



ELISA

(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Tecnica immunoenzimatica che utilizza un enzima come *marker* dell'anticorpo specifico o dell' anti-gammaglobulina

L'antigene o l'anticorpo possono essere legati ad un enzima in modo che il risultante coniugato possieda attività immunologica ed enzimatica.

VANTAGGI

Notevole sensibilità: una sola molecola di enzima può reagire con un elevato numero di molecole di substrato

Semplicità di esecuzione

Limite: informazioni solo sulla presenza/concentrazione di una molecola, ma non danno informazioni sulle sue proprietà biochimiche (es peso molecolare, localizzazione cellulare, ecc).

Applicazioni

- Localizzazione Ags in tessuti ed organi
- Fissazione di un Ag o un Ab in fase solida



Enzimi coniugati

Enzimi comunemente utilizzati	Substrati	Reazioni	
Perossidasi da rafano (HPRO)	O-Fenilediamina Acido 5-Aminosalicilico 4-Aminoantipirene ABTS	2DH+H ₂ O ₂ (incolore)	$\begin{array}{c} E \\ \rightarrow \\ \leftarrow \\ \end{array} 2D+H_2O_2$ (colorata)
Fosfatasi Alcalina (mucosa intestinale di vitello e E. Coli)	P-Nitrofenil Fosfato	PNPP (incolore)	$\begin{array}{c} E \\ \rightarrow \\ \leftarrow \\ \end{array} P\text{-Nitrofenolo}$ (colorata)
B-D Galattosidasi (E. Coli)	O-Nitrofenil-B-D-Galattopiranoside	ONPGP (incolore)	$\begin{array}{c} E \\ \rightarrow \\ \end{array} P\text{-Nitroferolo}$ (colorata)
Glucosio Ossidasi	D Glucosio/H ₂ O ₂ /DH/HPRO	D Glucosio+H ₂ O	$\begin{array}{c} E \\ \rightarrow \\ \end{array} D \text{ Glucosio 5-Lattone}+H_2O_2$
		$\begin{array}{c} HPRO \\ H_2O_2 + 2 DH \\ 22 \\ \text{(incolore)} \end{array}$	$\begin{array}{c} \rightarrow \\ 2 D + 2H_2O \\ 2 \\ \text{(colorata)} \end{array}$

Substrati

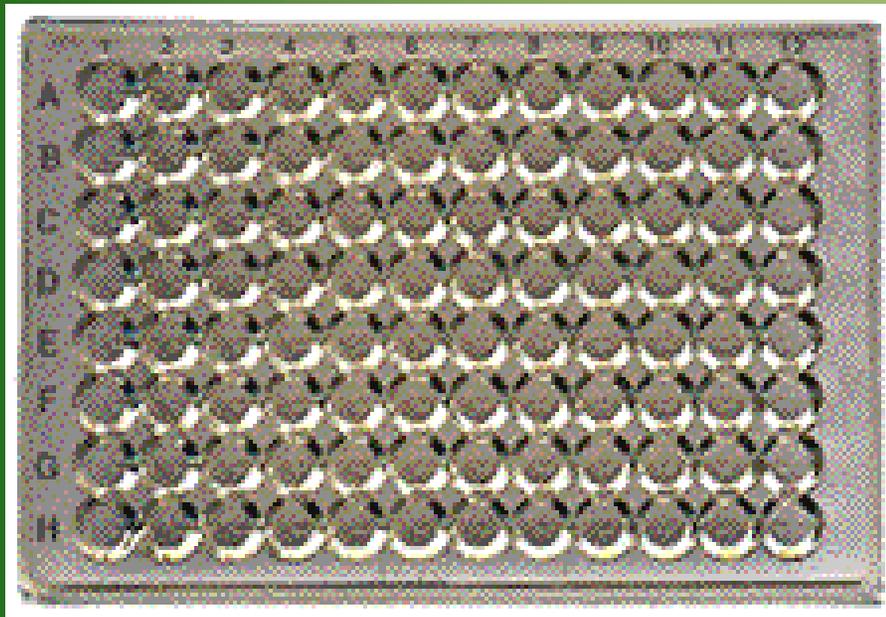
Nome	Enzima	Reazione bloccata da	Colore	Lunghezza d' onda di rivelazione
pNPP (p-nitrofenilfosfato)	Fosfatasi alcalina	NaOH	giallo	405 nm
TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzene)	Perossidasi	Ac. solforico	blu	450 nm
OPD (o-fenilene diamina)	perossidasi	Ac. solforico	arancio	495 nm

TIPOLOGIE DI TEST ELISA

- 1) *ELISA classica*
- 2) *ELISA catching*
- 3) *ELISA competitive*

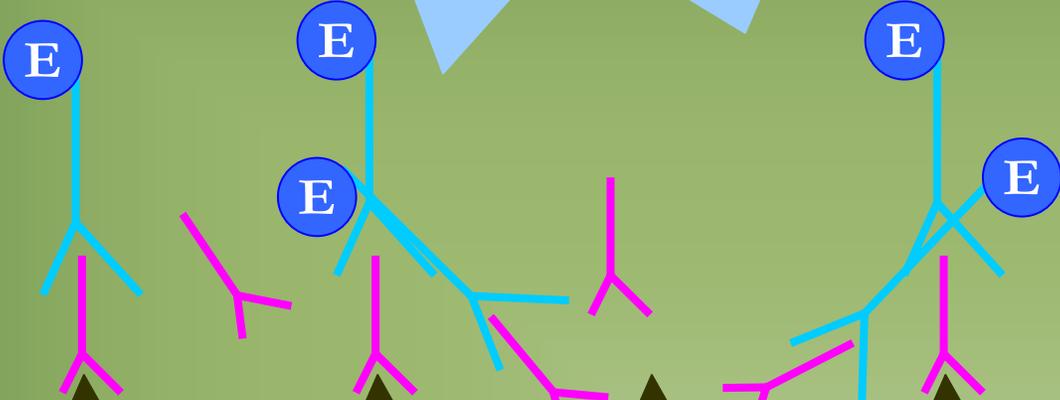
ELISA CLASSICA

- Scopo: titolazione anticorpi nel siero
- Antigeni adsorbiti passivamente alle pareti di provette di plastica o di pozzetti di apposite piastre

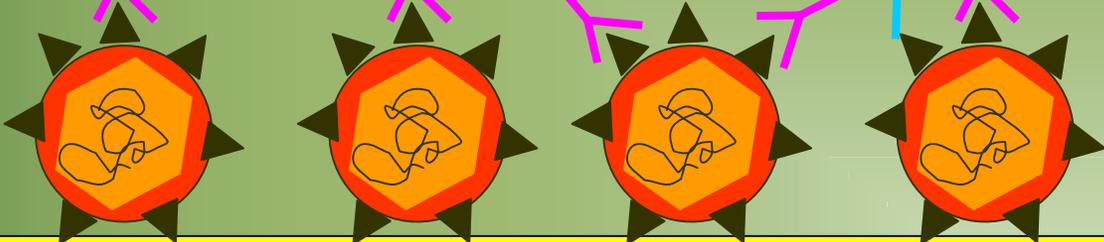




Anti-IgG
coniugate



Siero in esame

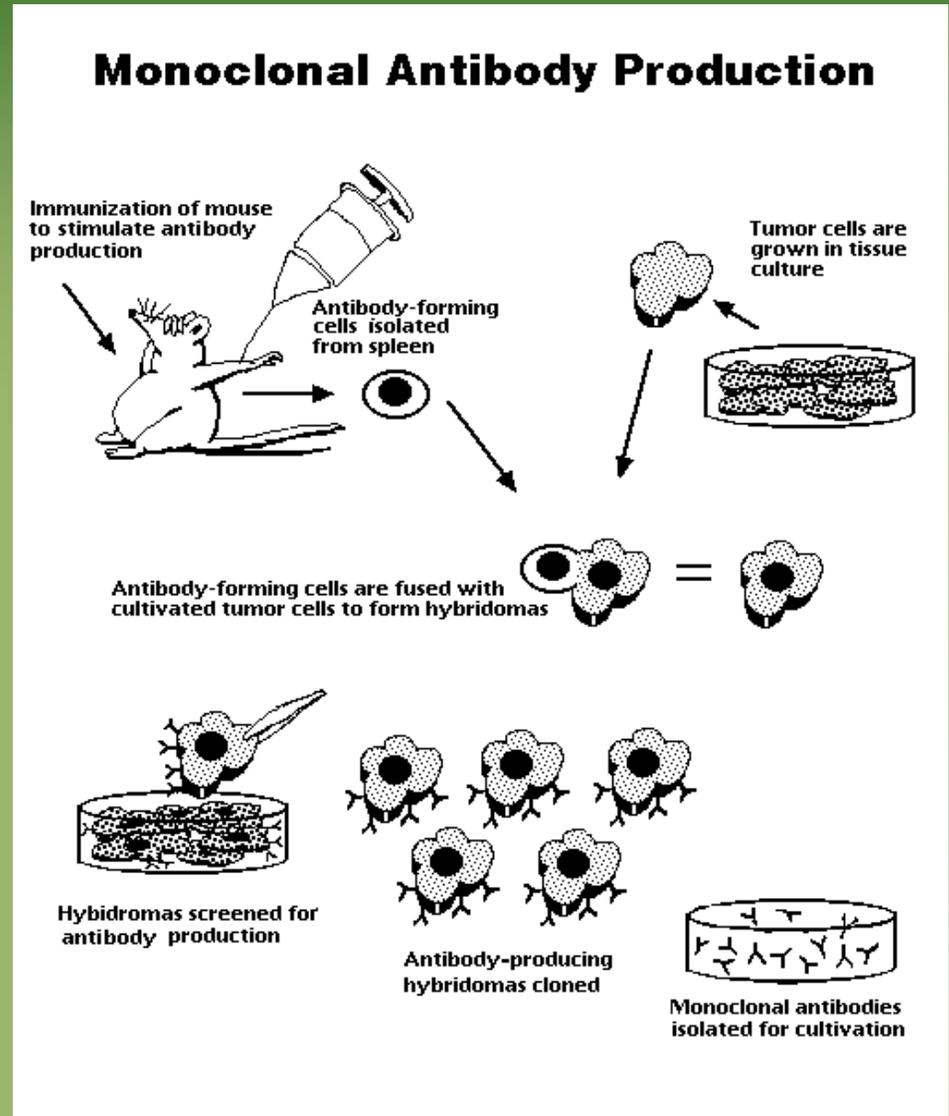


Ag adsorbito



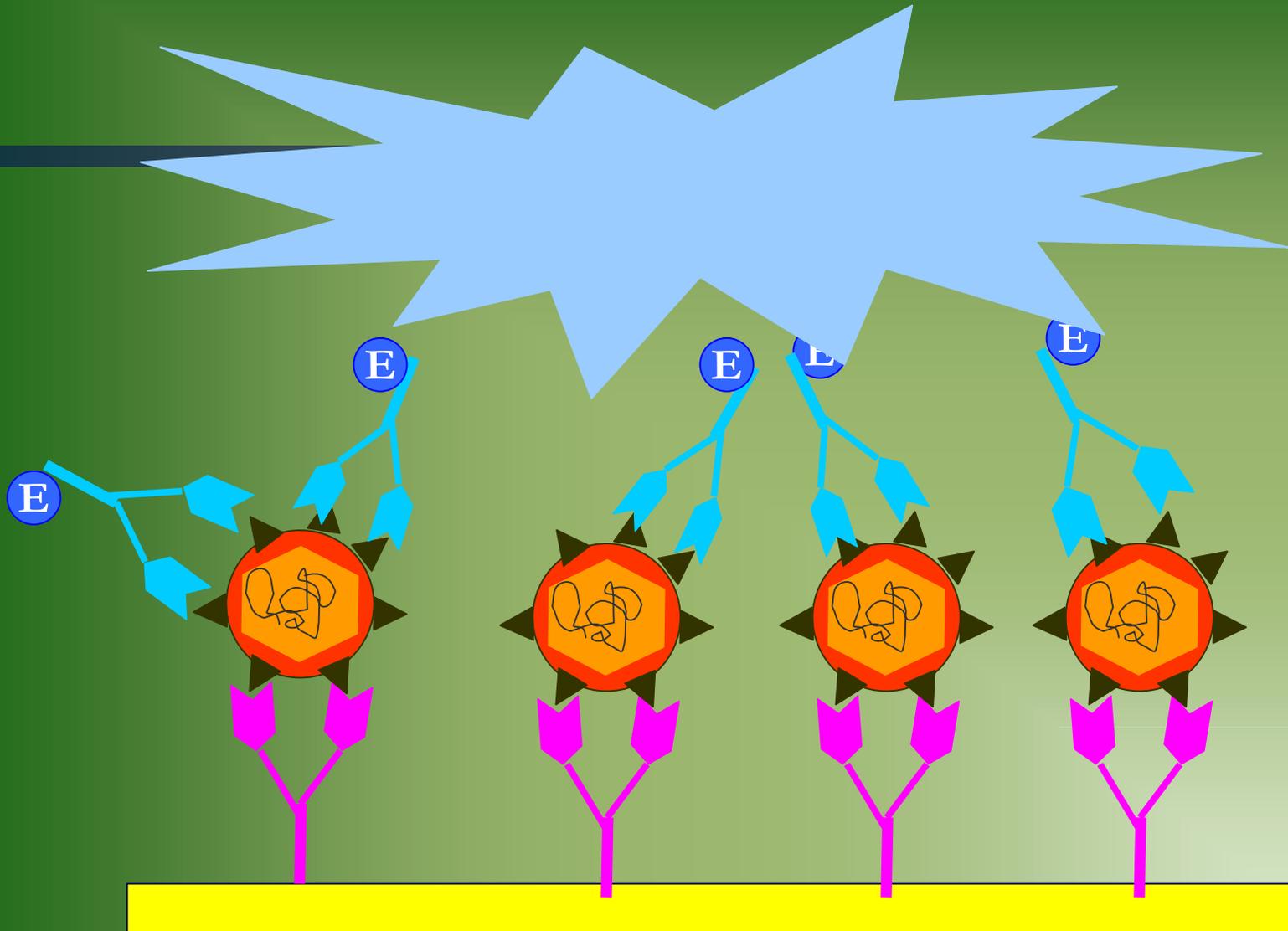
APPLICAZIONI:

- ❖ Sierodiagnosi di malattie infettive e infestive
- ❖ Screening degli anticorpi monoclonali



ELISA *CATCHING*

Scopo: ricerca di antigeni



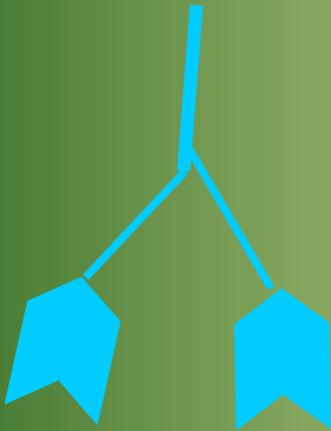
ADSORBIMENTO

- Uso di piastre in cloruro di polivinile (PVC) o polistirene
- assorbimento passivo (coating) dovuto ad interazioni idrofobiche tra proteine nonpolari e matrice plastica
- incubazione overnight a 4°C

PROBLEMI CON L'ADSORBIMENTO DELL'Ag:

- 1) Alta densità di Ags → No legame dell'Ab per inibizione sterica (molecole antigeniche fittamente stipate)
- 2) Alta [] di Ag → “stacking” o “layering” (interazione meno stabile con i successivi reagenti)

PROBLEMI CON L'ADSORBIMENTO DELL'Ab:



- 1) Orientazione casuale dell'Ab con legame di scarse molecole antigeniche
- 2) Legame dell'Ab attraverso la porzione Fab (assenza di legame con l'Ag)
- 3) Ampio spazio tra gli Abs (assenza di legame tra molecole antigeniche adiacenti)
- 4) Eccesso di Abs con eliminazione al successivo lavaggio

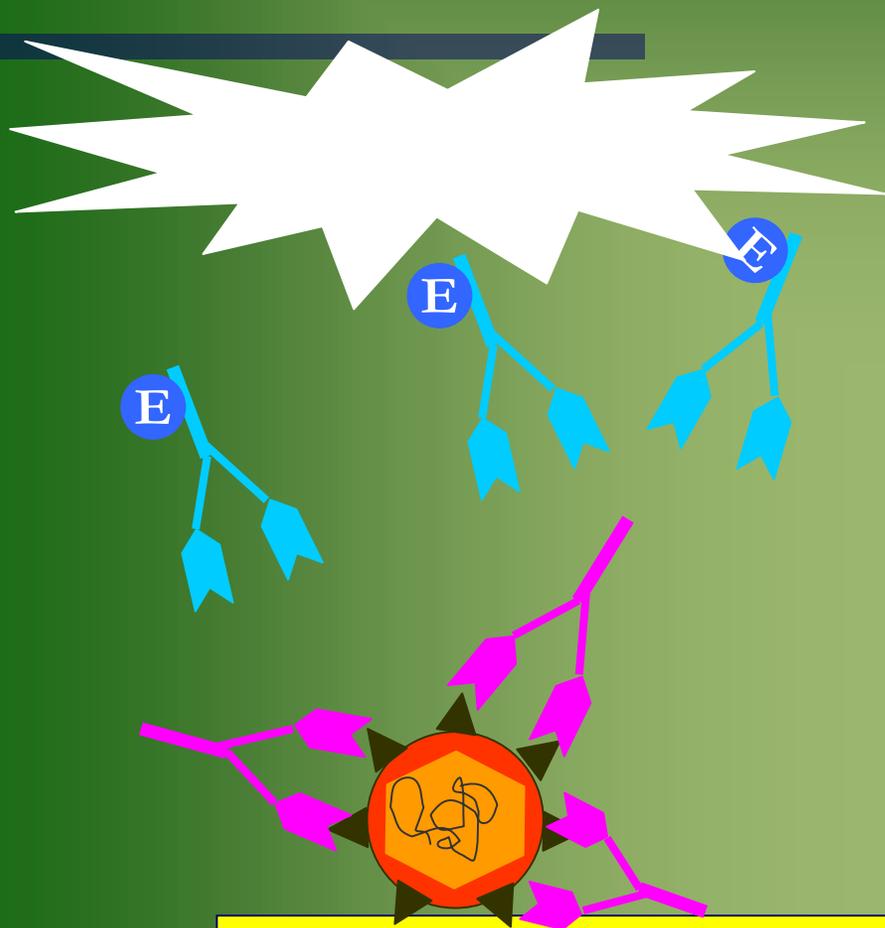
PROCEDURA ELISA CATCHING



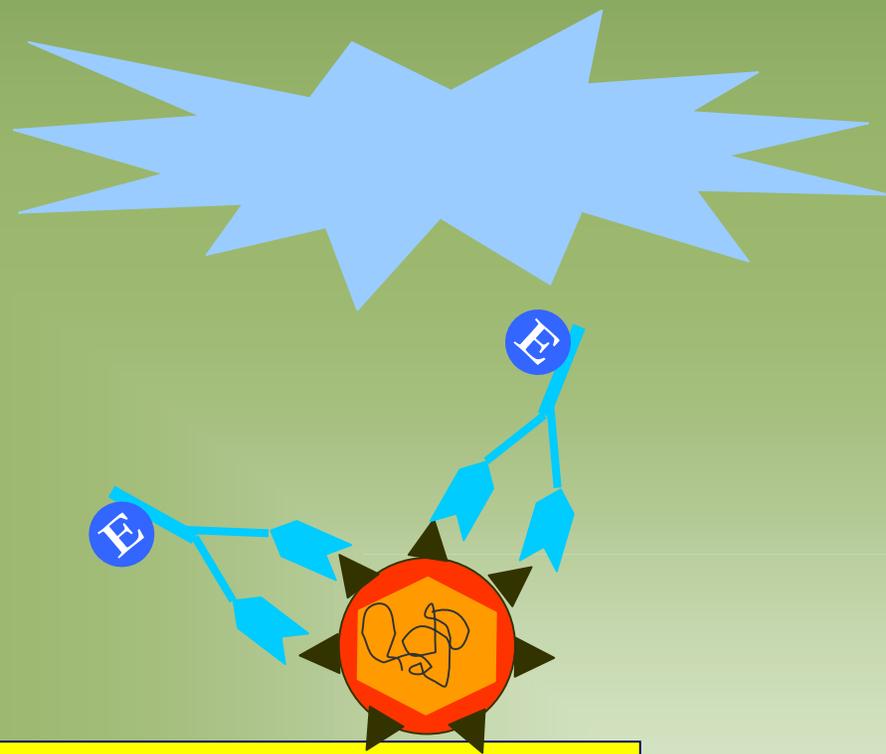
ELISA COMPETITIVE

- ✓ Rilevazione di anticorpi nel siero
- ✓ Gli anticorpi nel campione si legano ad un antigene e inibiscono il legame di un anticorpo marcato con enzima che reagisce con l'antigene

Siero positivo



Siero negativo



**Campione contenente
Abs che reagiscono
con l'Ag**



**Inibizione legame
dell'Ab marcato**



**Assenza di reazione
colorimetrica**

**Campione senza Abs
che reagiscono con l'Ag**



**Legame dell'Ab
marcato**



**Reazione
colorimetrica**



ATTENZIONE!!!!

Reazione positiva

NO reazione
colorimetrica

Reazione negativa

reazione
colorimetrica

KITS DIAGNOSTICI

- kits per il rilievo di antigeni virali nel siero (es.: FeLV)
- kits che combinano ELISA classica ed *ELISA catching* in un unico sistema diagnostico

QUANTIFICAZIONE DELL'ELISA

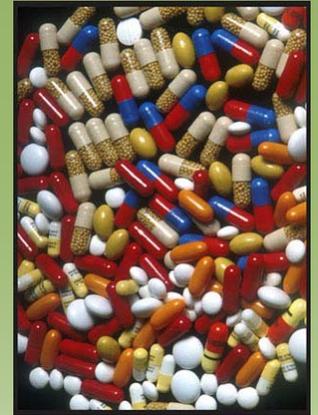
- ❖ Intensità del colore proporzionale al grado di positività del campione
- ❖ Necessità di lettura in un tempo specifico
- ❖ Uso di uno spettrofotometro (misurazione quantitativa dell'intensità di colore attraverso l'assorbanza della luce ad una specifica λ)



APPLICAZIONI DEL TEST ELISA



- 1) Ricerca di antigeni a scopo diagnostico e di ricerca
- 2) Ricerca di anticorpi a scopo diagnostico e di ricerca
- 3) Drug discovery (identificazione di molecole nella fasi iniziali dello screening nelle industrie farmaceutiche)
- 4) Food science industry (analisi delle tossine nel cibo)



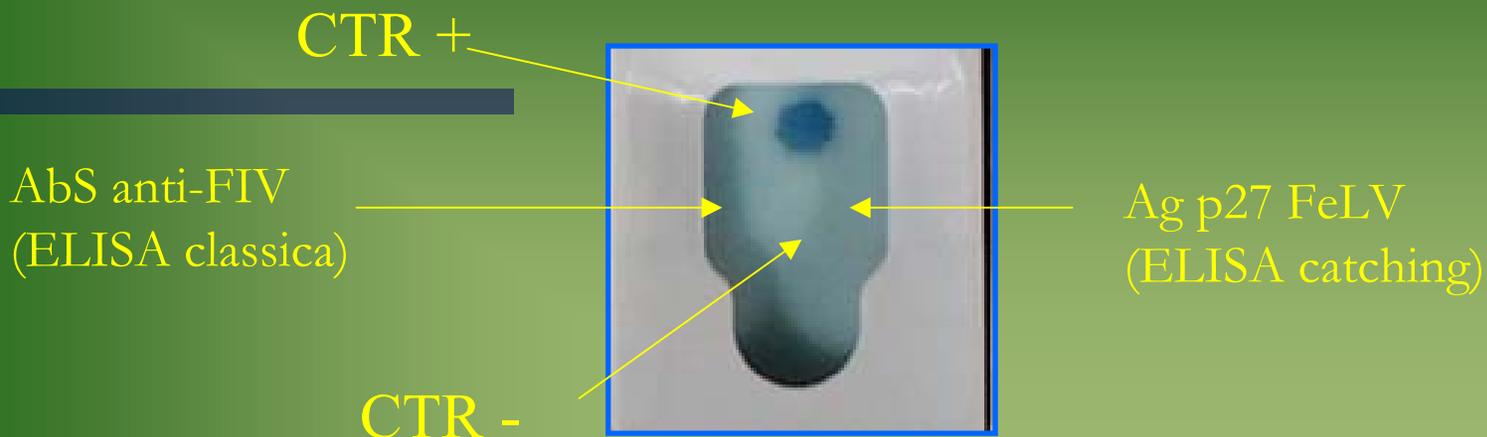
USO DIAGNOSTICO

- ✓ Ag p27 del virus della leucemia felina (FeLV)
- ✓ Abs nei confronti del virus dell'immunodeficienza felina (FIV)
- ✓ Dosaggio delle Igs
- ✓ ELISA competitive nel virus di Aujeszky





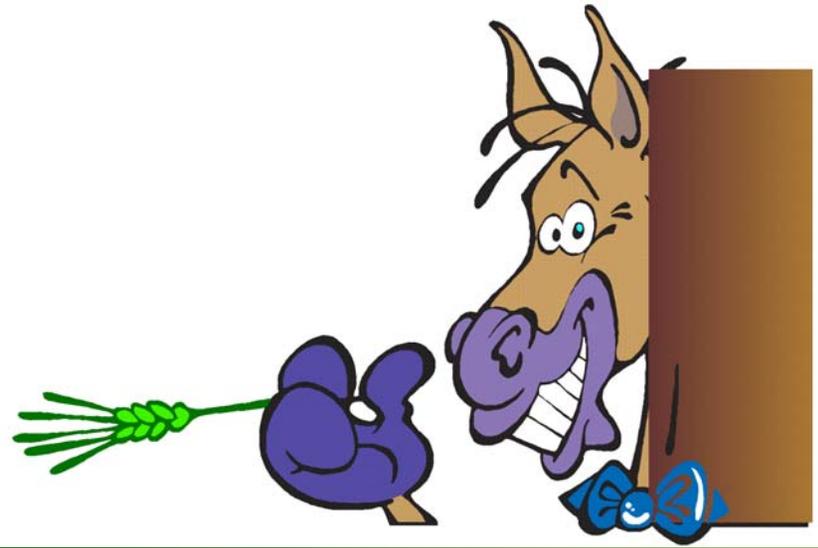
TEST ELISA PER FeLV E FIV (su filtro)



Test negativo
per Abs anti-FIV
Test positivo
per Ag p27 FeLV

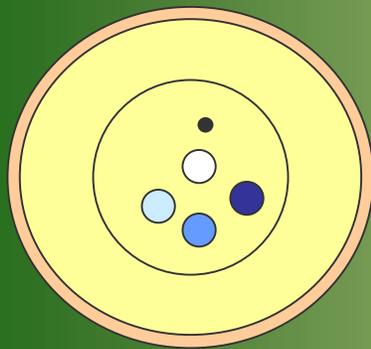
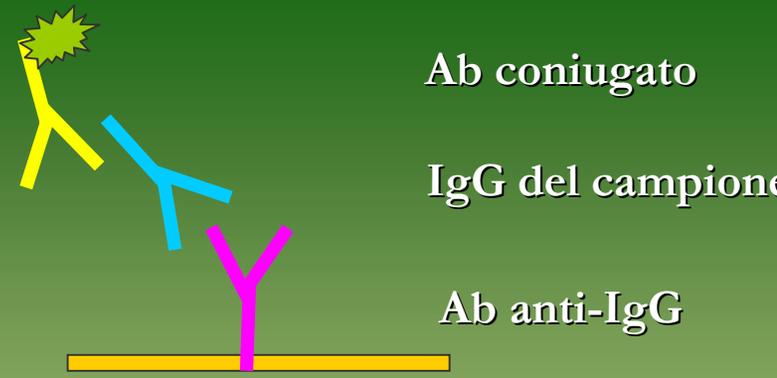
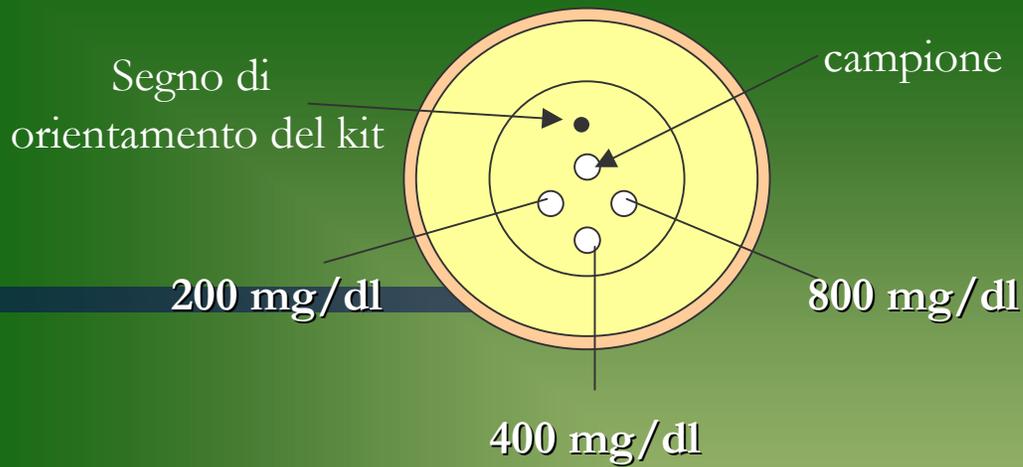
Test negativo
Per FeLV e FIV

Test positivo
per FeLV e FIV

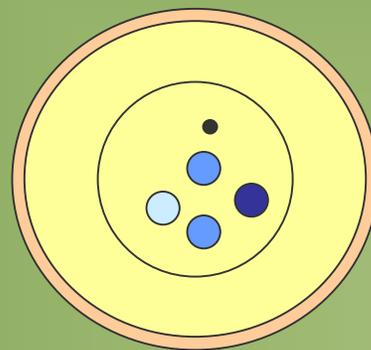


RILIEVO DELLE γ -GLOBULINE NEL SIERO DEI PULEDRI (ELISA catching)

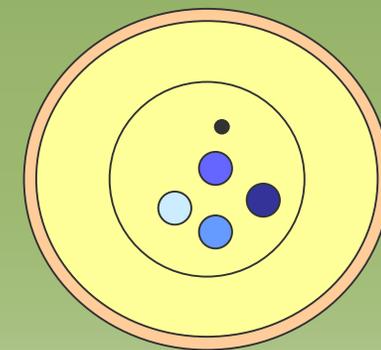
- ❖ Placenta epitelio-coriale: passaggio di IgG solo col colostro
- ❖ 24-48 h dopo la nascita, carenza di IgG:
 - totale: livello sierico inferiore a 200 mg/dl
 - parziale: tra 200 e 400 mg/dl
 - IgG adeguate: 400 mg/dl



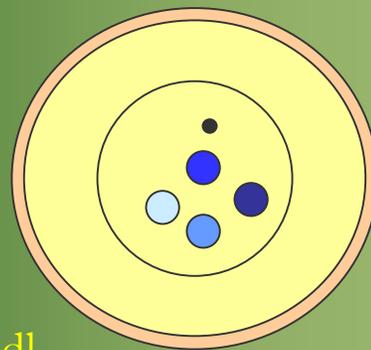
< 200 mg/dl



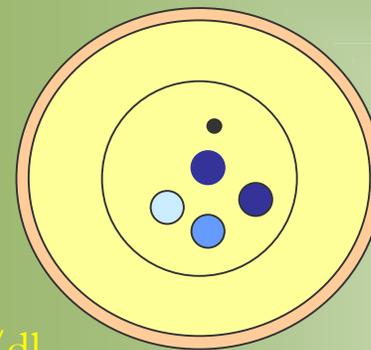
400 mg/dl



400-800 mg/dl

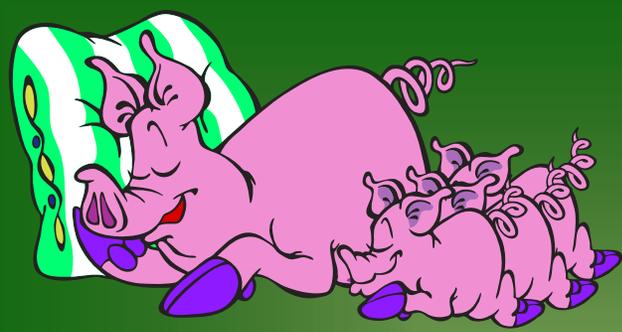


700 mg/dl

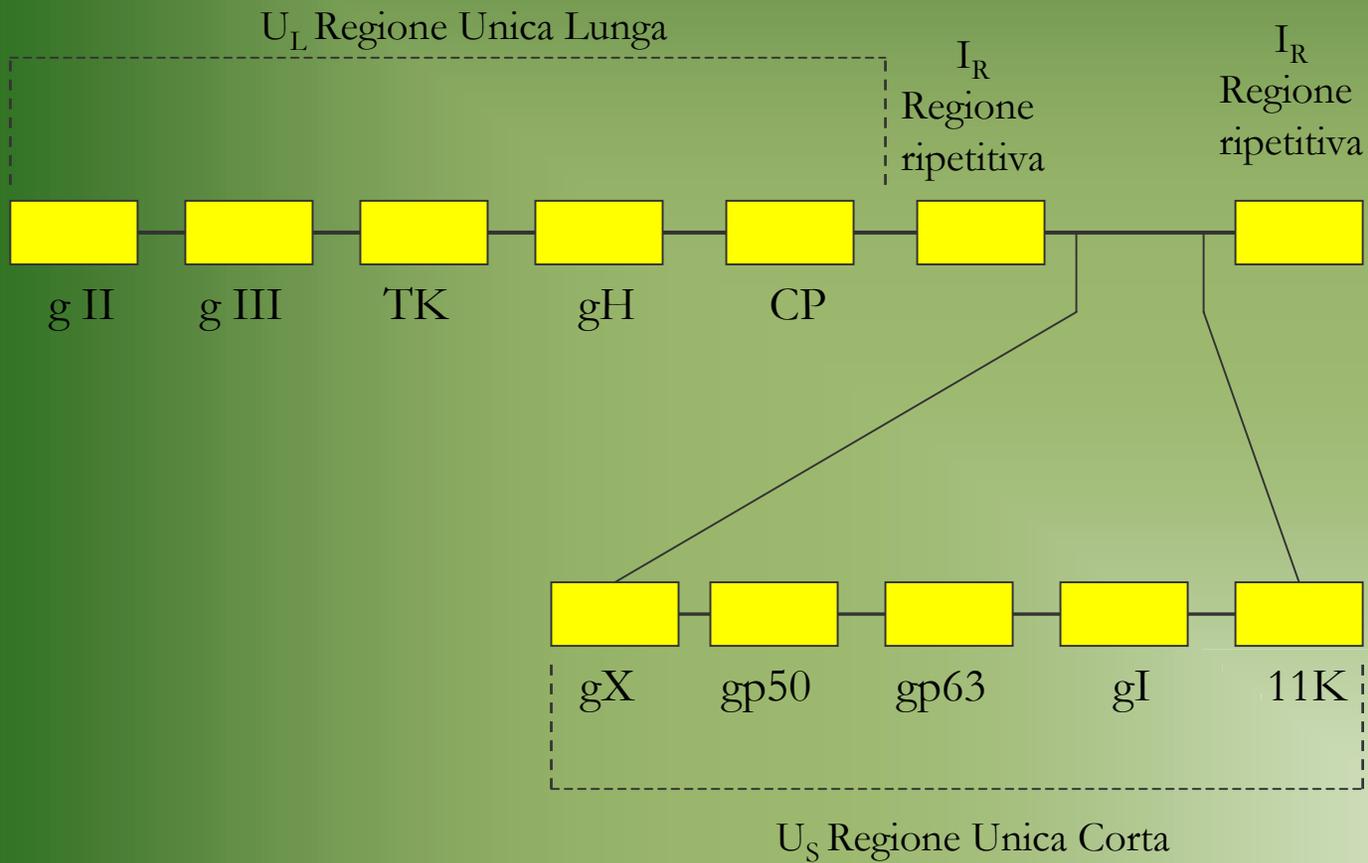


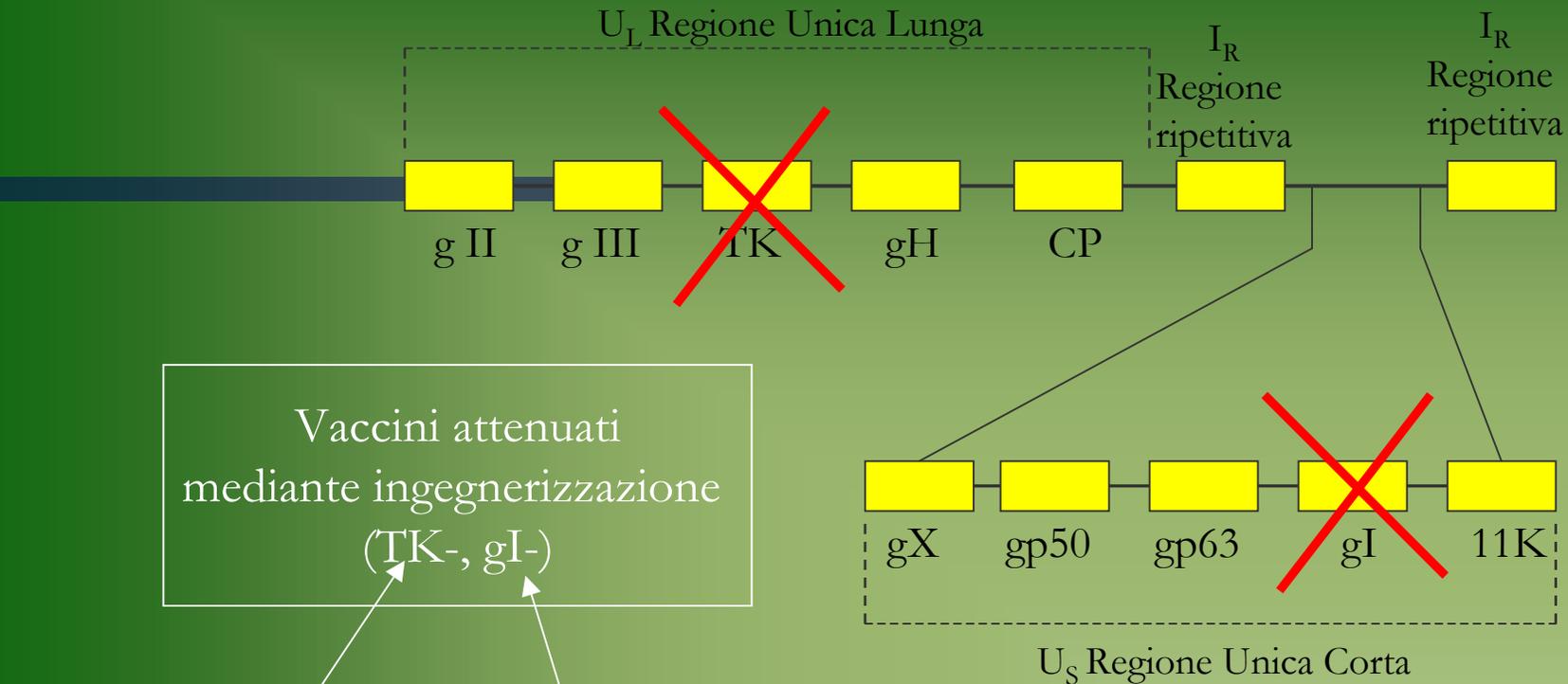
800 mg/dl

Kit elisa per il rilievo delle gammaglobuline nel siero del puledro.



ELISA competitive (virus di Aujeszky)





avirulenti

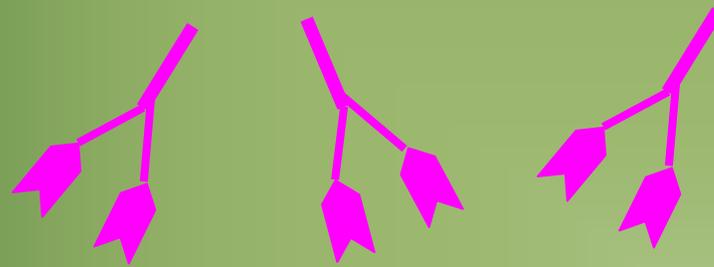
Proteina non essenziale
(marker immunologico negativo)

Possibilità di distinguere la risposta anticorpale dei suini vaccinati da quelli infetti

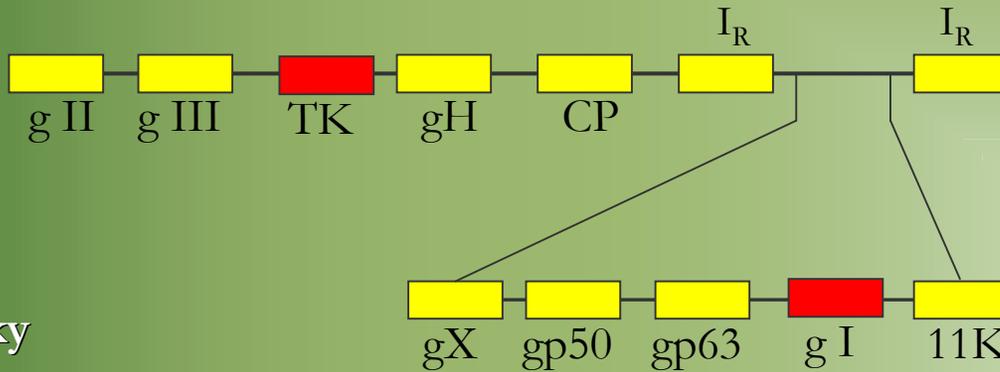
4) Substrato e cromogeno



3) Ab monoclonale anti-gI
marcato



2) Siero animale
vaccinato o infetto



1) Virus di Aujeszky

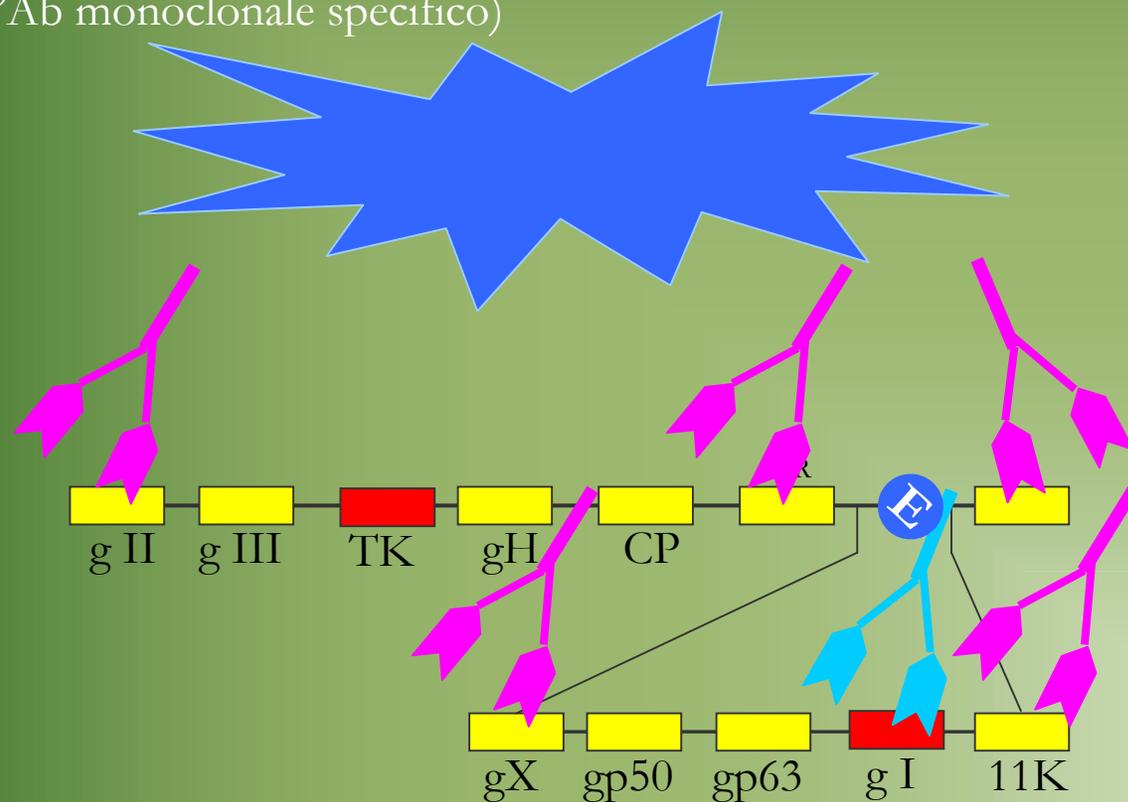
ANIMALE VACCINATO

NO Abs anti-TK e anti-gI

-No Abs anti-gI

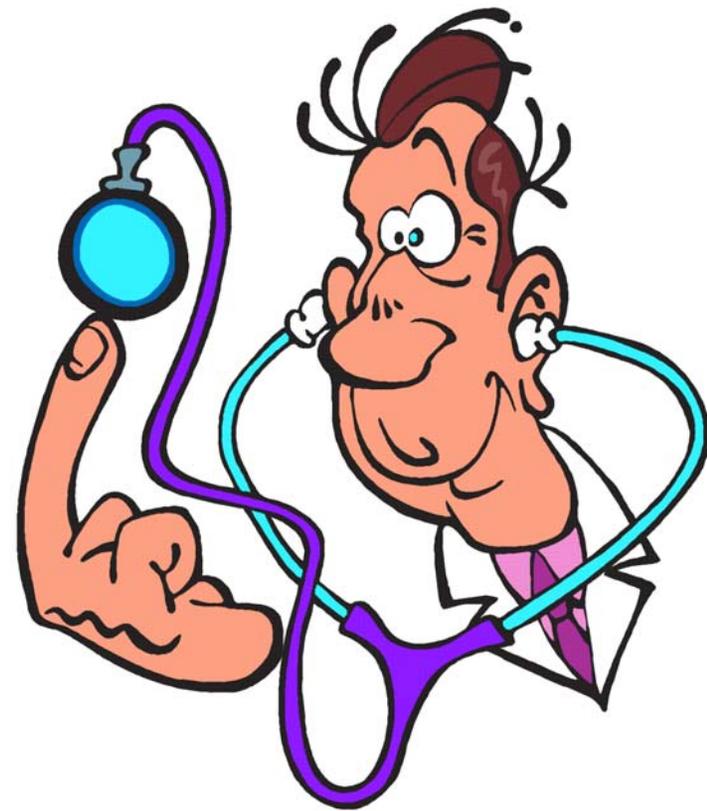
-No competizione

-Densità ottica dir. prop. all'intensità di colore
(relativa solo all'Ab monoclonale specifico)



Applicazioni dell'ELISA in medicina umana

- ✓ diagnosi di infezione da Salmonella, E. Coli, HIV, virus dell'influenza
- ✓ Test di gravidanza
- ✓ Misurazione dei livelli ormonali: LH (tempo di ovulazione), T3, T4, TSH (funzione tiroidea), steroidi anabolizzanti (uso illecito)
- ✓ Rilevazione allergeni o tossine negli alimenti
- ✓ Identificazione droghe: cocaina, oppioidi, principi attivi della marijuana



TEST HIV



Antigeni dell'HIV inattivati,
fissati ad un pozzetto



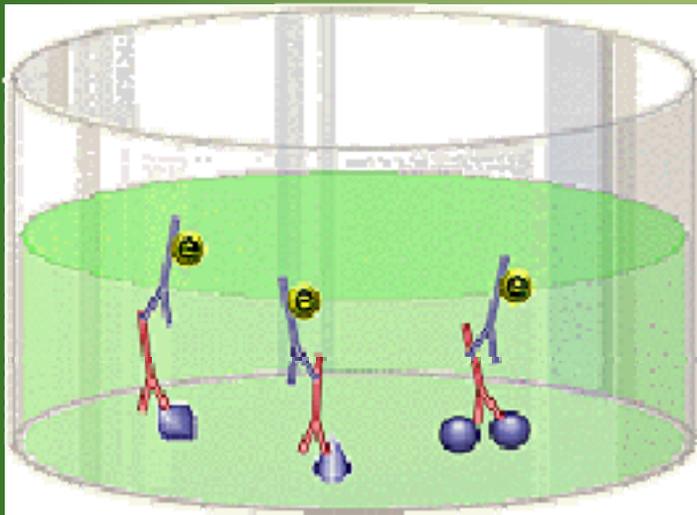
Siero del paziente contenente Abs anti-HIV



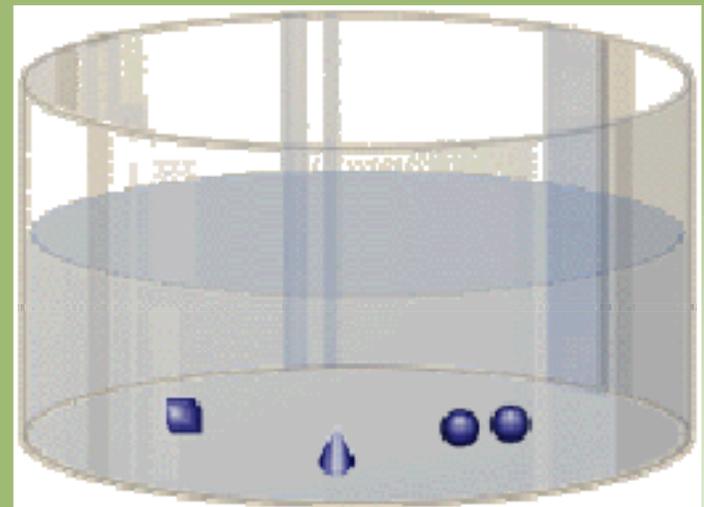
Anti-globuline umane marcate con enzima



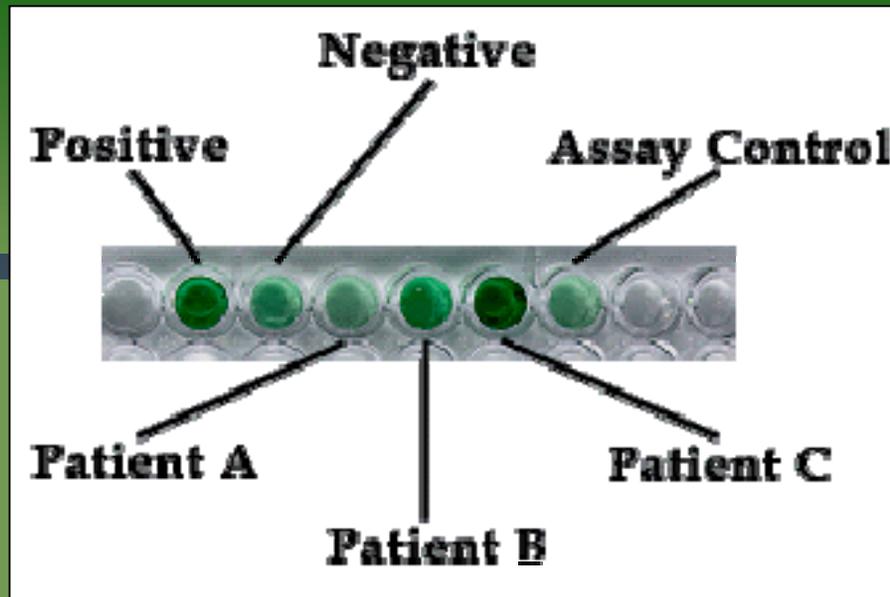
Aggiunta del substrato cromogeno



Test positivo



Test negativo



Positive Control	Negative Control	Patient A	Patient B	Patient C	Assay Control
1.689	0.153	0.055	0.412	1.999	0.123

Valore soglia positivo = 0.500

TEST di GRAVIDANZA

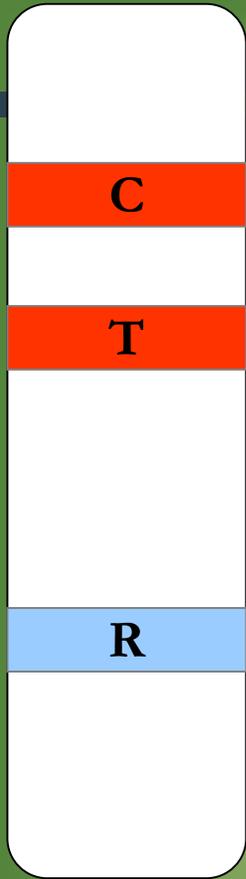


- ✓ Elisa “sandwich”
- ✓ Campione: urina
- ✓ Ag da cercare: hCG
- ✓ Utilizzo di 3 anticorpi

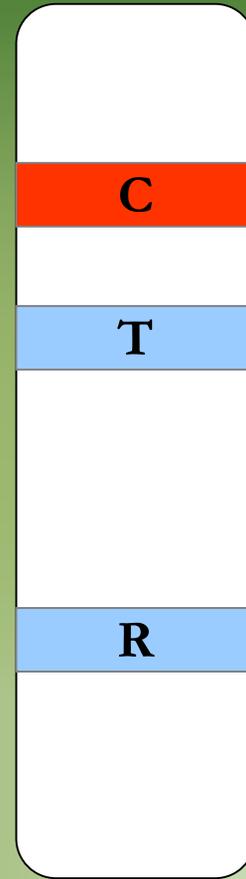
Control zone: anti-Abs di topo
+ substrato cromogeno

Test zone: anticorpi policlonali
immobilizzati anti-hCG +
substrato cromogeno

Reaction zone: anticorpi
monoclonali solubili anti-
hCG, coniugati con enzimi



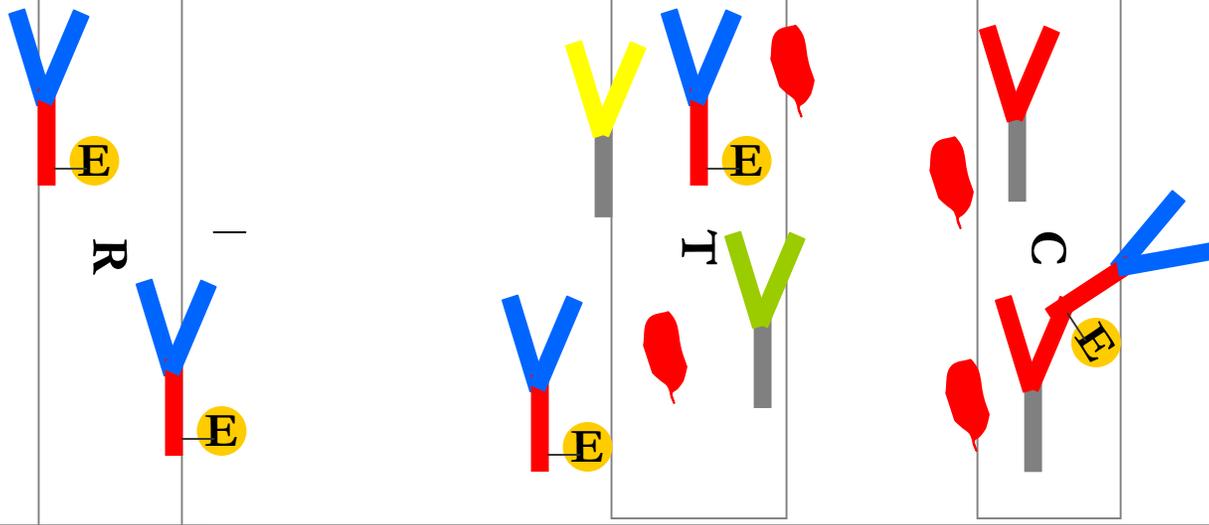
Positivo



Negativo

Negativo

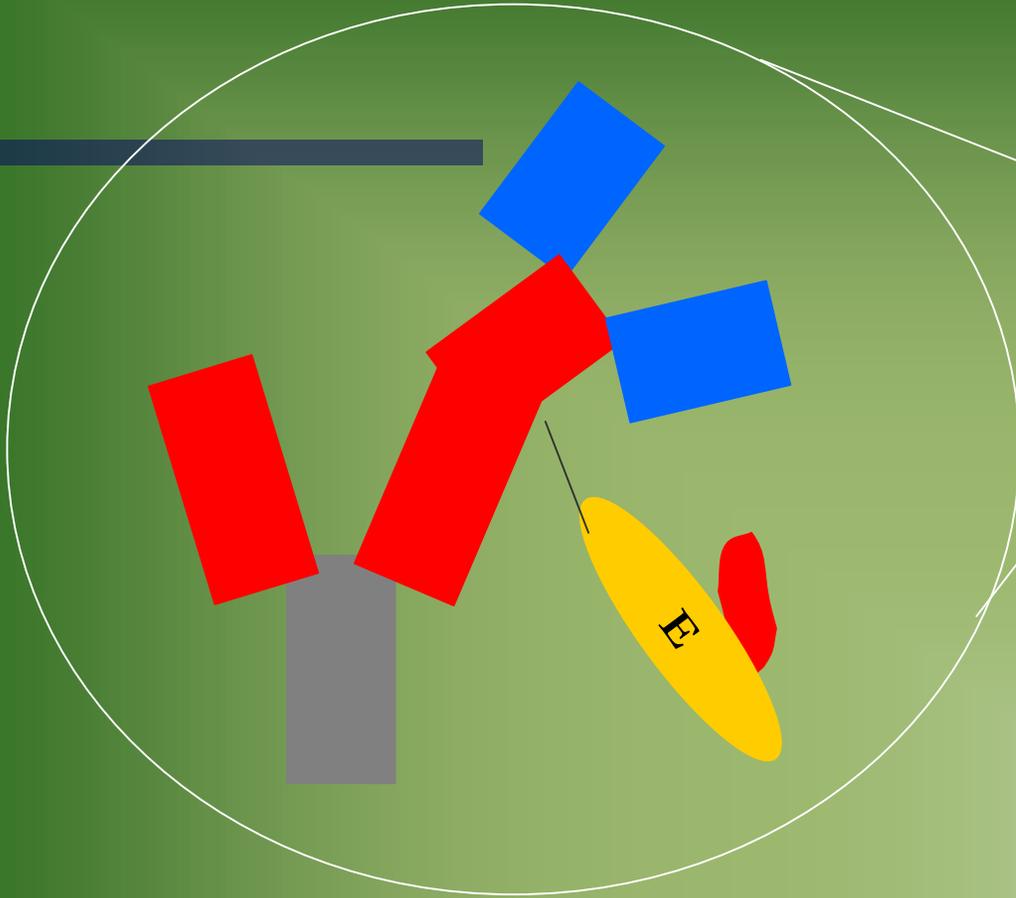
R: Abs M solubili anti-hCG+enzima
T: Abs P immobili anti-hCG+cromogeno
C: anti-IgG topo+cromogeno



Abs monoclonali solubili anti-hCG non legano l'Ag (hCG), si dissolvono e seguono il flusso capillare

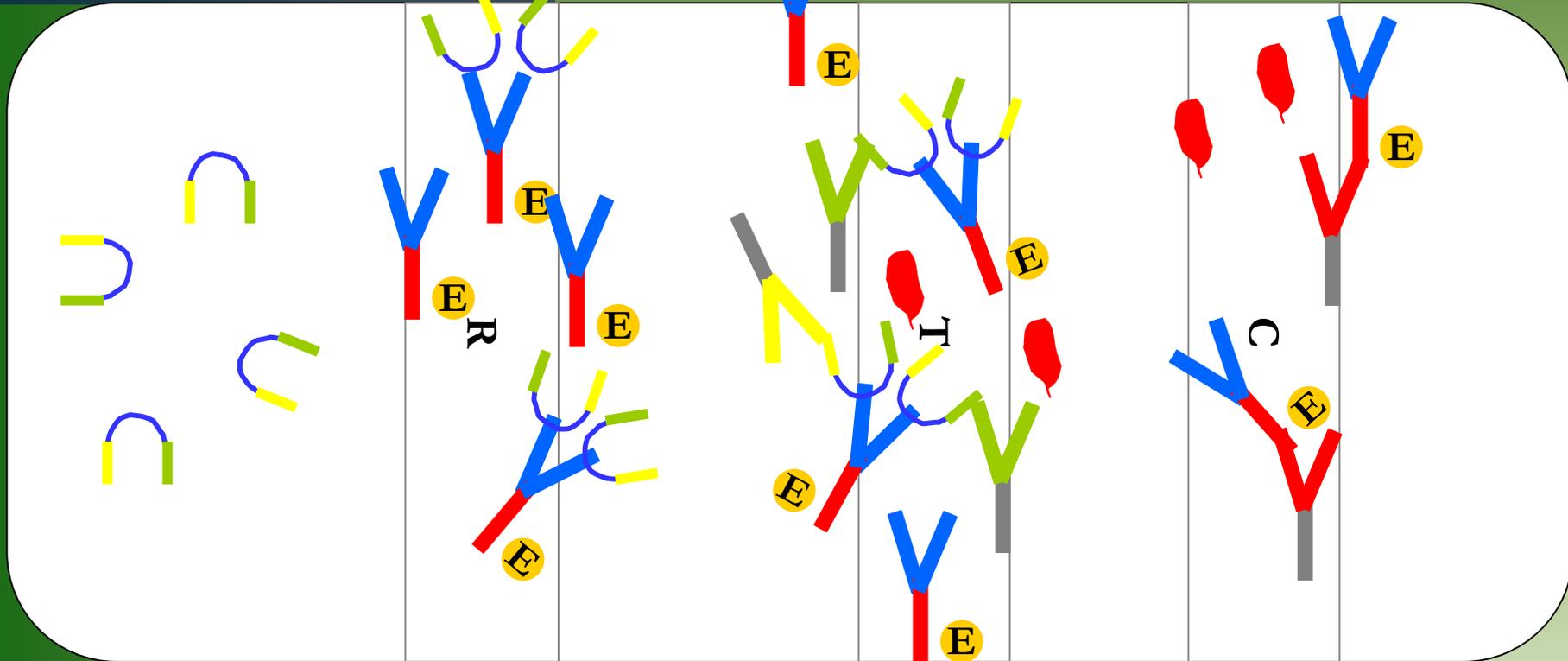
Abs policlonali immobili non legano l'Ag; Abs solubili passano oltre

Monoclonali anti-hCG si legano alle anti-IgG immobili



Positivo

R: Abs M solubili anti-hCG+enzima
T: Abs P immobili anti-hCG+cromogeno
C: anti-IgG topo+cromogeno



Legame hCG ad Abs solubili anti-hCG; i complessi seguono il flusso capillare

Legame di altri epitopi di hCG ad Abs immobili anti-hCG; colorazione

Abs solubili non legati arrivano nella zona C; colorazione

