

ELISA

understanding the **acronym**

- **EL** **E**nzyme-**L**inked
 - An **enzyme's activity** is used as a “reporter” to test for the presence/amount of a protein of interest.
 - The enzymatic reaction will produce a colored species.

ELISA

understanding the acronym

- **EL** Enzyme-linked
 - **IS** Immunosorbent
- An **antibody** or antigen (“immuno”) is **adsorbed** (“sorbent”) onto the polystyrene wells in which we conduct the test.

ELISA

understanding the acronym

- EL Enzyme-linked
- IS Immunosorbent
- A Assay

– We could determine the amount of (**quantitative assay**).

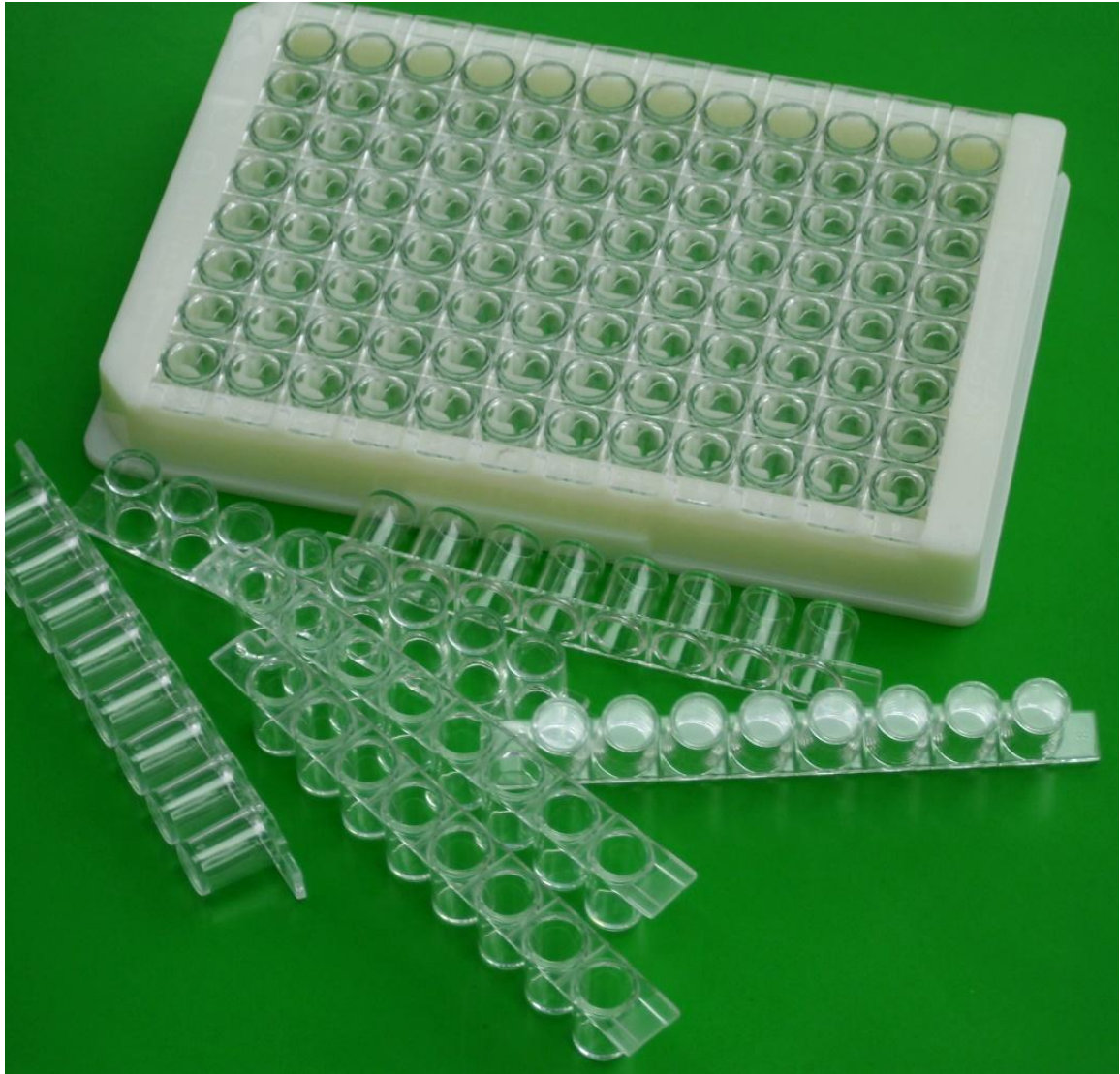
POSSIBILI FORMATI ANALITICI: piastre microtiter



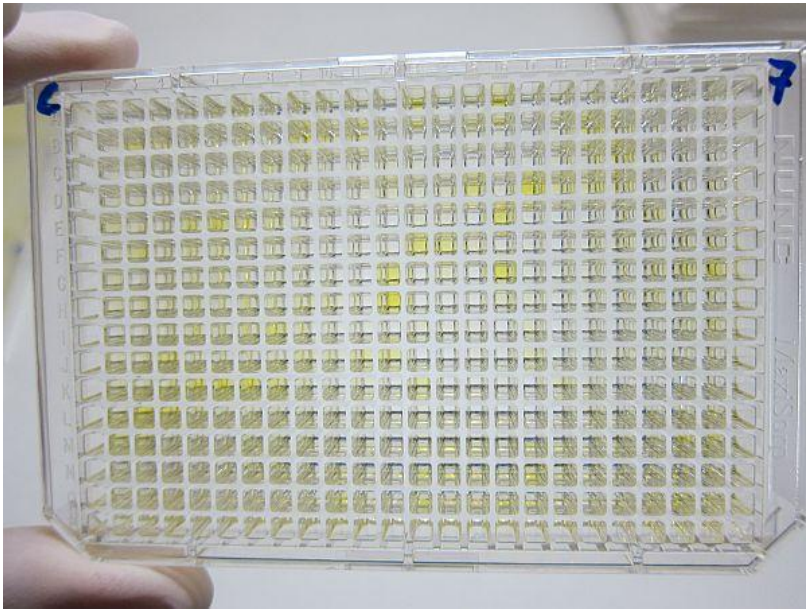
In commercio sono disponibili numerosi kit su **piastra microtiter a 96 pozzetti**, spesso con traccianti enzimatici e rivelazione colorimetrica.

Il kit contiene **la piastra con l'anticorpo immobilizzato e tutti i reagenti pronti all'uso**.

E' necessario disporre di pipette per la dispensazione e di alcune attrezzature (lettore di micropiastre per la misura del segnale ed eventualmente dispensatori, lavatori, ...)

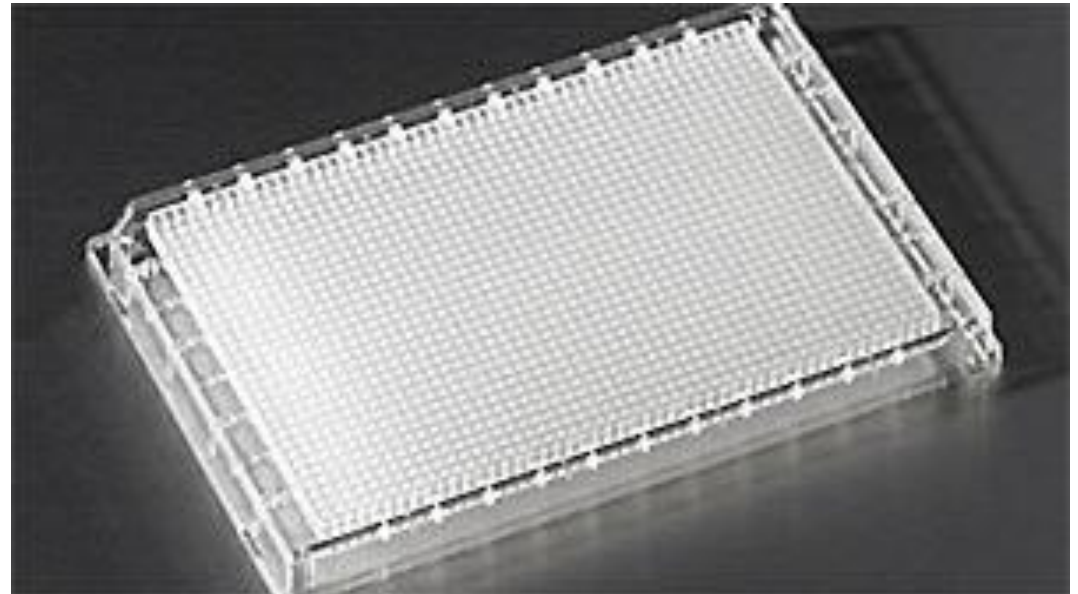




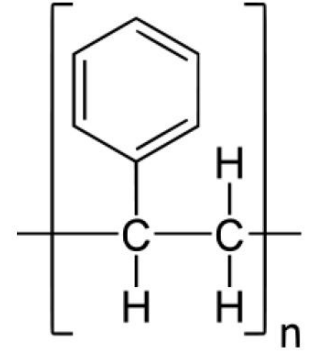


384 wells

1536 wells

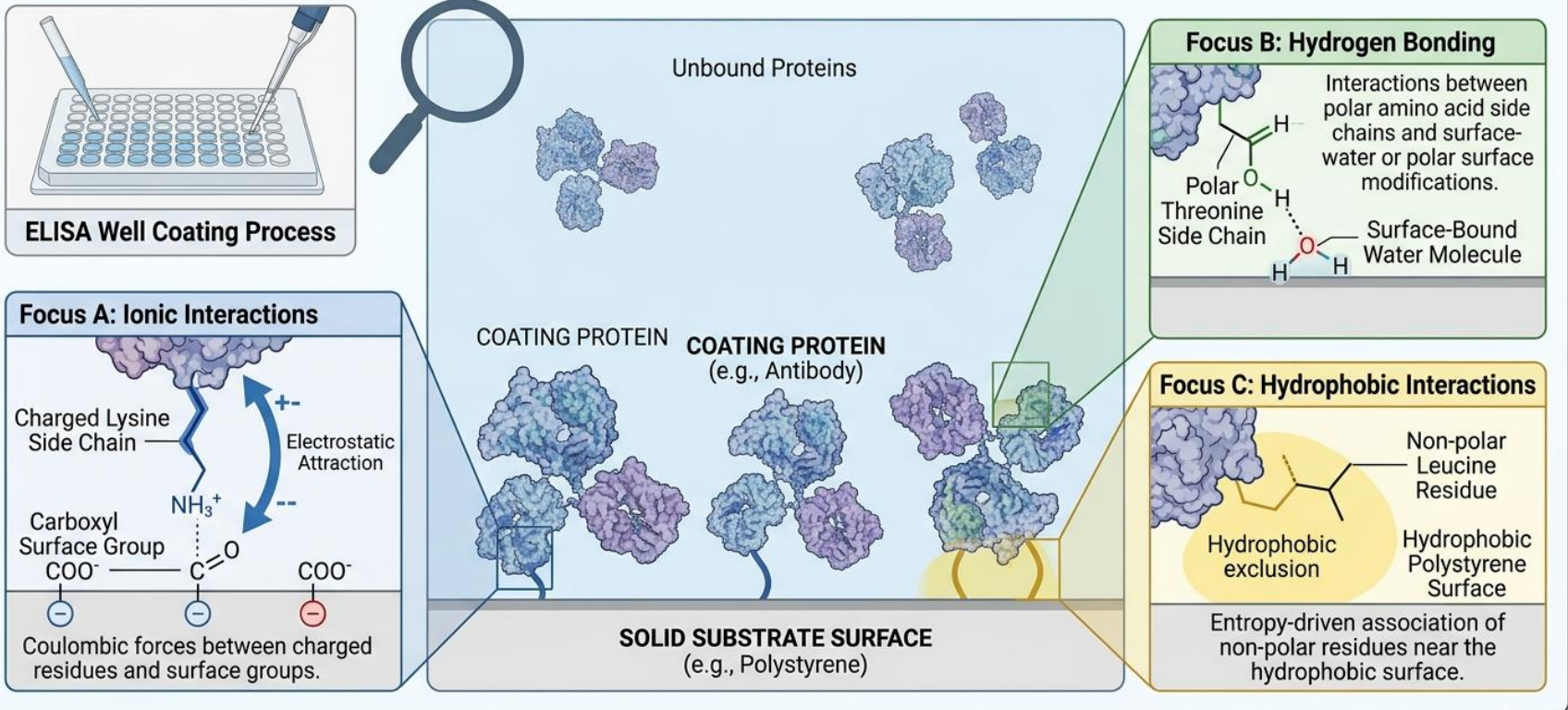


Materiale: **Polistirene**, superficie **idrofobica** low binding. Modificato per irraggiamento o aggiunta di gruppi reattivi (maleimide, hydrazine, N-oxysuccinimide groups).



Pozzetti: 8 righe e 12 colonne - 96 (o 384, o 1536),
2.5 cm² di superficie interna,
350 uL di volume.

MECHANISMS OF PROTEIN COATING ON ELISA SOLID SUBSTRATE



Schematic representation of protein coating on an ELISA well surface, *highlighting multiple* types of molecular interactions including ionic forces, hydrogen bonds, and hydrophobic effects that facilitate adsorption.

Coating maxisorp = **200-500 ng** of protein/well

Buffer

- Carbonate buffer 50 mM pH 9,2
- Tris 10 mM pH 8.5
- PBS Ph 7.2

Tempi (t) e temperatura (T)

Sono i più importanti fattori che controllano la quantità di proteina adsorbita.

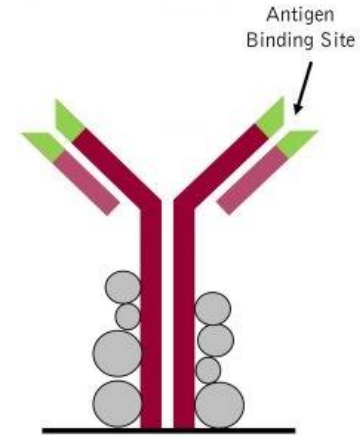
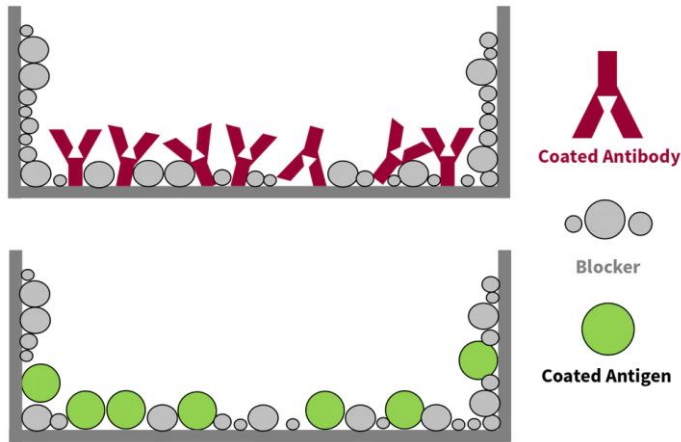
- Massimo adsorbimento a 4°C (camera fredda, frigorifero) per 16-18 h (overnight), minima evaporazione.
 - Velocizzabile a T_{amb} per 4-8 ore.
- Oppure
- A 37°C per 2-4 ore.

Il polistirene non è un buon conduttore di calore.

Sono parametri **sempre** fondamentali in tutte le fasi di un ELISA.

BLOCKING

Fase in cui si limitano i siti idrofobici sulla plastica **NON occupati** da Ab o Antigene



- DETERGENTI

(ionici – Zwitterionici - NON IONICI)

- Distruzione delle interazioni idrofobiche
- eliminati nei lavaggi
- interferiscono nella attività dell'enzima

- PROTEINE

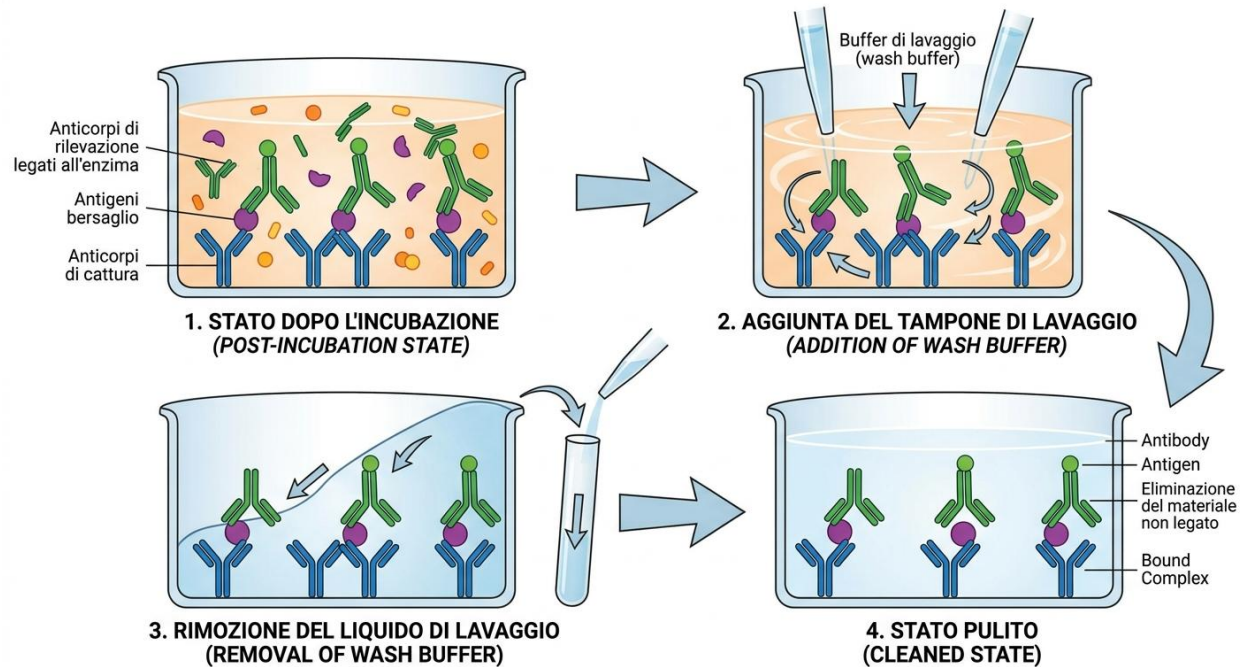
- **LATTE** (in polvere) privo di grassi
- Siero
- albumina
- caseina

ELISA Wash Buffer

- **elimina** le interazioni deboli (segnale di background)

Deve Preservare:

- **la struttura** Ab /ag
- **la funzione** dell'enzima

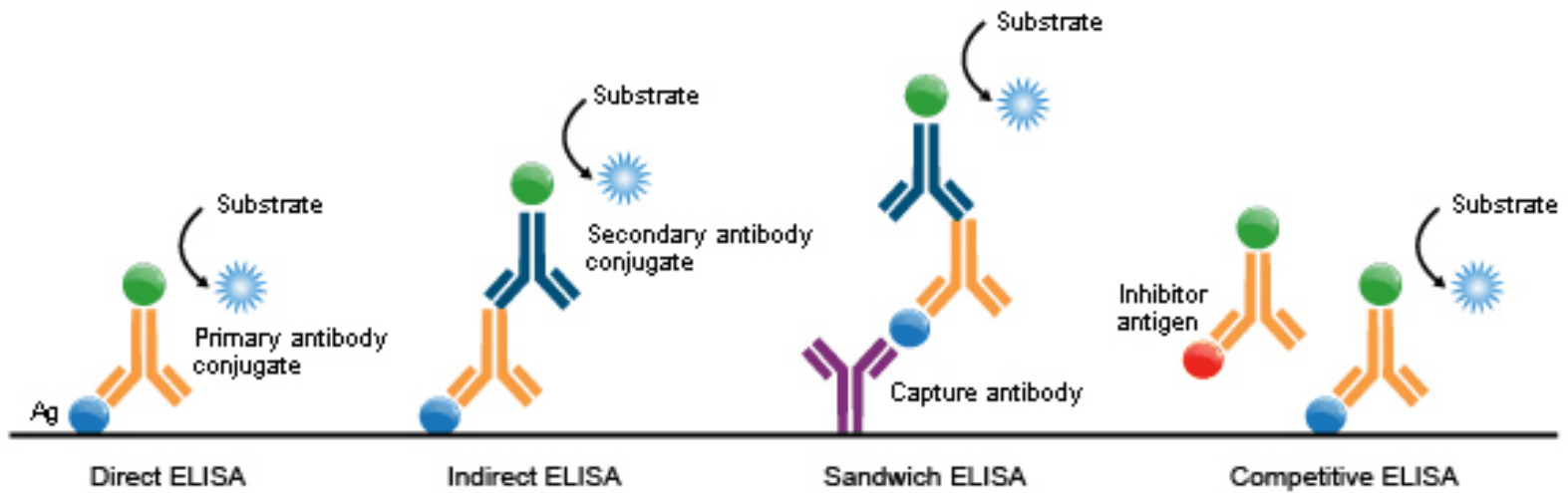


TAMPONI UTILIZZATI

- BASE di **TRIS**,
- **FOSFATI (PBS)**

- **NON DENATURANTI**

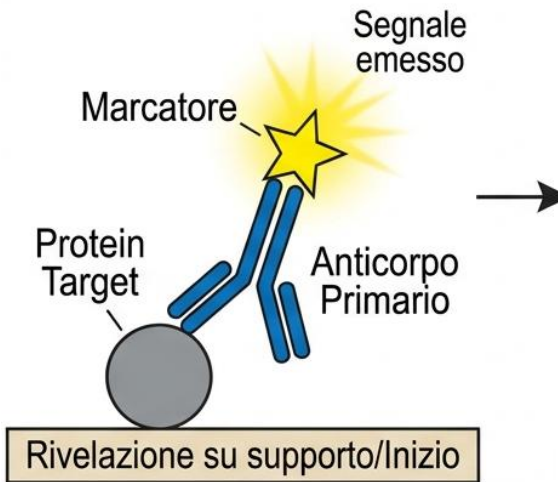
- Con pH vicino alla neutralità
- con una limitata % di detergent NON ionici



<https://www.jove.com/v/10496/elisa-assays-indirect-sandwich-and-competitive?language=Italian>

3 Modi di Rilevazione di un Anticorpo Primario Legato ad un Target

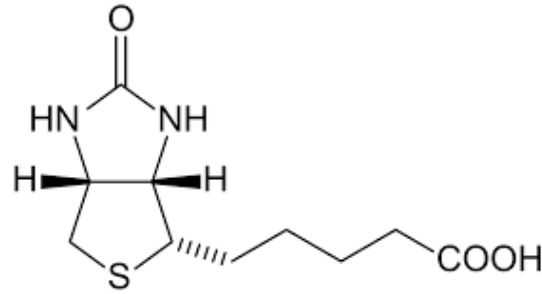
1. Anticorpo Primario Direttamente Marcato



1. Rilevazione Diretta (Direct Detection)

BIOTIN

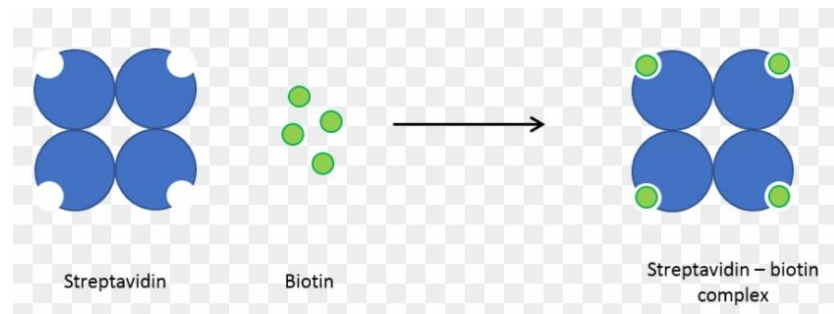
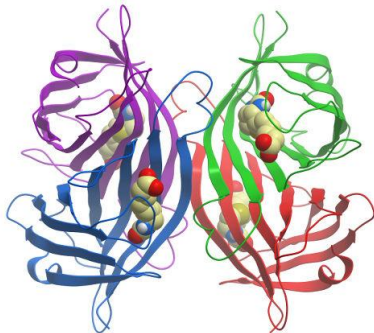
Biotin is a member of the B complex of vitamins.



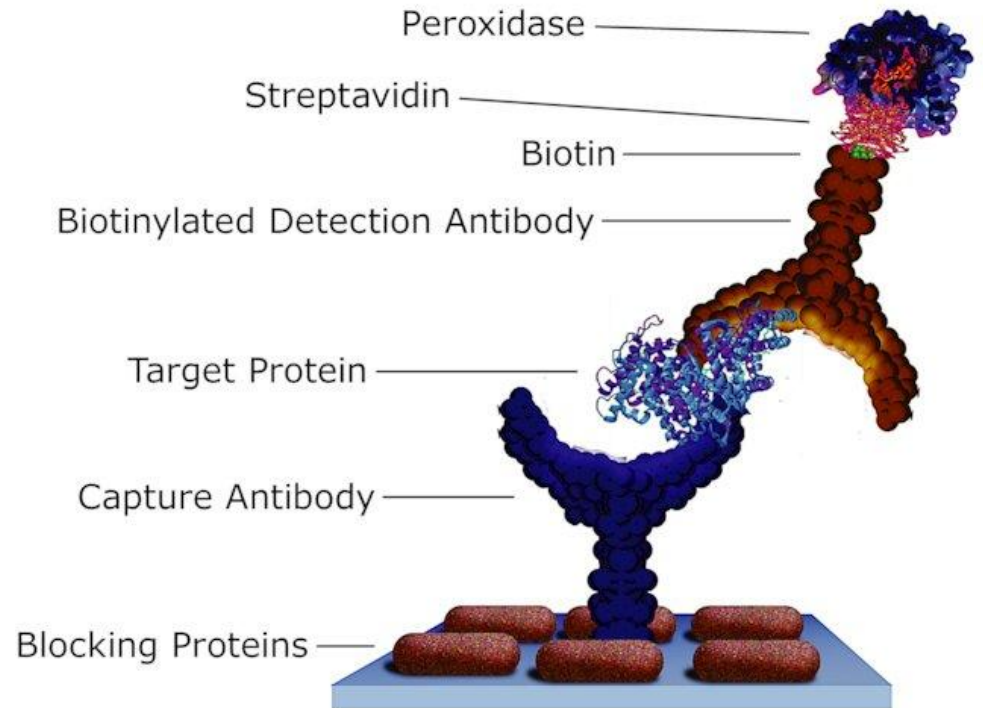
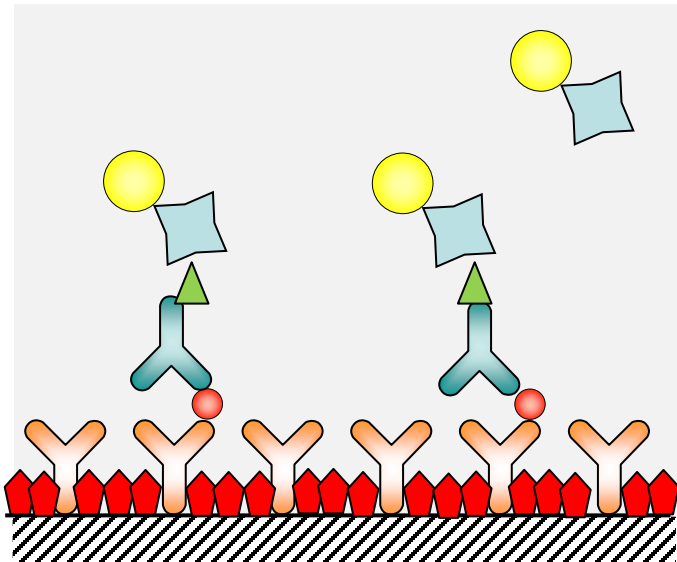
Streptavidin

- is a **tetrameric bacterial protein** isolated from *Streptomyces avidinii*
- It has **4 high-affinity biotin binding sites**.

Affinity is conferred by multiple hydrogen bonds and van der Waals interactions, The result is one of the strongest non-covalent bonds found in nature, with a **femtomolar** dissociation constant (**K_d ~10⁻¹⁵**).

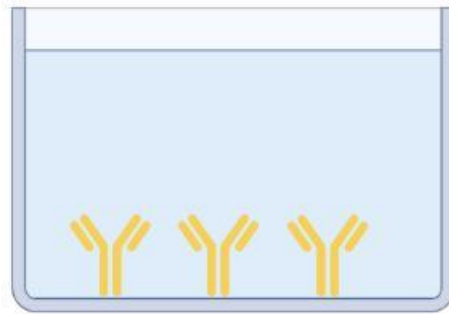


IMMUNODOSAGGI MEDIANTE IL COMPLESSO AVIDINA-BIOTINA

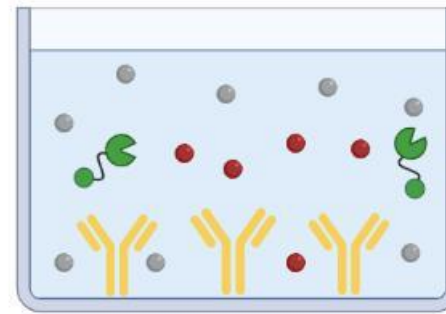


MARCATURA CON IL COMPLESSO AVIDINA-BIOTINA

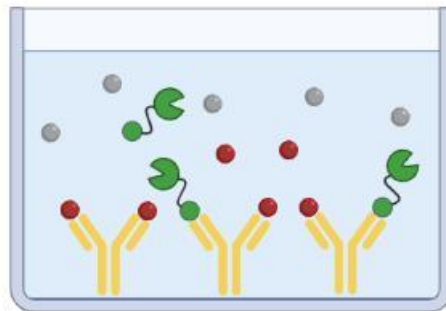
PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO DEI METODI COMPETITIVI



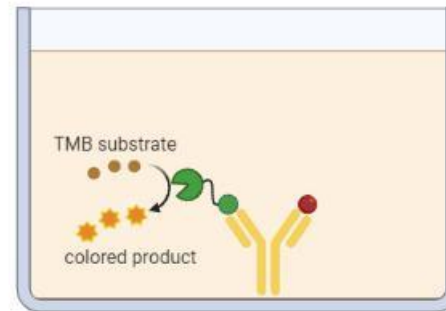
A



B



C



D



Antibody



Target Antigen



Enzyme-Labeled Target Antigen



NonTarget Antigen

METODI COMPETITIVI ETEROGENEI

ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) DIRETTO

Aggiunta del campione

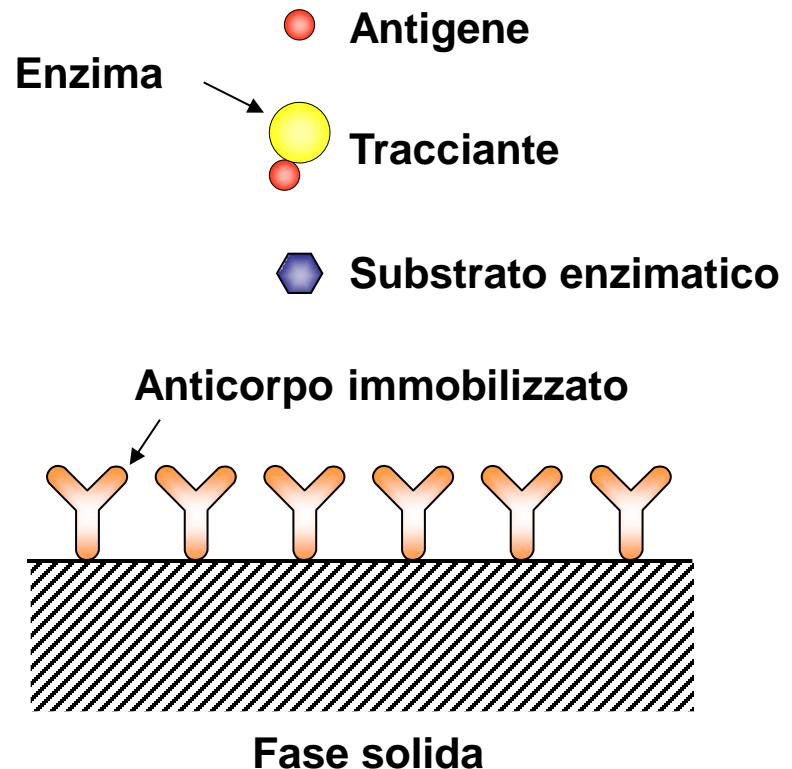
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI COMPETITIVI ETEROGENEI

Aggiunta del campione

SATURAZIONE

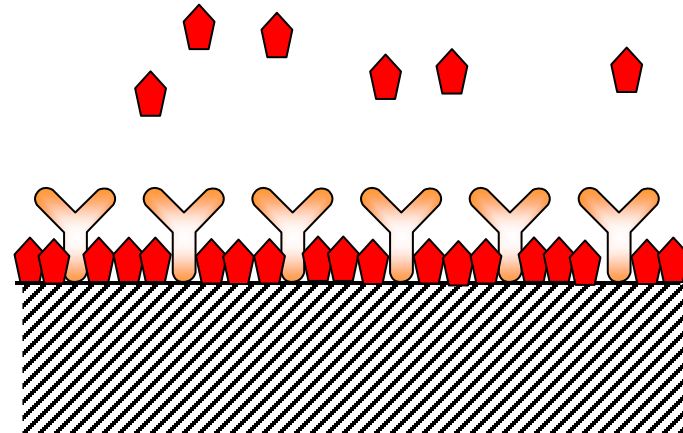
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI COMPETITIVI ETEROGENEI

Aggiunta del campione

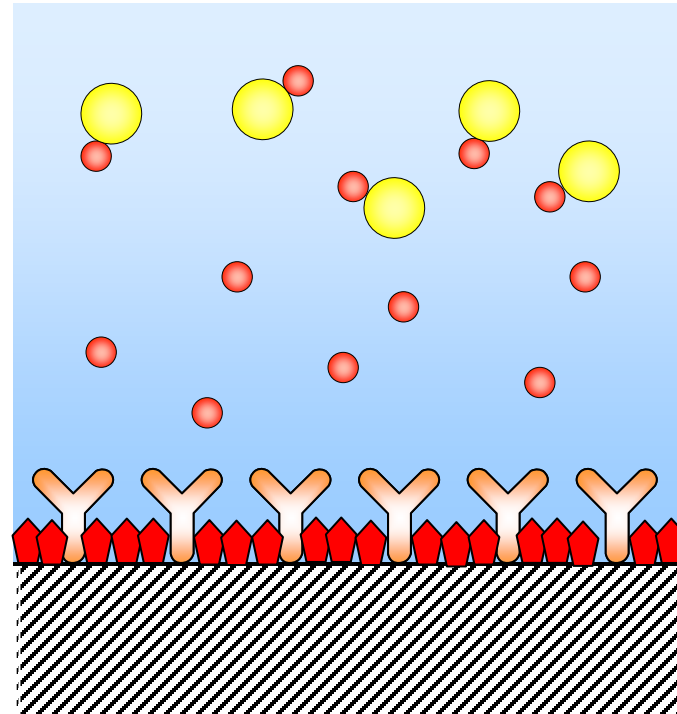
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI COMPETITIVI ETEROGENEI

Aggiunta del campione

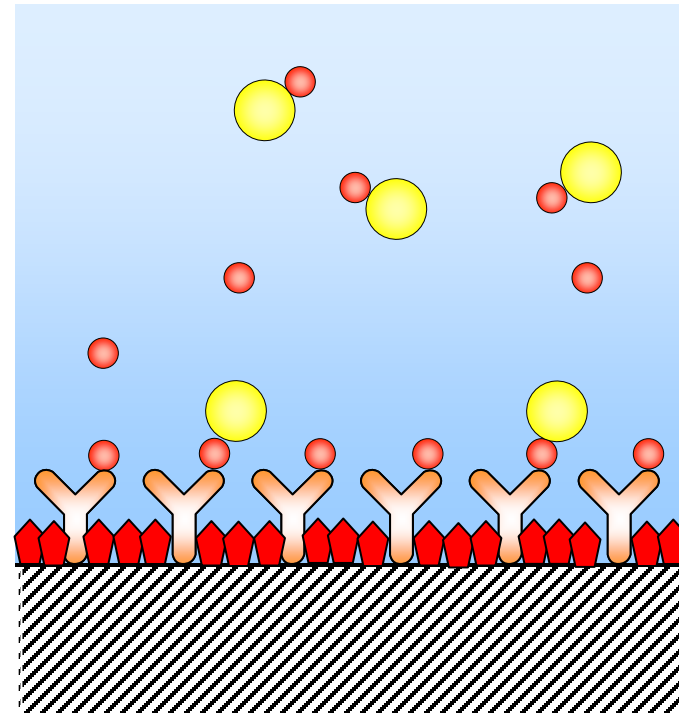
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI COMPETITIVI ETEROGENEI

Aggiunta del campione

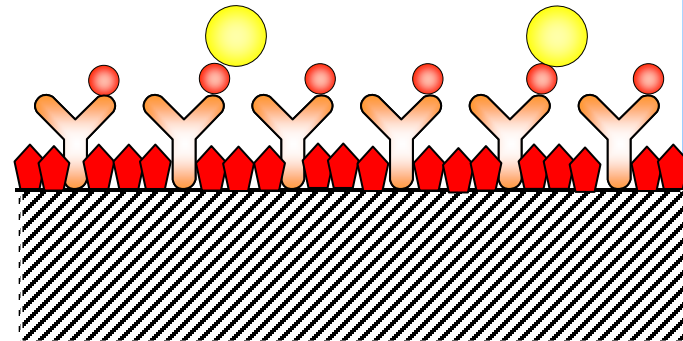
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI COMPETITIVI ETEROGENEI

Aggiunta del campione

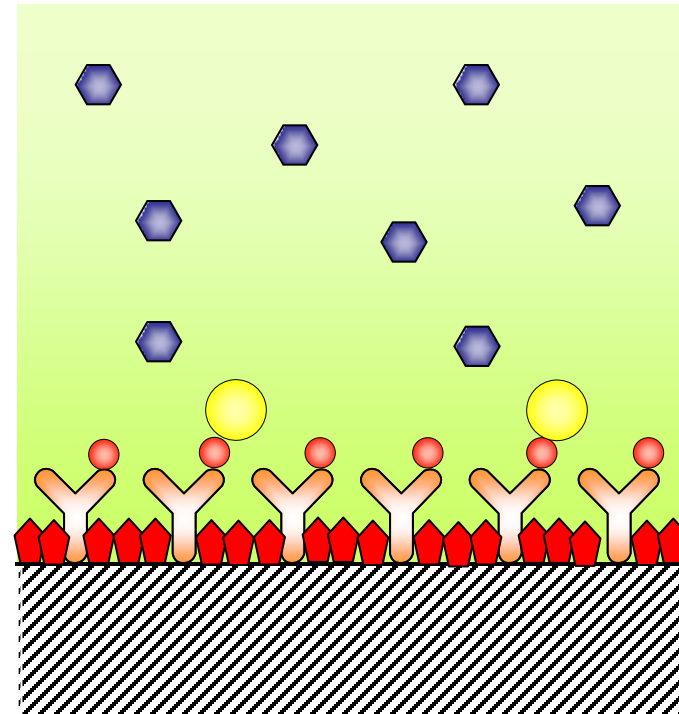
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI COMPETITIVI ETEROGENEI

Aggiunta del campione

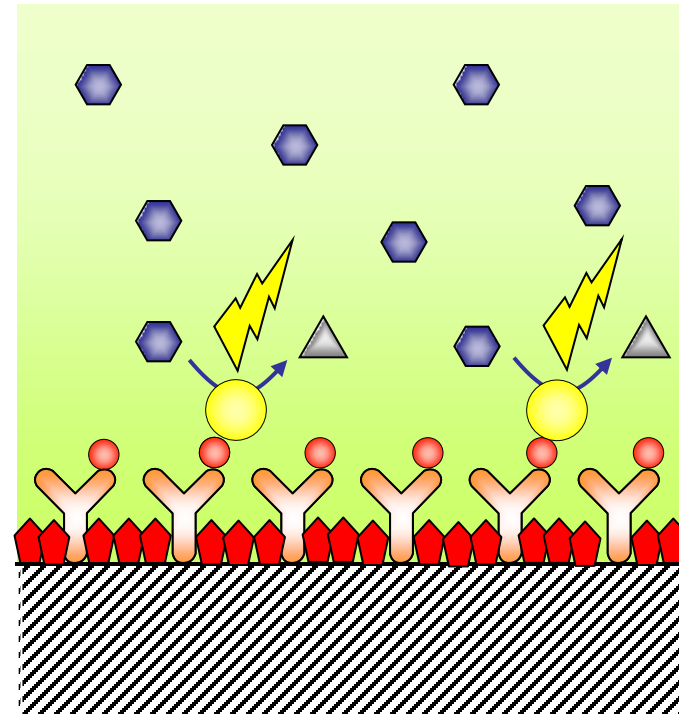
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

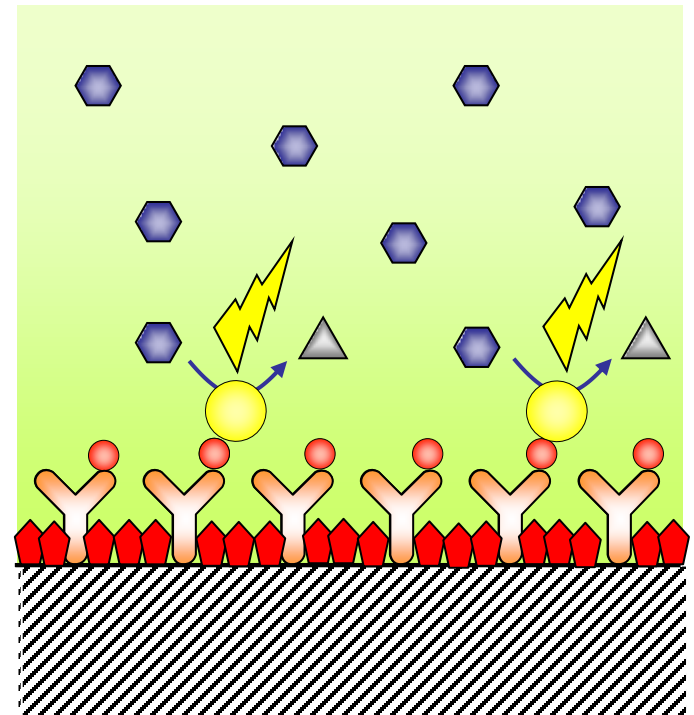
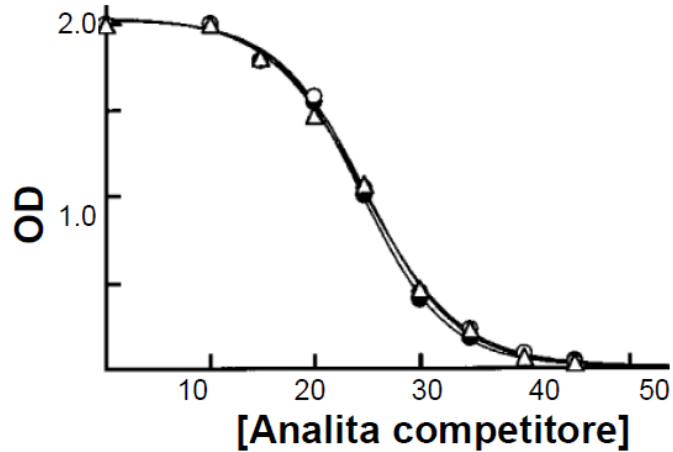
Misura del segnale



PRINCIPIO DI FUNZIONAMENTO DEI METODI COMPETITIVI

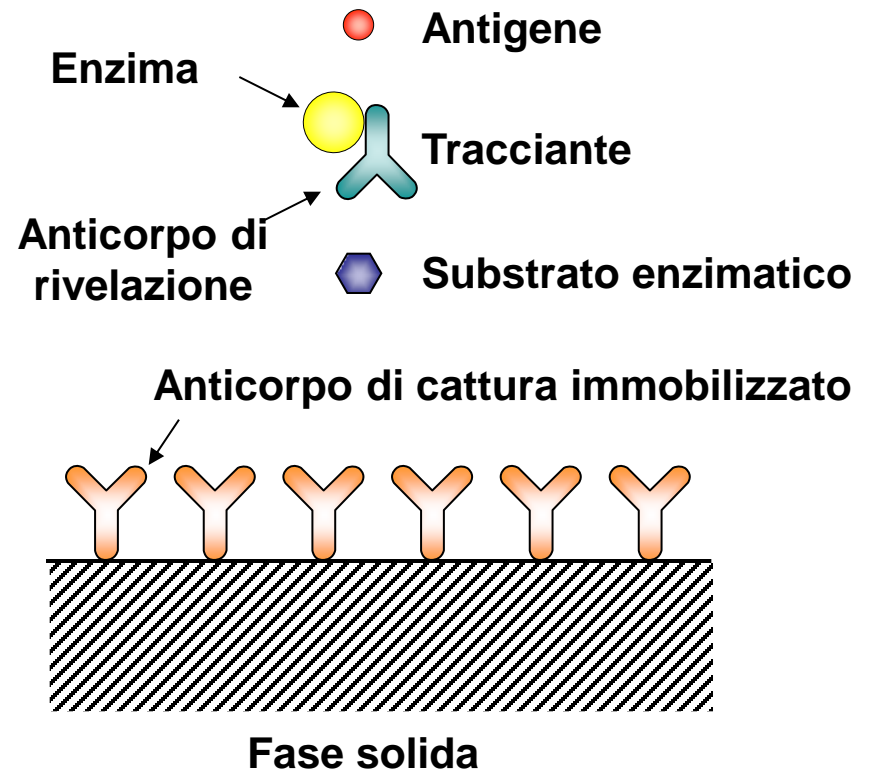
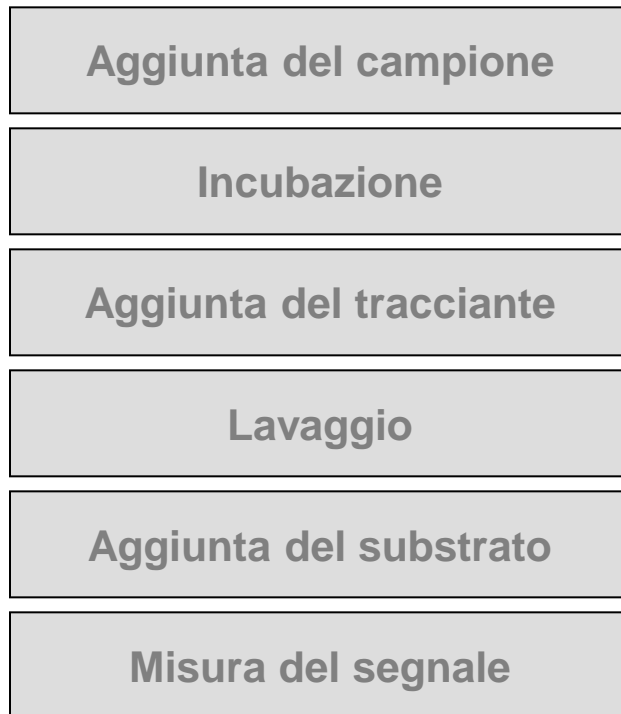
Per i metodi competitivi, il segnale **diminuisce** all'aumentare della concentrazione di analita.

ELISA COMPETITIVO Andamento

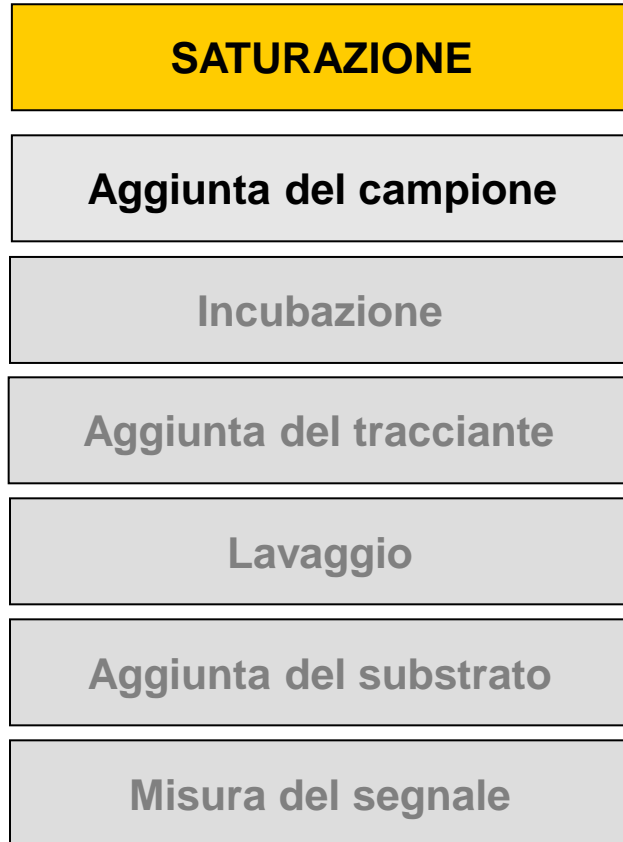


METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

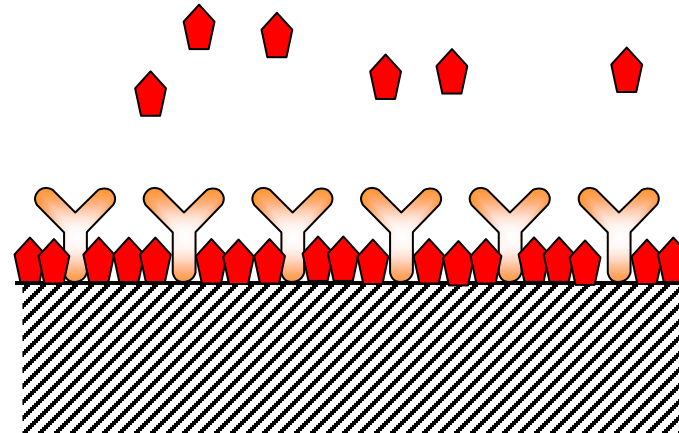
METODO SU FASE SOLIDA "SANDWICH"



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI



METODO SU FASE SOLIDA "SANDWICH"



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO SU FASE SOLIDA "SANDWICH"

Aggiunta del campione

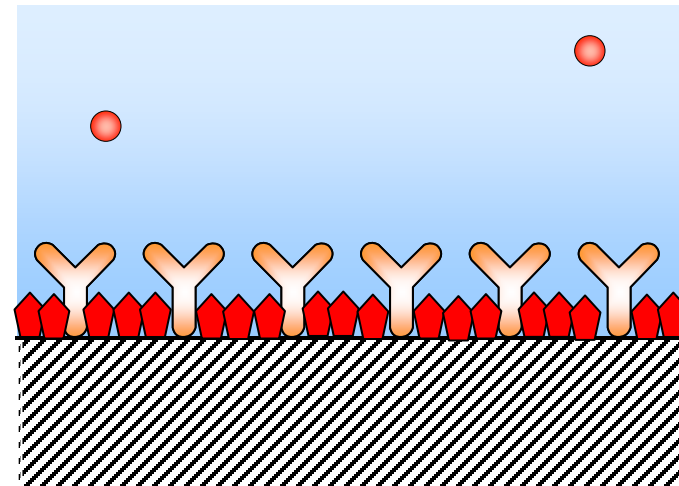
Incubazione

Aggiunta del tracciante

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO SU FASE SOLIDA "SANDWICH"

Aggiunta del campione

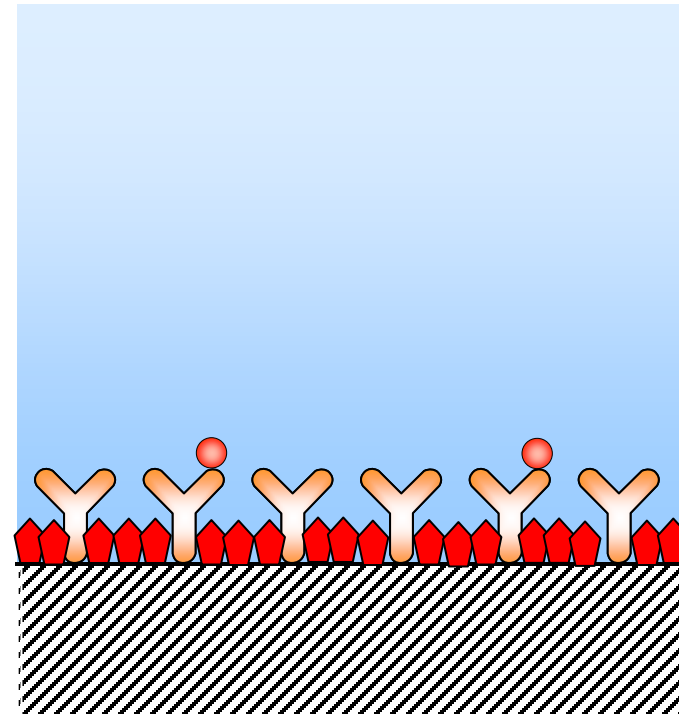
Incubazione

Aggiunta del tracciante

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO SU FASE SOLIDA "SANDWICH"

Aggiunta del campione

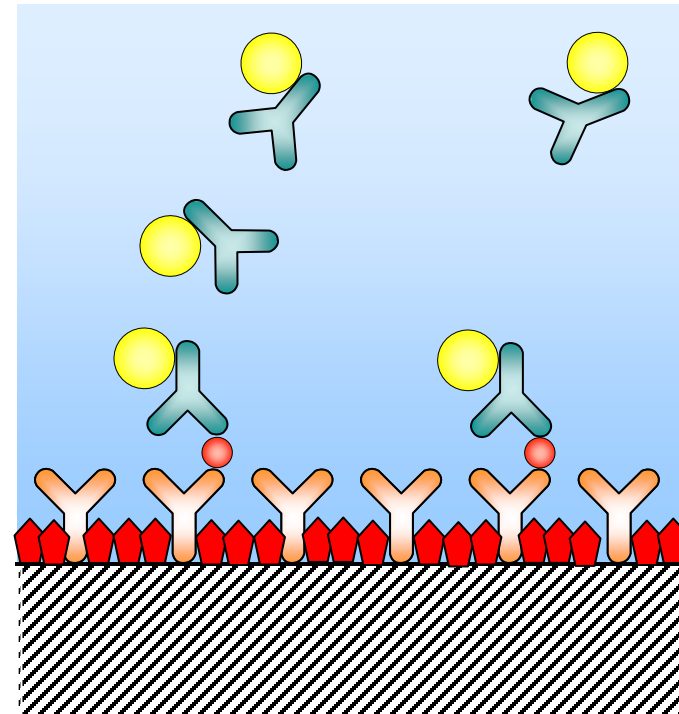
Incubazione

Aggiunta del tracciante

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO SU FASE SOLIDA "SANDWICH"

Aggiunta del campione

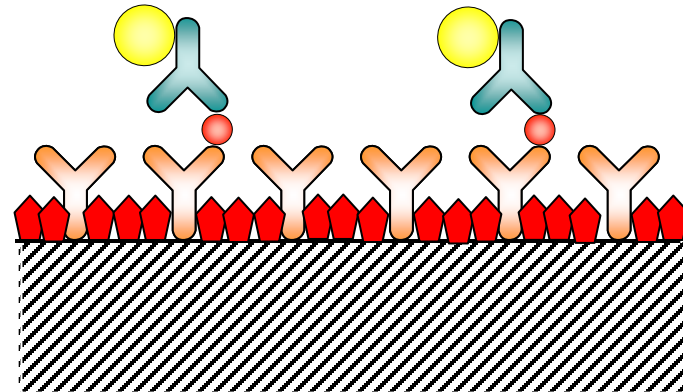
Incubazione

Aggiunta del tracciante

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO SU FASE SOLIDA "SANDWICH"

Aggiunta del campione

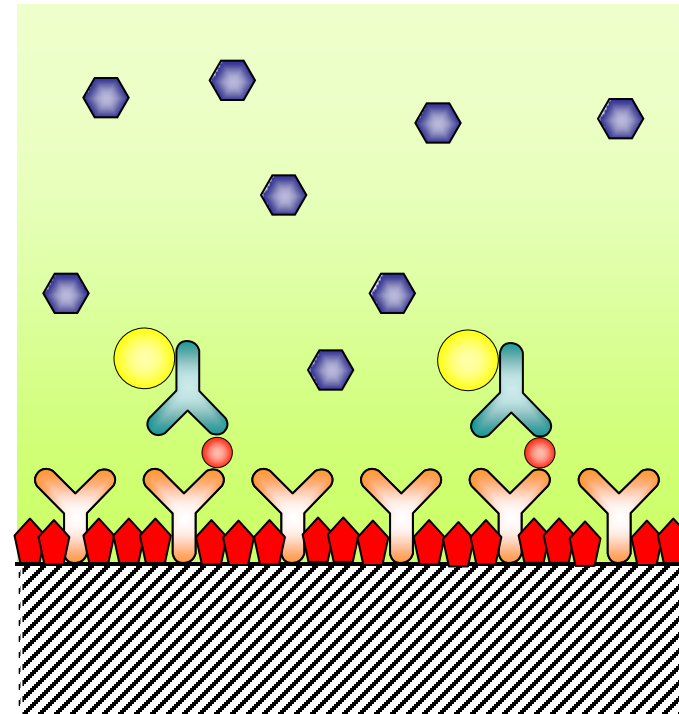
Incubazione

Aggiunta del tracciante

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO SU FASE SOLIDA "SANDWICH"

Aggiunta del campione

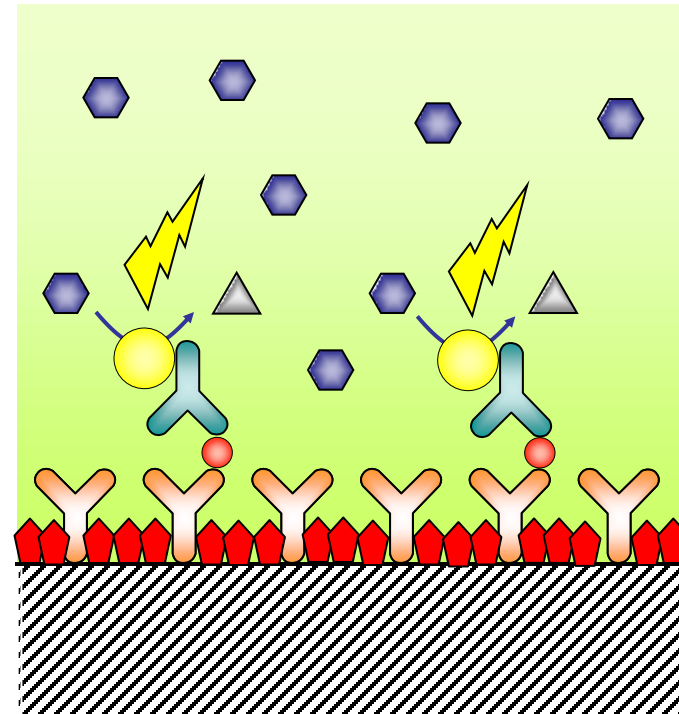
Incubazione

Aggiunta del tracciante

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

Aggiunta del campione

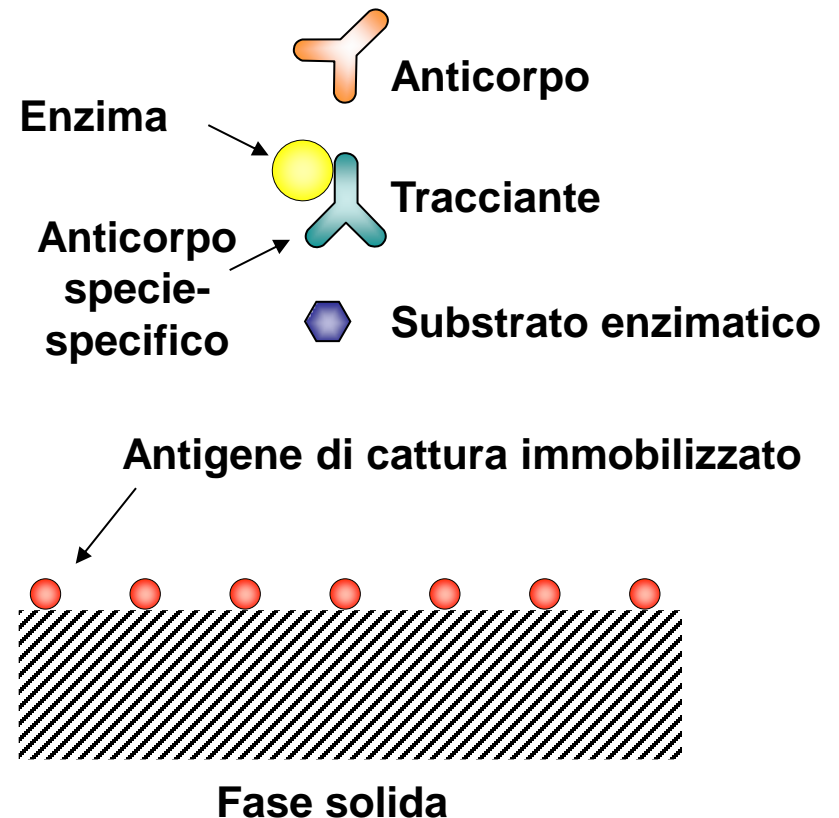
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

Saturazione

Aggiunta del campione

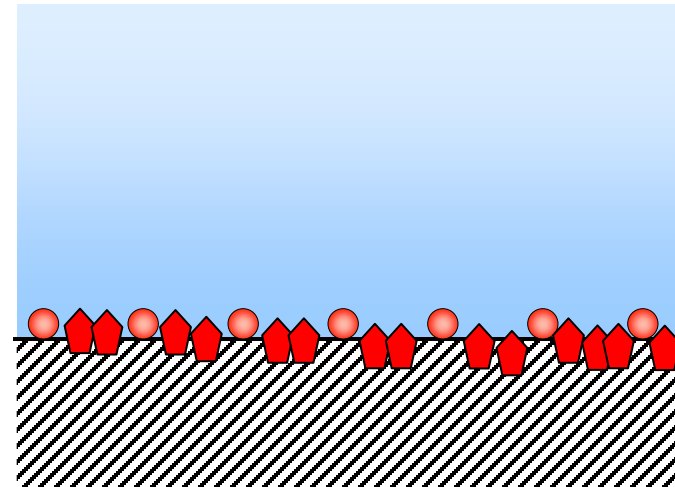
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

Aggiunta del campione

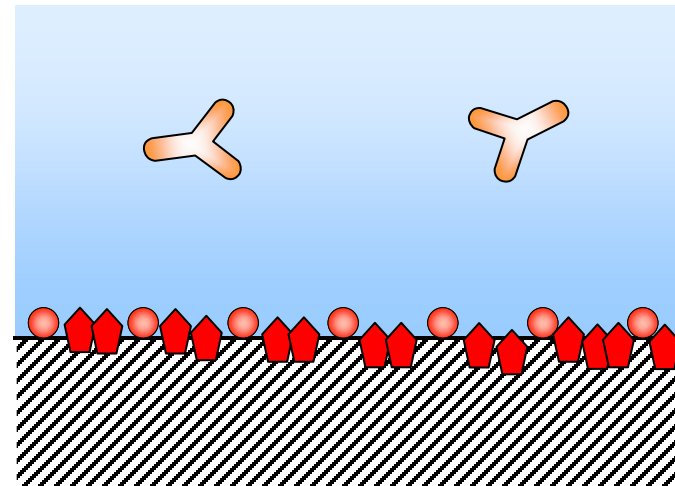
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

Aggiunta del campione

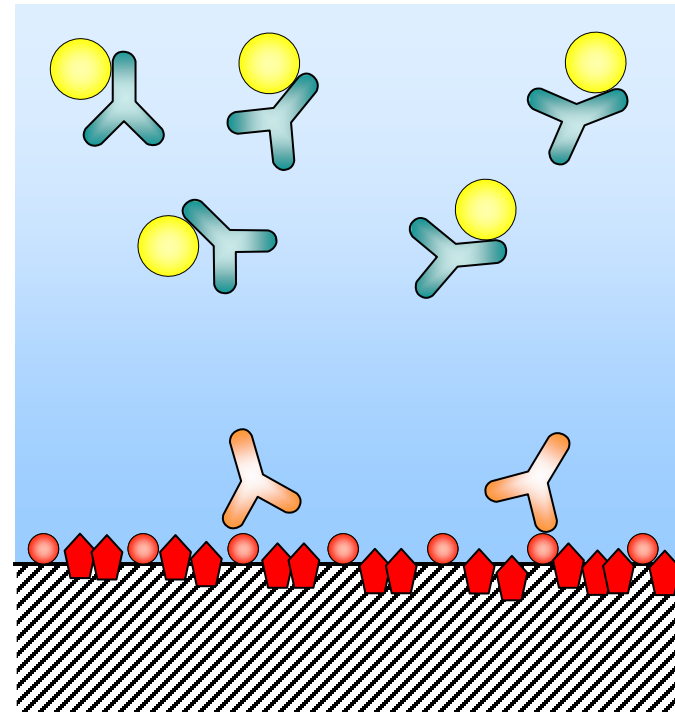
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

Aggiunta del campione

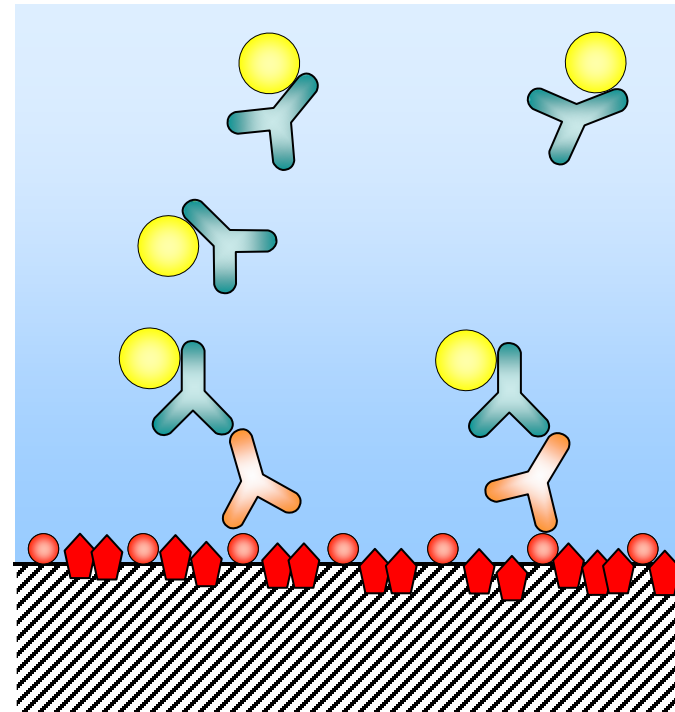
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

Aggiunta del campione

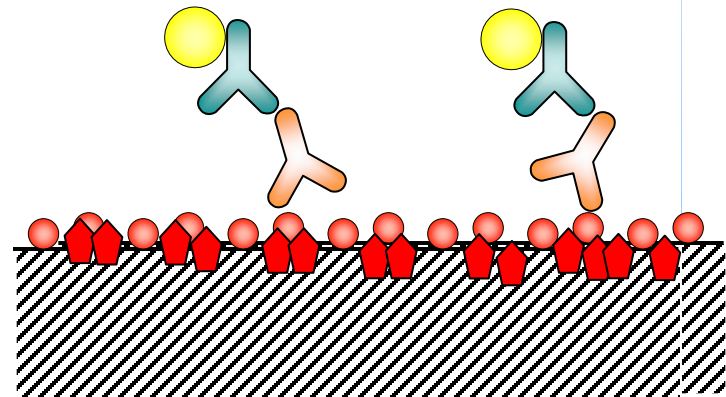
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

Aggiunta del campione

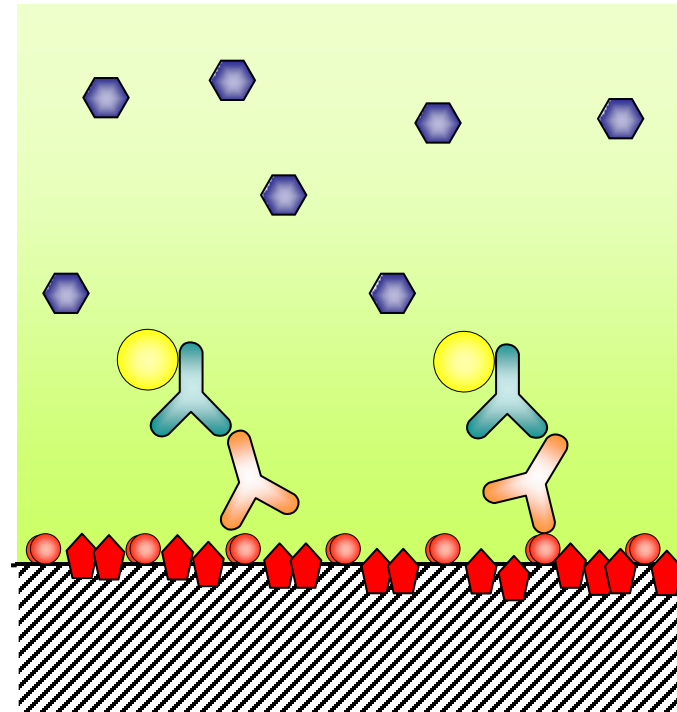
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

Aggiunta del substrato

Misura del segnale



METODI NON COMPETITIVI ETEROGENEI

METODO PER LA DETERMINAZIONE DI ANTICORPI

Aggiunta del campione

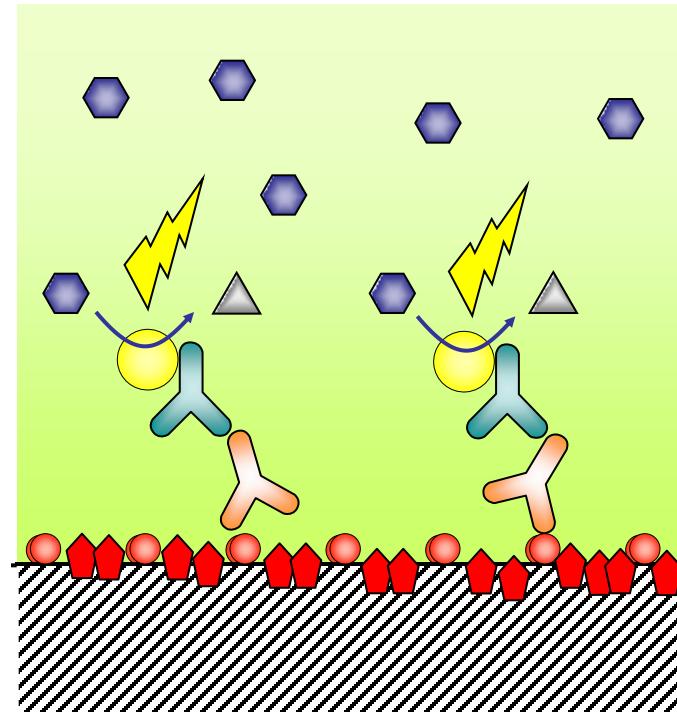
Aggiunta del tracciante

Incubazione

Lavaggio

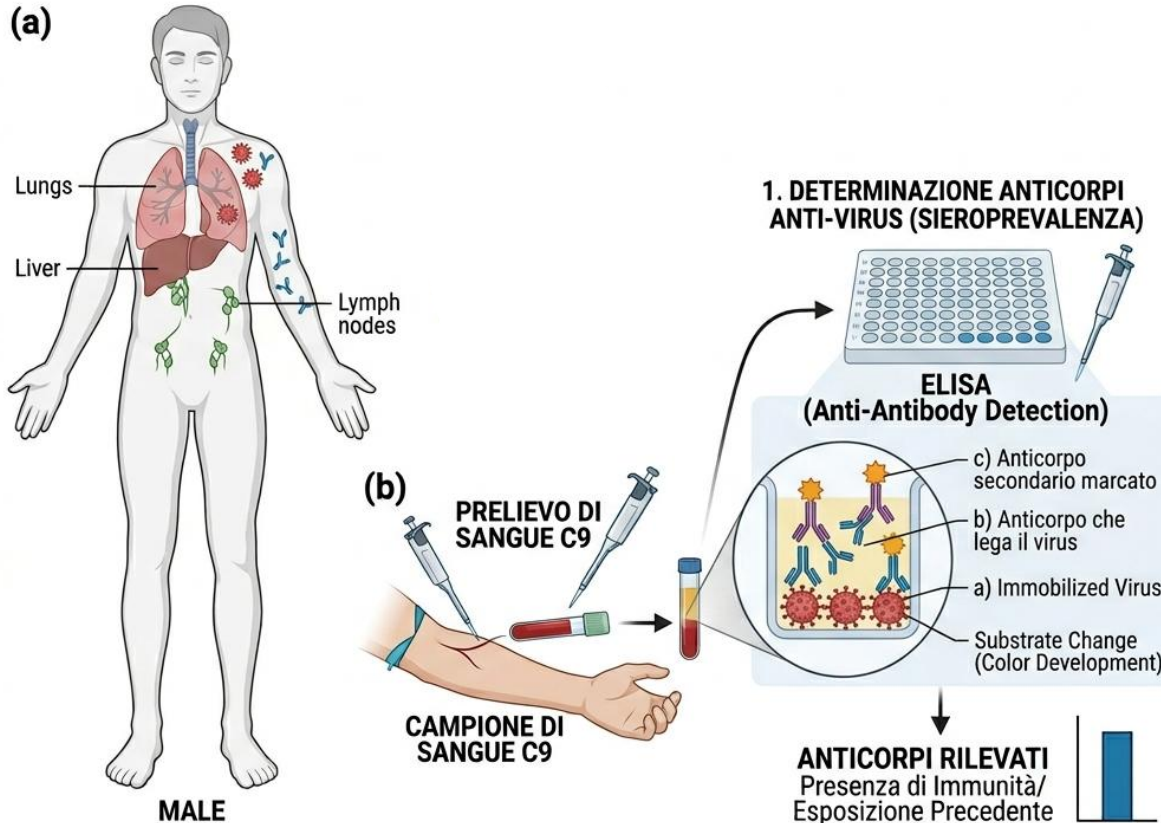
Aggiunta del substrato

Misura del segnale



DIFFERENTIAL DIAGNOSIS: MEASURING VIRUS PRESENCE VS. SEROPREVALENCE OF ANTIBODIES

(a)

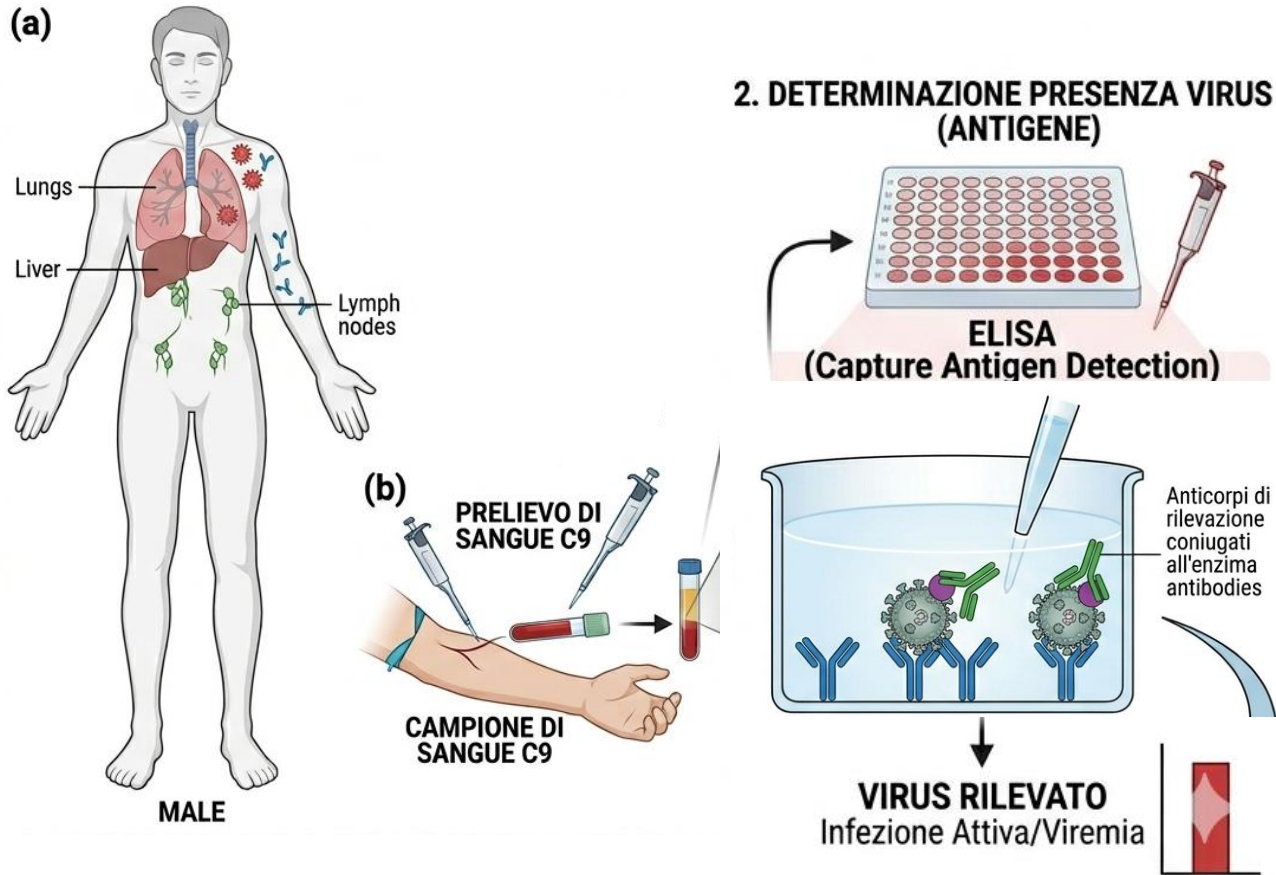


Sieroprevalenza (positività indiretta)

Misura la **presenza di anticorpi nel siero**, prodotti dal sistema immunitario in risposta a un'infezione pregressa o a una vaccinazione.

- Indica che il soggetto è stato esposto al virus in passato
- Il virus non è necessariamente più presente nell'organismo

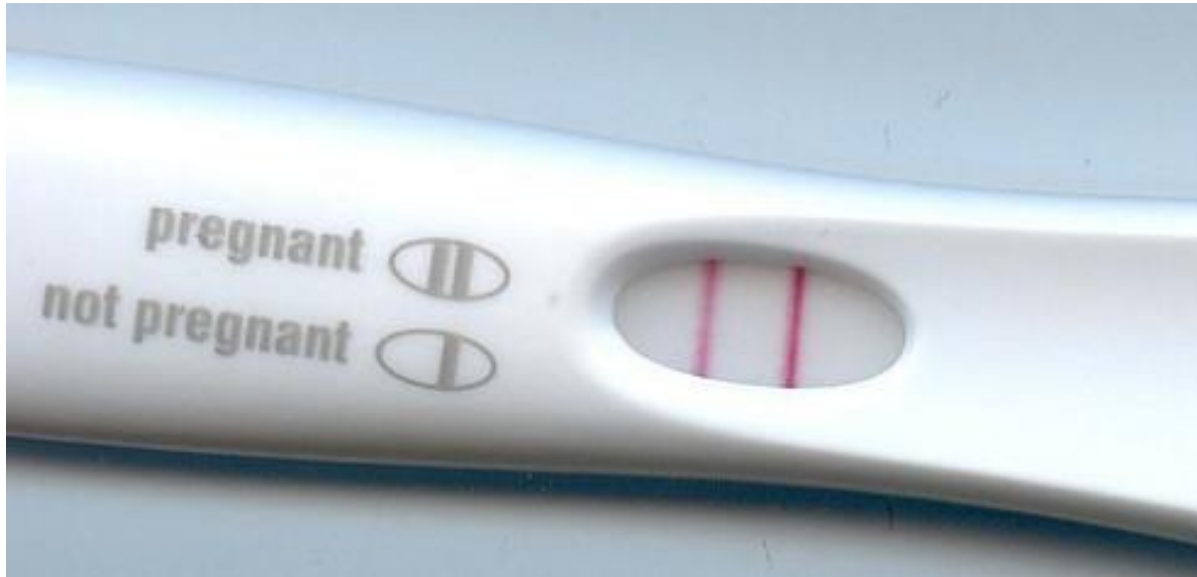
DIFFERENTIAL DIAGNOSIS: MEASURING VIRUS PRESENCE VS. SEROPREVALENCE OF ANTIBODIES



Prevalenza di positività virale/batterica (diretta)

Misura la presenza del virus (batteri) stesso nell'organismo, tramite rilevamento del suo materiale genetico o di componenti strutturali.

- Indica un'infezione attiva o recente
- Il soggetto è potenzialmente infettivo
- Riflette la situazione in quel preciso replicante (o sue tracce recenti) nelle vie respiratorie.



The global pregnancy detection kits market size was valued at **USD 1.7 billion** in 2024 and is expected to reach USD 2.9 billion in 2034, growing at a CAGR of 5.4% from 2025 to 2034.

Pregnancy tests are medical instruments that help determine the pregnancy by checking for **human chorionic gonadotropin (hCG) hormone in a blood or urine sample.**

These kits are effective and provide results within minutes especially without the need for personnel.



HOME, NEWS

DrugWipe 6 S: Wider range of drugs detected in 5 minutes

■ 8. April 2025

DISPOSITIVI LATERAL FLOW

I **dispositivi lateral flow** (LFD), spesso denominati “**strip**”, sono metodi analitici immunocromatografici.

I **reagenti** si trovano normalmente **incorporati nel dispositivo**, rendendo le strip idonee per **un’analisi da campo**, grazie alla loro praticità d’uso da parte di chiunque e in qualunque situazione.

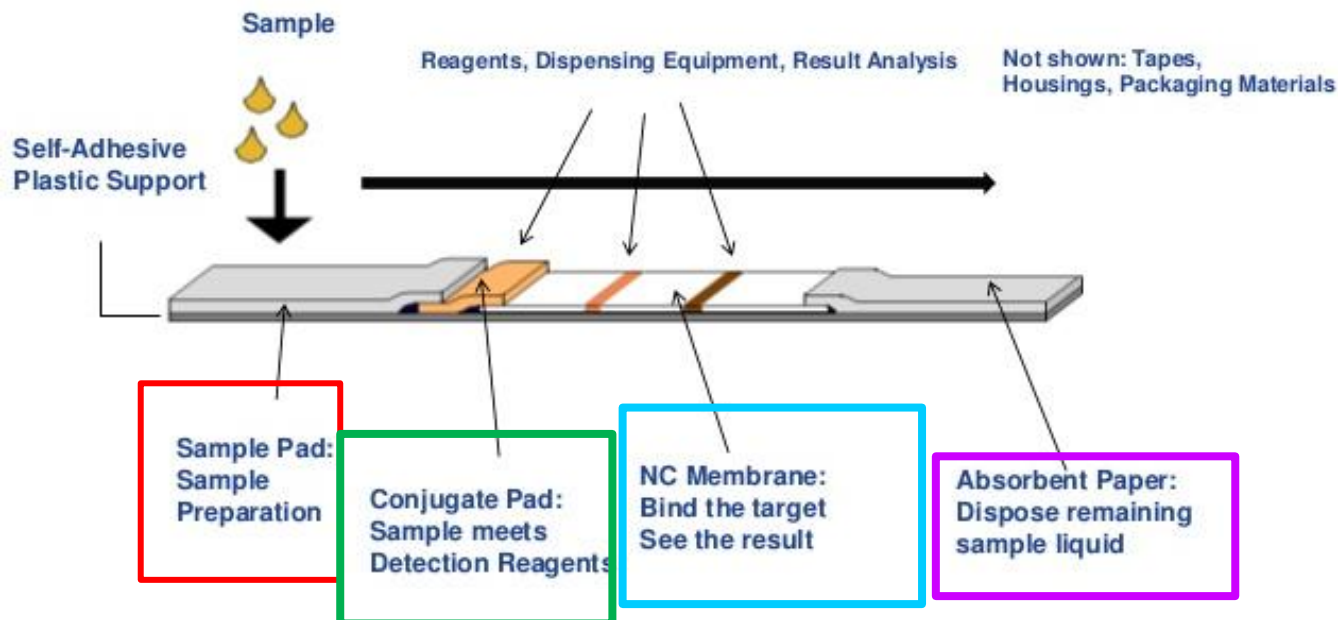
Sono spesso **meno precisi di altre metodiche di screening** basate su saggi immunologici come gli ELISA, ma possono essere sufficientemente sensibili, quantitativi ed accurati quando appoggiati ad un sistema di lettura strumentale



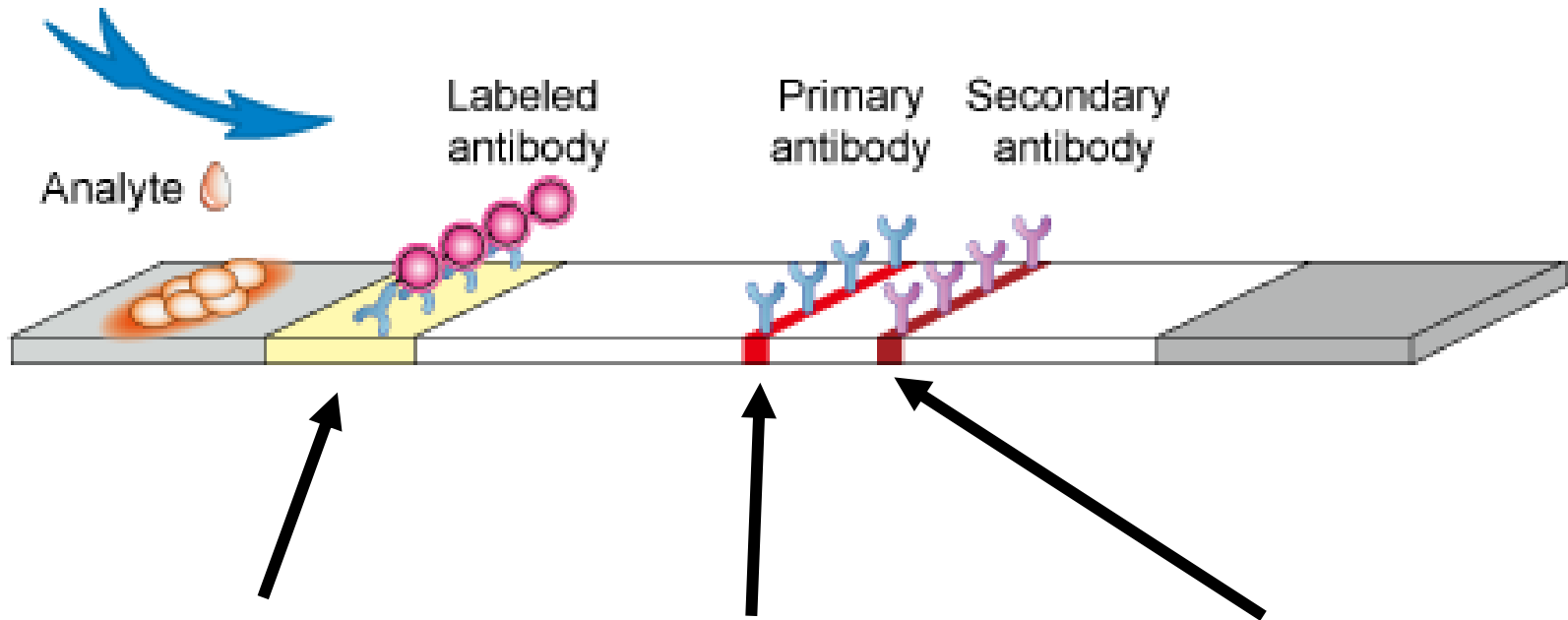
Un tipico **LFD** è formato da

- un **sample pad** dove viene depositato **il campione**
- un **conjugate pad** in cui sono presenti **reagenti**
- una **membrana** dove avviene la reazione di legame del saggio sul quale ci sono due siti attivi, uno per il **test** e uno di **controllo**,
- ed infine da un **absorbent pad** responsabile del direzionamento del flusso attraverso la membrana.

The Typical Rapid Test: A Lateral Flow Device



Lateral flow test, IMMUNOSTRIP

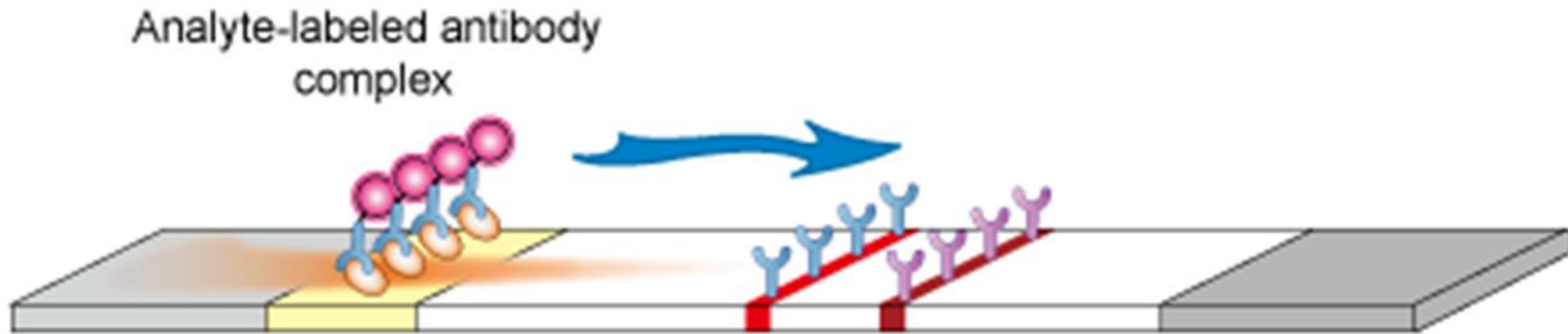


Conjugated pad
Antibodies **anti-antigen** conjugated
(gold, latex, Fluorophore etc)

Test line.
Antibodies **anti-antigen**
adsorbed

Control line.
Antibodies **anti-IgG**
adsorbed

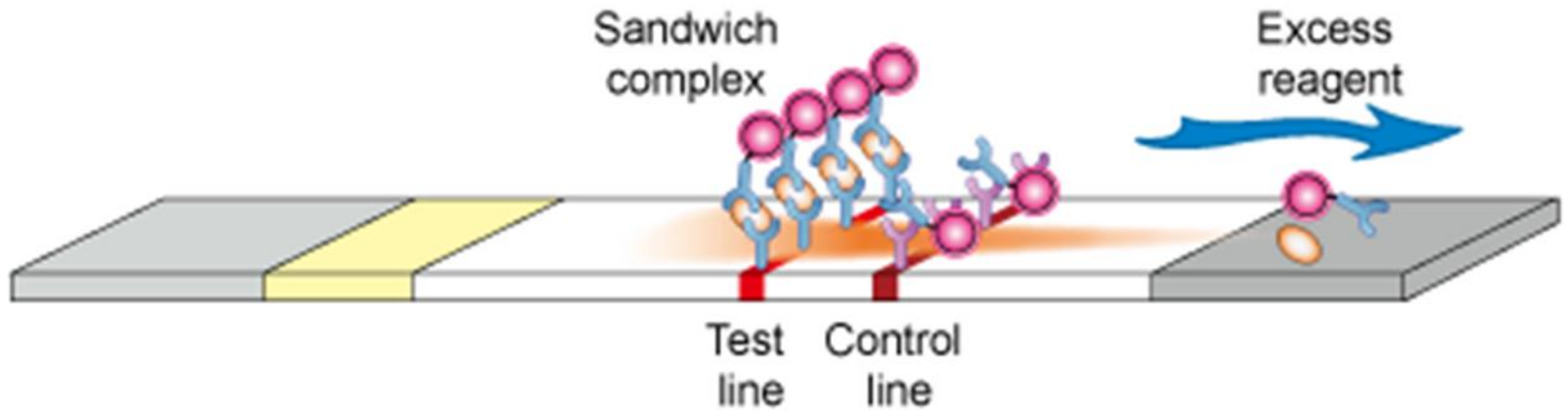
Lateral Flow test, IMMUNOSTRIP



- The **antibodies** bind to their **antigen** in the sample

- The **complex antigen-antibody** moves by capillarity towards the reaction lines.

Lateral Flow test, IMMUNOSTRIP



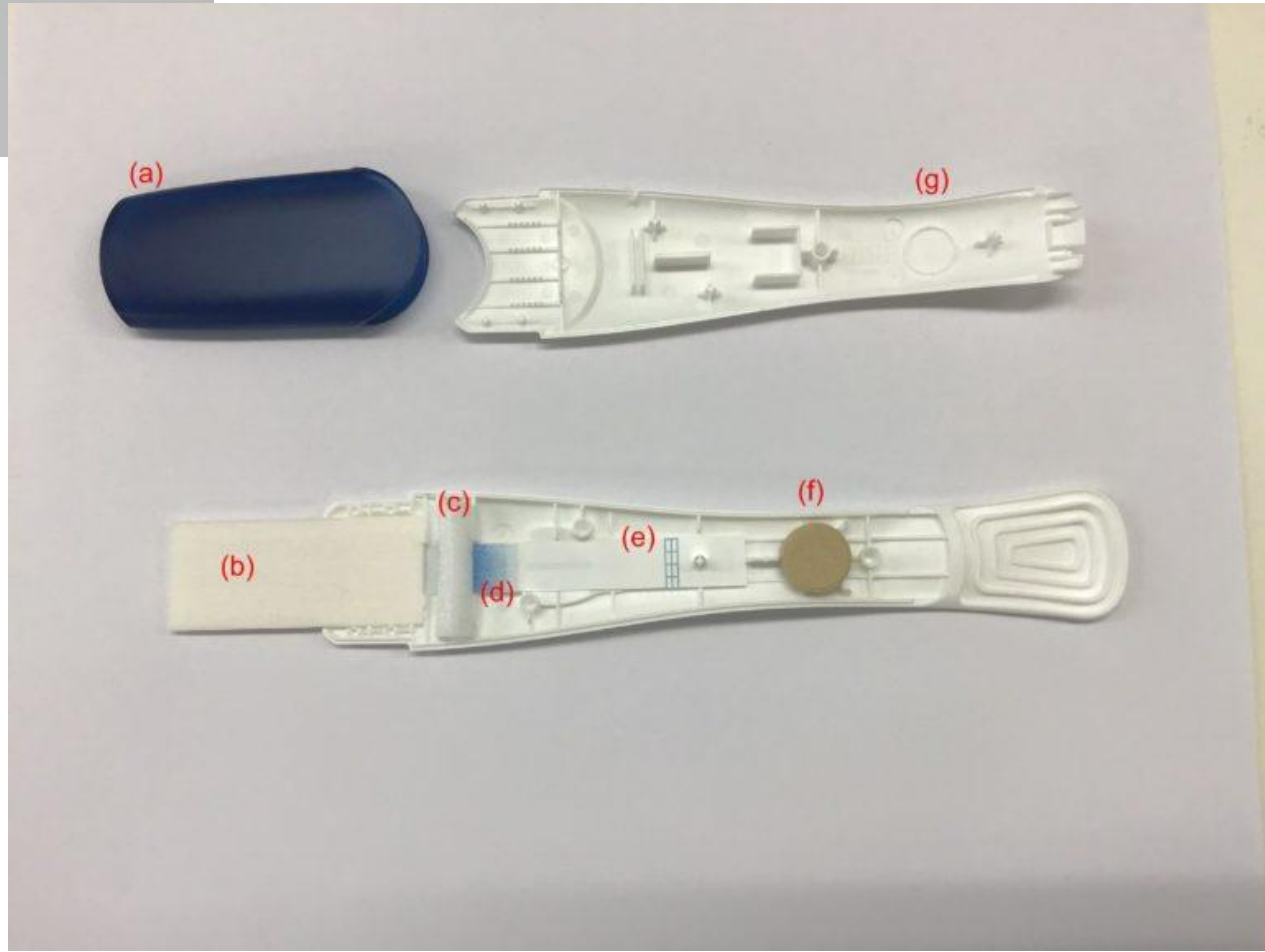
Antigen-Antibody binds to the antibodies that are in the **test line**.

Free antibodies bind to the antibodies anti-Ig present in the control line.



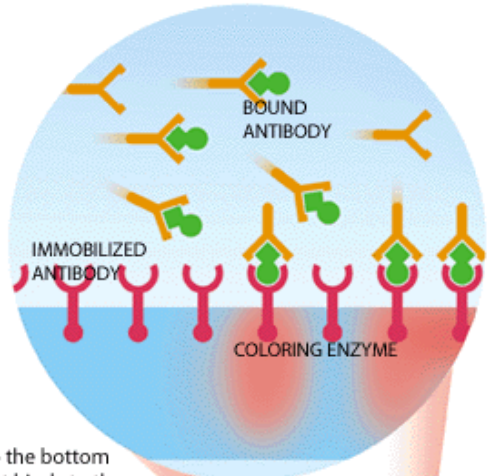
Components of a pregnancy testing stick:

- a) Protective end Cap.
- b) Absorbent pad.
- c) Foam place holder.
- d) Conjugate pad with Latex microbeads.
- e) Nitrocellulose membrane with antibody test line.
- f) desiccant tablet.
- g) Device outer housing.

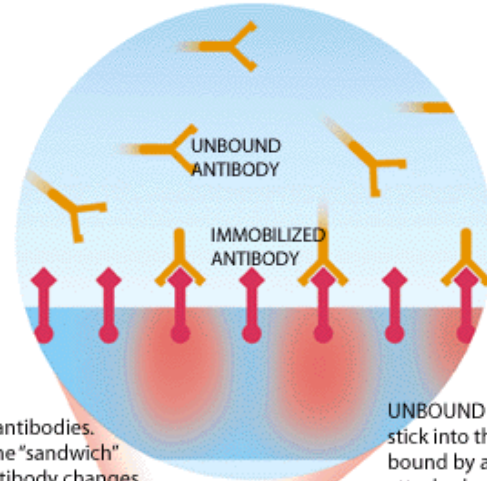




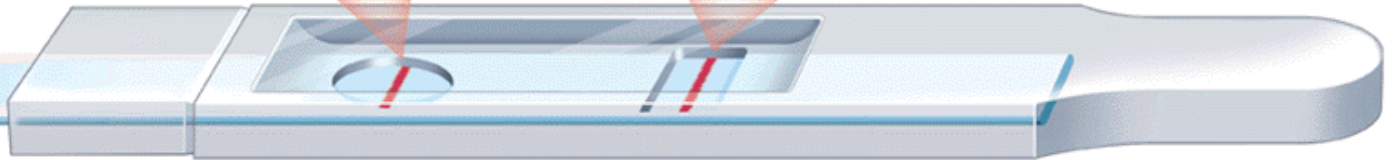
URINE SAMPLE is applied to the bottom of the stick. Any hCG present binds to the first anti-hCG antibody.



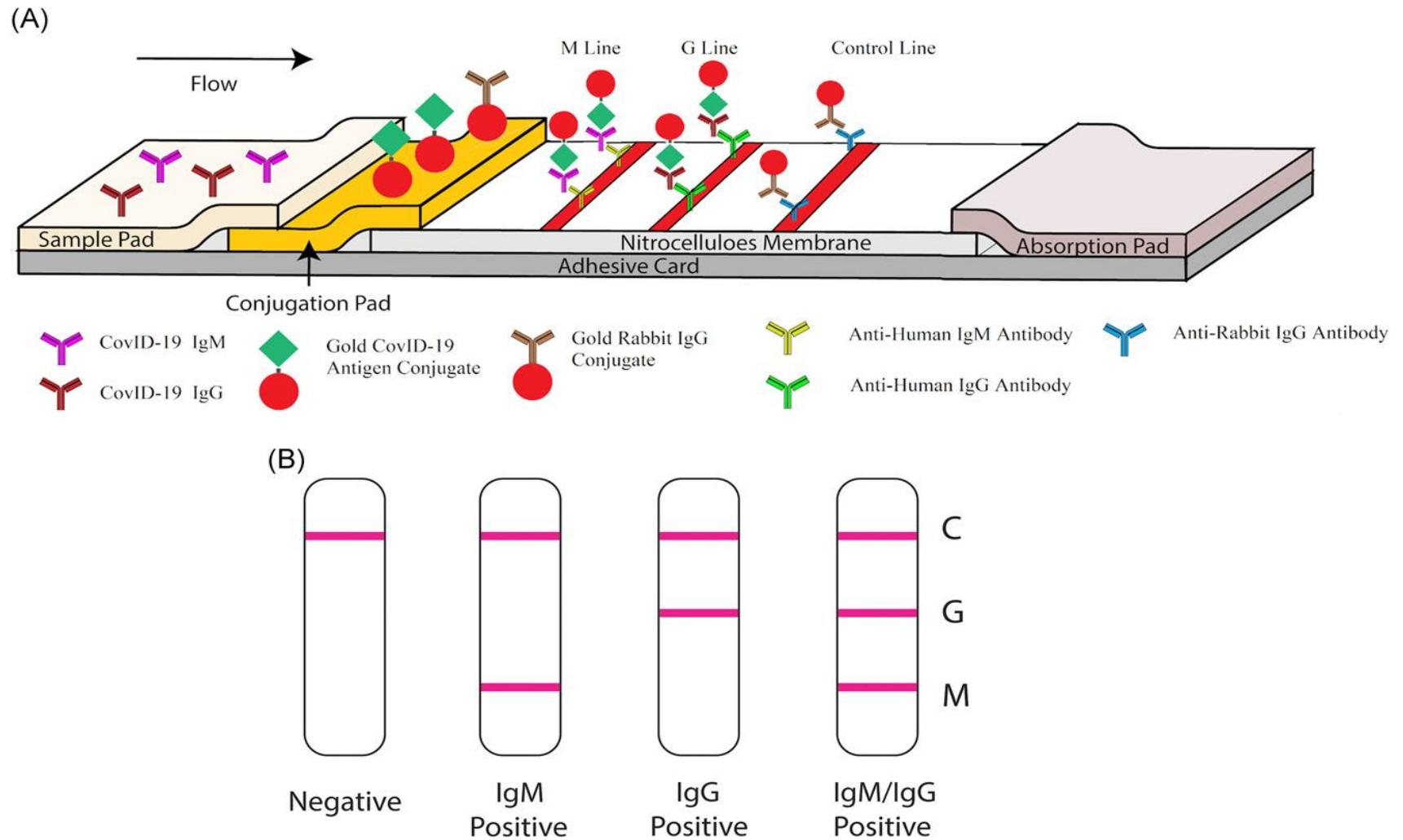
TEST REGION contains immobilized anti-hCG antibodies. They bind alternative sites on hCG, trapping the "sandwich" at the site. An enzyme attached to the first antibody changes the color of a coating on the stick, evidence of a positive test.



UNBOUND ANTIBODIES progress up the stick into the control region, where they are bound by a third type of antibody. Again, the attached enzyme causes a color change, but that is proof only that the antibodies are behaving properly, not proof of pregnancy.

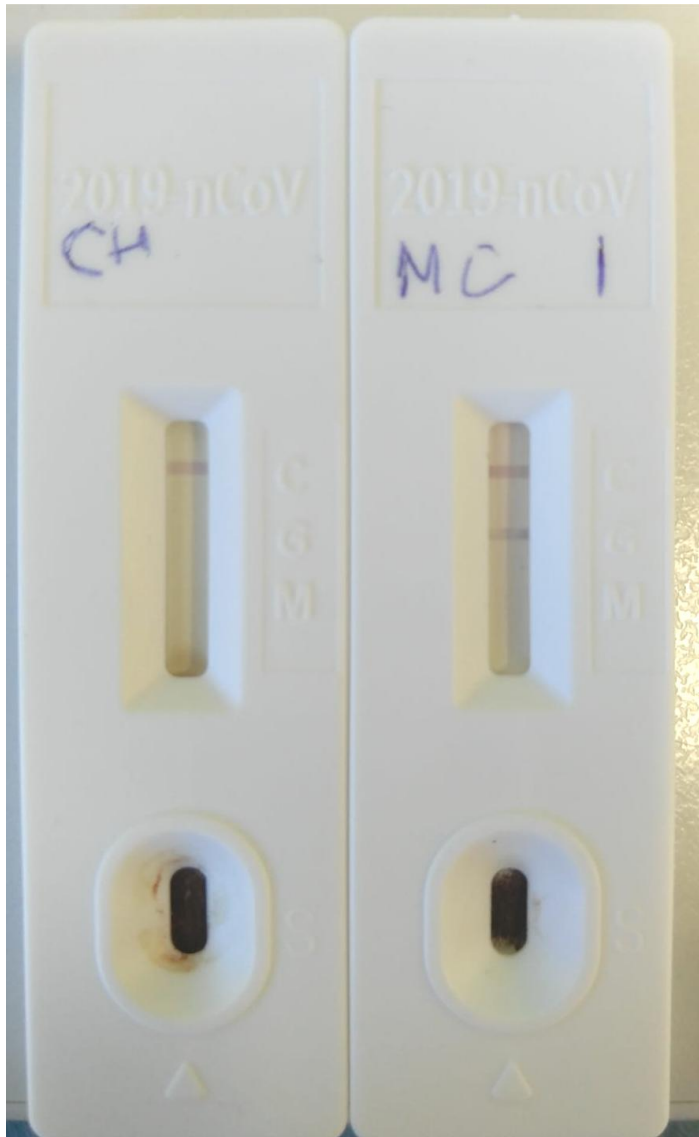


Development and clinical application of a rapid IgM-IgG combined antibody test for SARS-CoV-2 infection diagnosis





POSSIBILI FORMATI ANALITICI: lateral-flow immunoassay



C
IgG
IgM

Permettono un'analisi qualitativa o semi-quantitativa molto rapida:

- Il campione viene aggiunto ad una estremità (S)
- fluisce lungo la membrana per effetto di capillarità,
- Successivamente, si raggiunge la zona di cattura dell'analita (T) e la zona di controllo (C)

