °C. La durée de conservation des différents composants est indiquée sur leur étiquette ; la durée de conservation du kit est indiquée sur le certificat de contrôle-qualité.

1. Après avoir détaché les puits individuels nécessaires, remettre les puits restants dans un sachet fermé hermétiquement et contenant un dessiccateur, puis stocker ce sachet à une température comprise entre 2 et 8 °C. Stocker à nouveau les réactifs à une température comprise entre 2 et 8 °C immédiatement après leur utilisation.
2. Le conjugué prêt à l'emploi et le substrat TMB en solution sont photosensibles et doivent donc être conservés à l'abri de toute lumière. Si la solution de substrat se colore suite à une exposition à la lumière, jeter la solution.
3. Prélever uniquement la quantité de conjugué prêt à l'emploi ou de TMB étant nécessaire à la réalisation du test. Si un excédent de conjugué ou de TMB a été prélevé, ne pas le réinjecter dans son récipient, mais l'éliminer.

Matériel	Etat	Conservation	Date de péremption
Echantillons d'essai	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	max. 6 h
	Non dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Contrôles	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Plaque de microtitration	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (conservation dans le sachet fourni avec un sachet d'agent de dessiccation)	3 mois
Absorbant facteur rhumatoïde	Non dilué, Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué	+2 jusqu'à +8° C	1 semaine
Conjugué	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Tétraméthylbenzidine (TMB)	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C (protégé contre la lumière)	3 mois
Solution d'arrêt	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
Solution de lavage	Après ouverture	+2 jusqu'à +8° C	3 mois
	Dilué final (prêt à l'emploi)	+2 jusqu'à +25° C	4 semaines

5. Mesures de précaution et mises en garde

1. Les sérums de contrôle utilisés ont réagi négativement aux tests de détection des anticorps du HIV1, du HIV2, de l'hépatite C ainsi que de l'antigène HBs. Toutefois, tous les échantillons, les échantillons dilués, les contrôles, les conjugués et la microplaque doivent être considérés comme potentiellement infectieux et manipulés comme tels. Les dispositions légales respectives en vigueur pour les laboratoires doivent être appliquées.
2. Les composants contenant des conservateurs, la solution d'arrêt au citrate et la tétraméthylbenzidine (TBM), ont un effet irritant sur la peau, les yeux et les muqueuses. En cas de contact, rincer immédiatement les parties du corps touchées à l'eau courante et consulter éventuellement un médecin.
3. Eliminer le matériel et les produits utilisés dans le respect des directives nationales en vigueur.

6. Matériel et produits supplémentaires nécessaires (non livrés avec le produit)

1. Eau distillée/déminéralisée
2. Pipette à plusieurs conduits 50 µl, 100 µl
3. Micropipettes : 10 µl, 100 µl, 1000 µl
4. Tubes à essai
5. Chiffons en cellulose
6. Couvercles pour les plaques ELISA
7. Poubelle pour les déchets infectieux
8. Dispositif de lavage manuel pour test ELISA, ou dispositif de lavage automatique des plaques de microtitrage
9. Spectrophotomètre pour plaques de microtitration avec filtre 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)
10. Incubateur

7. Réalisation du test

Le respect scrupuleux des consignes de travail de VIROTECH Diagnostics est le préalable à obtenir des résultats corrects.

7.1 Echantillons d'analyse

Le sérum ou le plasma (en l'occurrence, le type d'anticoagulants n'est pas important) peut être utilisé comme matériel à analyser, même lorsque seul le sérum est mentionné dans la notice.

Les échantillons doivent être préparé directement avant commencer le test.

Lorsque les sérums doivent être conservés pendant une période prolongée, ceux-ci doivent être congelés. Il est déconseillé de décongeler les sérums plusieurs fois.

1. N'utiliser que des sérums frais non inactivés.
2. Ne pas utiliser d'échantillons hyperlipémiques, hémolytiques ou contaminés par des bactéries, ni de sérums à l'aspect trouble (résultats positifs/négatifs faussés).

7.2 Préparation des réactifs

Le système de diagnostic VIROTECH Diagnostics offre une grande flexibilité, grâce à la possibilité d'utiliser le tampon de dilution et de lavage, le TMP, la solution d'arrêt au citrate ainsi que le conjugué pour tous les paramètres et les lots. Les contrôles prêts à l'emploi (contrôle positif, contrôle valeur-seuil, contrôle négatif) sont spécifiques des paramètres et doivent être utilisés exclusivement avec le lot de lames indiqué dans le certificat de contrôle de qualité.

1. Régler l'incubateur à 37 °C et vérifier que cette température règne bien à l'intérieur de celui-ci avant de commencer l'incubation.
2. Amener tous les réactifs à la température ambiante ; ouvrir ensuite l'emballage avec les bandelettes de test.
3. Bien agiter les composants liquides avant leur utilisation.
4. Compléter le concentré de solution de lavage avec de l'eau distillée / déminéralisée pour obtenir 1 litre (au cas où le concentré formerait éventuellement des cristaux, portez-le à température ambiante avant de le diluer et agitez bien avant utilisation).
5. Des titrages d'IgG ou des facteurs rhumatismaux élevés peuvent gêner la mise en évidence d'anticorps IgM ou engendrer l'obtention de résultats positifs ou négatifs erronés. **Les sérums doivent être prétraités avec le RF-SorboTech** (agent d'adsorption VIROTECH). Dans le cas de contrôles des IgM, l'adsorption préliminaire n'est pas nécessaire.

7.3 Réalisation du test ELISA VIROTECH

Le test des **IgM** est effectué sur tous les échantillons à traiter, aussi bien sur les **barrettes de test** (barrettes à antigène de l'entérovirus) que sur les **barrettes de référence** (barrettes de revêtues d'une couche d'antigène de contrôle). Avant le test, il est donc nécessaire de placer – les unes à côté des autres, dans un support – autant de barrettes de test et de barrettes de référence qu'il y a d'échantillons. **Lors de cette opération, seules les barrettes de test et barrettes de référence dont le numéro de lot est indiqué dans le certificat de contrôle de qualité peuvent être combinées entre elles.**

Les tests de détection des IgA ou des IgG ne s'effectuent à l'aide d'une seule microplaque.

1. Pour chaque série, pipeter 100 µl de tampon de dilution (valeur à blanc) prêt à l'emploi, de contrôle négatif, de contrôle cut-off et de contrôle positif des IgG, IgM et des IgA, ainsi que des sérums dilués des patients. Nous recommandons d'opter pour une double distribution (blanc, contrôles et sérums patients) : pour le contrôle cut-off, la double distribution est absolument indispensable. Dilution de travail pour les sérums patients : 1+100 ; par ex. 10 µl de sérum + 1 ml de tampon de dilution.
2. Après la distribution, incuber à 37 °C la plaque pendant 30 minutes (avec couvercle).
3. Mettre fin à la période d'incubation par quatre lavages effectués chacun à l'aide de 350 à 400 µl de solution de lavage pour chaque puits. Ne pas laisser de solution de lavage dans les puits, mais en éliminer les derniers restes en tapotant la plaque sur une protection en cellulose étendue à cet effet sur le plan de travail.
4. Déposer 100 µl de conjugué prêt à l'emploi dans tous les puits.
5. Incubation des conjugués : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle).
6. Mettre fin à l'incubation du conjugué en effectuant quatre lavages (voir le point 3).
7. Déposer 100 µl de substrat TMB en solution dans chacun des puits.

8. Incubation de la solution de substrat : 30 minutes à 37 °C (avec couvercle, placer dans un endroit sombre).
9. Arrêt de la réaction avec le substrat : pipetter 50 µl de solution d'arrêt dans chacun des puits. Agiter la plaque avec précaution, jusqu'à ce que les liquides se soient complètement mélangés et qu'ils présentent une couleur jaune uniforme.
10. Mesurer les extinctions à 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm). Régler le photomètre de façon à ce que la valeur à blanc mesurée soit déduite de toutes les autres extinctions. La mesure photométrique doit être réalisée en l'espace d'une heure à partir de l'ajout de la solution d'arrêt.

Schéma du déroulement du test, voir dernière page

7.4 Utilisation de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA

Tous les tests ELISA de VIROTECH Diagnostics peuvent être effectués à l'aide de dispositifs de traitement automatisé des tests ELISA. L'utilisateur s'engage à procéder à une validation de l'appareil à intervalles réguliers.

VIROTECH Diagnostics recommande la procédure suivante :

1. Lors de la mise à disposition de l'appareil ou lorsque des réparations importantes ont été effectuées sur le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA, VIROTECH Diagnostics recommande de réaliser la validation du dispositif en se conformant aux directives du fabricant de l'appareil.
2. Il est recommandé de contrôler ensuite le dispositif de traitement automatisé des tests ELISA à l'aide du kit de validation (EC250.00). Ce contrôle régulier à l'aide du kit de validation doit être effectué au moins une fois par trimestre.
3. Lors de chaque cycle d'essai, les critères de validation du certificat de contrôle-qualité du produit doivent impérativement être remplis.

Cette manière de procéder assure le fonctionnement irréprochable de votre processeur ELISA et sert de plus à la garantie de qualité du laboratoire.

8. Interprétation du test

Les contrôles prêts à l'emploi sont destinés à une détermination semi-quantitative des anticorps IgG et IgM dont la concentration est indiquée en unités VIROTECH (VE). Les fluctuations dues à la réalisation du test sont compensés par la méthode de calcul, ce qui permet d'obtenir une reproductibilité élevée. Pour le calcul des unités VIROTECH (VE), utiliser les moyennes des valeurs de DO.

8.1 Contrôle du bon fonctionnement du test (IgG et IgA)

a) Valeurs de DO

La valeur de DO de la valeur à blanc doit être <0,15.

Les valeurs de DO des contrôles négatifs doivent être inférieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité, les valeurs de DO des contrôles positifs et des contrôles cut-off doivent être supérieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité.

b) Unités VIROTECH (VE)

Les unités VIROTECH (VE) du contrôle cut-off sont fixées à 10 VE. Le nombre de VE calculées pour le contrôle positif doit être compris dans la plage indiquée dans le certificat de contrôle-qualité.

Si les exigences (concernant les valeurs DO et les unités VIROTECH) ne sont pas remplies, répéter le test.

8.2 Contrôle du bon fonctionnement du test (IgM)

1. Déduire la valeur à blanc de toutes les valeurs d'extinction des contrôles positifs, cut-off et négatifs ainsi que des sérums patients déposés sur les barrettes de test (=« Valeurs de test »).
2. Déduire valeur à blanc de toutes les valeurs d'extinction des contrôles positifs, cut-off et négatifs ainsi que des sérums patients déposés sur les barrettes de référence (=« Valeurs de référence »).
3. Pour tous les contrôles positifs, cut-off et négatifs ainsi que pour les sérums patients, calculer les « différences entre les valeurs de test et les valeurs de référence » ; pour cela, soustraire les valeurs de référence de leurs valeurs de test respectives.

a) Valeurs de DO

Les différences entre la valeur de test et la valeur de référence des contrôles négatifs doivent être inférieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité, les différences entre la valeur de test et la valeur de référence des contrôles positifs et des contrôles cut-off doivent être supérieures aux valeurs de DO indiquées dans le certificat de contrôle-qualité.

b) Unités VIROTECH (VE)

Les unités VIROTECH (VE) du contrôle cut-off sont fixées à 10 VE. Le nombre de VE calculées pour le contrôle positif doit être compris dans la plage indiquée dans le certificat de contrôle-qualité.

Si les exigences (concernant les valeurs de DO et les unités VIROTECH) ne sont pas remplies, répéter le test.

8.3 Calcul des unités VIROTECH (VE) (IgG et IgA)

L'extinction de la valeur à blanc (450/620 nm) doit impérativement être soustraite de toutes les extinctions.

$VE_{\text{(contrôle positif)}} = \frac{DO_{\text{(contrôle positif)}}}{DO_{\text{(contrôle cut - off)}} \times 10$ $VE_{\text{(sérum patient)}} = \frac{DO_{\text{(sérum patient)}}}{DO_{\text{(contrôle cut - off)}} \times 10$

8.4 Calcul des unités VIROTECH (VE) (IgM)

L'extinction de la valeur à blanc (450/620 nm) doit impérativement être soustraite de toutes les extinctions.

$VE_{\text{(contrôle positif)}} = \frac{\text{Différence (valeur de test - valeur de référence du contrôle positif)}}{\text{Différence (valeur de test - valeur de référence du contrôle cut - off)}} \times 10$ $VE_{\text{(sérum patient)}} = \frac{\text{Différence (valeur de test - valeur de référence du sérum patient)}}{\text{Différence (valeur de test - valeur de référence du contrôle cut - off)}} \times 10$

Exemple:

$VE_{\text{(contrôle positif)}} = \frac{0,746}{0,268} \times 10 = 27,8$

- DO sur la barrette du contrôle positif : 0,853
- DO sur la barrette de référence du contrôle positif : 0,107
- Différence entre la valeur de test et la valeur de référence des contrôles positifs : 0,746
- DO sur la barrette du contrôle cut-off : 0,341
- DO sur la barrette du référence cut-off : 0,073
- Différence entre la valeur de test et la valeur de référence du contrôle cut-off : 0,268

8.5 Interprétation des résultats

Résultat (VE)	Évaluation
< 9,0	négatif

9,0 à 11,0	plage limite
> 11,0	positif

1. Si le nombre d'unités VIROTECH (VE) mesurées pour l'échantillon est supérieur à la limite supérieure de la plage limite, les échantillons seront considérés comme positifs.
2. Si le nombre d'unités VIROTECH (VE) mesurées est compris dans la plage limite indiquée, la concentration en anticorps n'est pas significativement élevée ; les échantillons seront alors considérés comme étant à la limite. Pour qu'une infection soit mise en évidence de façon sûre, il est nécessaire de déterminer la teneur en anticorps des deux échantillons sériques. Un échantillon sérique doit être testé directement après le début de l'infection, un deuxième échantillon cinq à dix jours plus tard (sérum de convalescent). La concentration des deux échantillons doit être déterminée de façon parallèle. Il n'est pas possible d'établir de diagnostic correct sur la base de l'évaluation d'un seul échantillon sérique.
3. Si les valeurs mesurées sont inférieures à la plage limite définie, l'échantillon ne contient pas d'anticorps spécifiques aux antigènes en quantité décelable. Les échantillons seront alors considérés comme étant négatifs.

8.6 Limites du test

La réponse immunitaire peut être homotype ou hétérotype. Les anticorps homotypes sont dirigés contre des épitopes spécifiques de sérotype tandis que les anticorps hétérotypes reconnaissent les épitopes qui, parmi les sérotypes, sont identiques ou similaires.

Le test ELISA VIROTECH utilise des préparations antigéniques dénaturées par la chaleur pour mettre en évidence des anticorps anti-entérovirus hétérotypiques et à réaction croisée. Lors de l'établissement du diagnostic concernant une infection existante à entérovirus, il convient de tenir compte des points suivants :

1. Le développement des épitopes à réaction croisée face aux entérovirus inactivés par la chaleur peut différer au niveau quantitatif ainsi qu'au niveau qualitatif en fonction des sérotypes et des isolats ayant été utilisés pour la préparation antigénique. Par conséquent, le spectre des anticorps hétérotypiques reconnu par différents systèmes de test peut varier.
2. La proportion quantitative d'anticorps homotypiques par rapport aux anticorps hétérotypiques contenus dans le sérum des patients peut varier. Des études menées par King et al. (6) indiquent qu'au cours du déroulement des premières infections à entérovirus ayant lieu pendant l'enfance, l'organisme produit plutôt des anticorps homotypiques et que c'est seulement lorsque l'individu avance en âge et qu'il a eu un plus grand nombre d'infections à entérovirus que la proportion d'anticorps hétérotypiques augmente. Les tests ELISA VIROTECH anti-entérovirus peuvent donc afficher des résultats négatifs lorsque la réponse immunitaires hétérotypique ne se développe que très faiblement par rapport à la réponse homotypique.
3. Comme le test ELISA détecte également les sérums réagissant positivement aux anticorps anti-poliovirus, il n'est pas exclu qu'un titre vaccinal provoque un résultat positif.
4. Des réactions croisées entre les entérovirus et le virus de l'hépatite A, le virus d'Epstein-Barr (EBV), le cytomégalovirus (CMV) et les rhinovirus ont été rapportées (7).
5. L'interprétation des résultats sérologiques doit toujours inclure le tableau clinique, les données épidémiologiques et les éventuels autres résultats d'analyses existants.

9. Littérature

1. Diagnostische Bibliothek: Coxsackie- und Echoviren; In vitro Diagnostica Nachrichten; 24 (1994) 1-8.
2. MIQ 13; Infektionen des Mundes und der oberen Atemwege; 35-37 (2000).
3. RKI, Übersicht zu Erkrankungen durch Enteroviren, Stand: Mai 2002.
4. Bomann J et al., Serum IgA, IgG und IgM Responses to different Enteroviruses as measured by a Coxsackie B5-based indirect ELISA; J. Med.Virol.; 38:32-35 (1992).
5. Swanink CMA et al., Coxsackie B1-Based Antibody-Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Immunoglobulin G (IgG), IgM, and IgA with Broad Specificity for Enteroviruses, J. Clin. Microbiol. 31:3240-3246 (1993)
6. King M.J., Bidvell D., Shaikh A, Voller A., Banatvala J.E. Coxsackie-B-virus-specific IgM responses in children with insulin-dependent (juvenile-onset; type 1) diabetes mellitus, Lancet i: 1397-9 (1983)
7. Samuelson, A. et al., Aspects on the serodiagnosis of enterovirus infections by ELISA, Serodiagn. Immunother. Infect. Dis.; 4:395-406 (1990).

Préparation des échantillons patients et de la solution de lavage

▼ **Solution de lavage :** ajouter de l'eau distillée/déminéralisée au concentré pour obtenir un volume total d'un litre.

▼ **Dilution du Échantillons IgG/IgA**
à
1:101

Exemple :

10 µl de sérum/plasma + 1000 µl de tampon de dilution
(le tampon de dilution est prêt à l'emploi)

▼ **Dilution du Échantillons IgM à 1:101**
Adsorption du facteur
rhumatoïde avec RF-SorboTech

Exemple :

Incuber 5 µl de sérum/plasma + 450 µl de tampon de dilution +
1 goutte RF-SorboTech pendant 15 minutes

Réalisation du test

Incubation des échantillons	30 minutes à 37 °C	100 µl d'échantillons patients blanc (tampon de dilution) et contrôles
↓		
Laver 4 fois		400 µl de solution de lavage bien tapoter
↓		
Incubation du conjugué	30 minutes à 37 °C	100 µl de conjugué IgG, IgM, IgA
↓		
Laver 4 fois		400 µl de solution de lavage bien tapoter
↓		
Incubation du substrat	30 minutes à 37 °C	100 µl de substrat
↓		
Arrêt		50 µl de solution d'arrêt agiter avec précaution
↓		
Mesure de l'extinction		photomètre à 450/620 nm (longueur d'onde de référence 620-690nm)

