

TEST ELISA

Dr. KACEM N.S

ELISA

Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay

OU

test d'immuno-absorption enzymatique

Histoire:

La technique d'ELISA a été conceptualisée et développée par deux scientifiques suédois, **Peter Perlmann** (investigateur principal) et **Eva Engvall** à l'Université de Stockholm en **1971**.

A la fin des années 60, **Stratis Avrameas** et **GB Pierce** mettent au point la technique d'immunoenzymologie, technique d'analyse par réaction entre antigènes et anticorps et utilisant comme marqueur des enzymes.

Principe:

La technique ELISA est une technique **immuno-enzymatique** de détection qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps.

Le test ELISA indirect:

Ce test permet de détecter ou doser des anticorps.

Il se réalise en 4 étapes:

1. La première étape appelée "**coating**" de l'antigène
2. La deuxième étape consiste à **fixer l'anticorps à doser**
3. La troisième étape consiste à **fixer l'anticorps de détection.**
4. La quatrième étape consiste à **révéler les anticorps fixés**

Première étape

Elle consiste à incuber (à 4°C pendant une nuit) dans des puits, la solution d'antigène spécifique de l'anticorps recherché.

La fixation de l'antigène sur le fond des puits se fait électrostatiquement.

Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les antigènes en excès avec du tampon de lavage.

Deuxième étape

Incubation de la solution d'anticorps à doser.

Les anticorps se fixent spécifiquement sur l'antigène.

Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps à doser en excès avec du tampon de lavage.

Troisième étape

- Incubation de la solution d'anticorps de détection
- Les anticorps de détection se fixent spécifiquement sur les anticorps à doser.
- Les puits sont ensuite lavés pour éliminer les anticorps de détection en excès avec du tampon de lavage.
- Les anticorps de détection sont couplés à une enzyme qui en présence de son substrat le transforme en produit de réaction détectable et mesurable grâce à l'apparition d'une coloration.

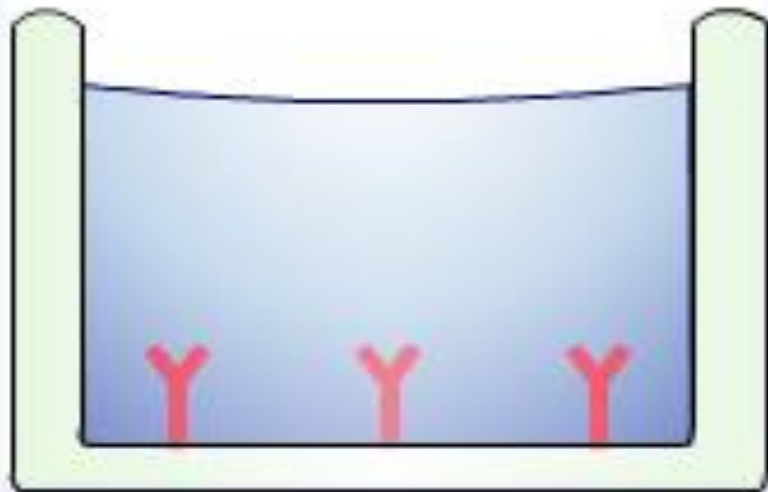
Quatrième étape

On incube à température ambiante et à l'obscurité une solution révélatrice contenant le substrat pour l'enzyme.

L'apparition d'une coloration dans le substrat indique la présence de l'anticorps à doser.

L'intensité de celle-ci est proportionnelle à la quantité d'enzyme présent et donc à la concentration d'anticorps recherché.

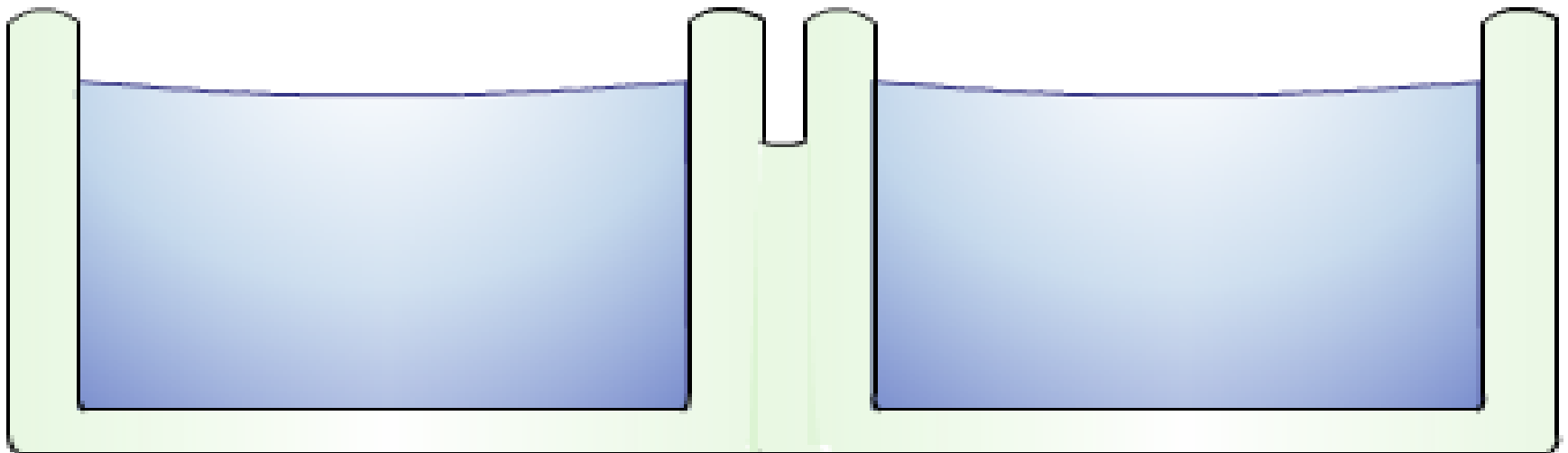
Direct ELISA Method



Indirect ELISA Method

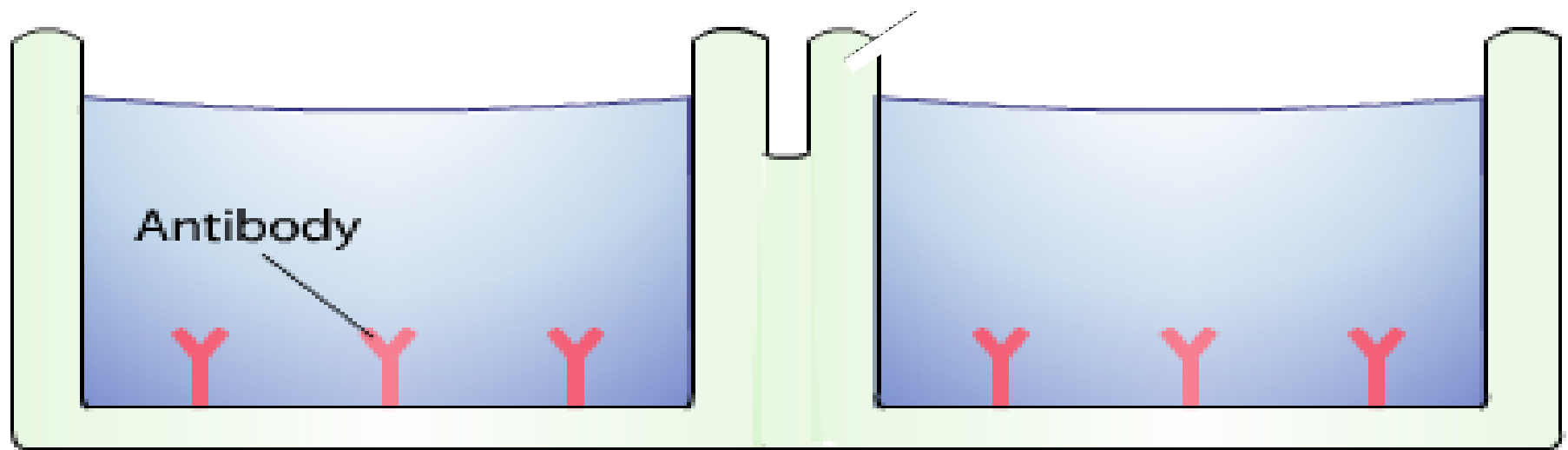


Direct ELISA Method



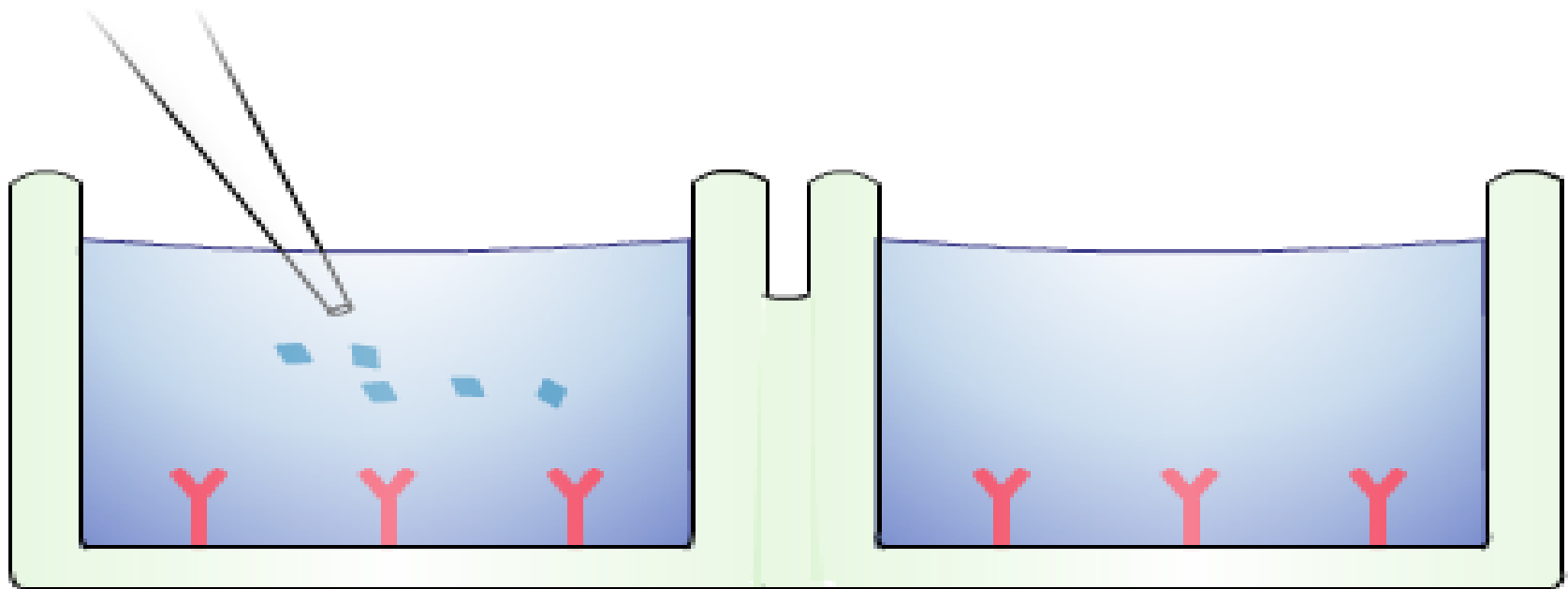
In the direct ELISA method, a specific monoclonal antibody is first attached (absorbed) onto the walls of a microtiter plate.

Direct ELISA Method



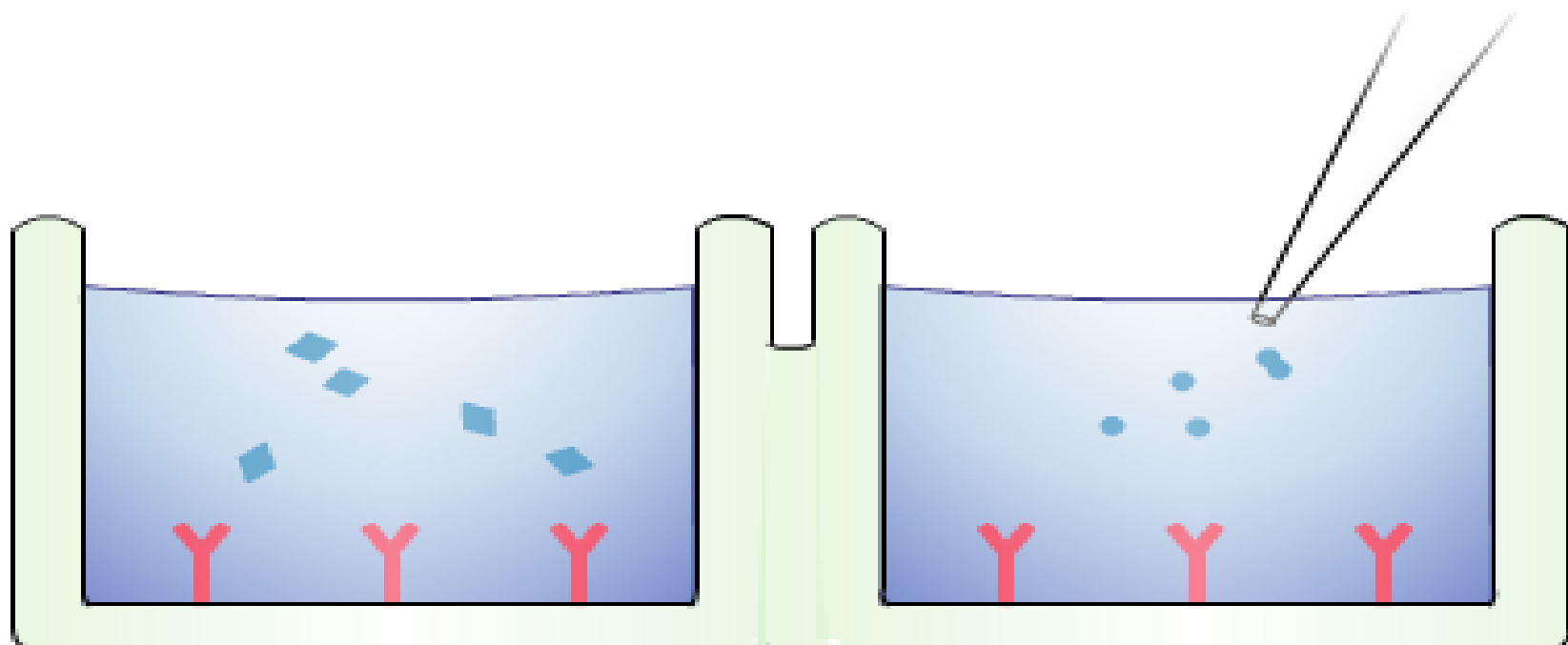
A suspension of serum or other fluid is added to the well to test for the presence of a complementary antigen. In this example, the sample on the left contains the complementary antigen whereas the sample on the right does not.

Direct ELISA Method



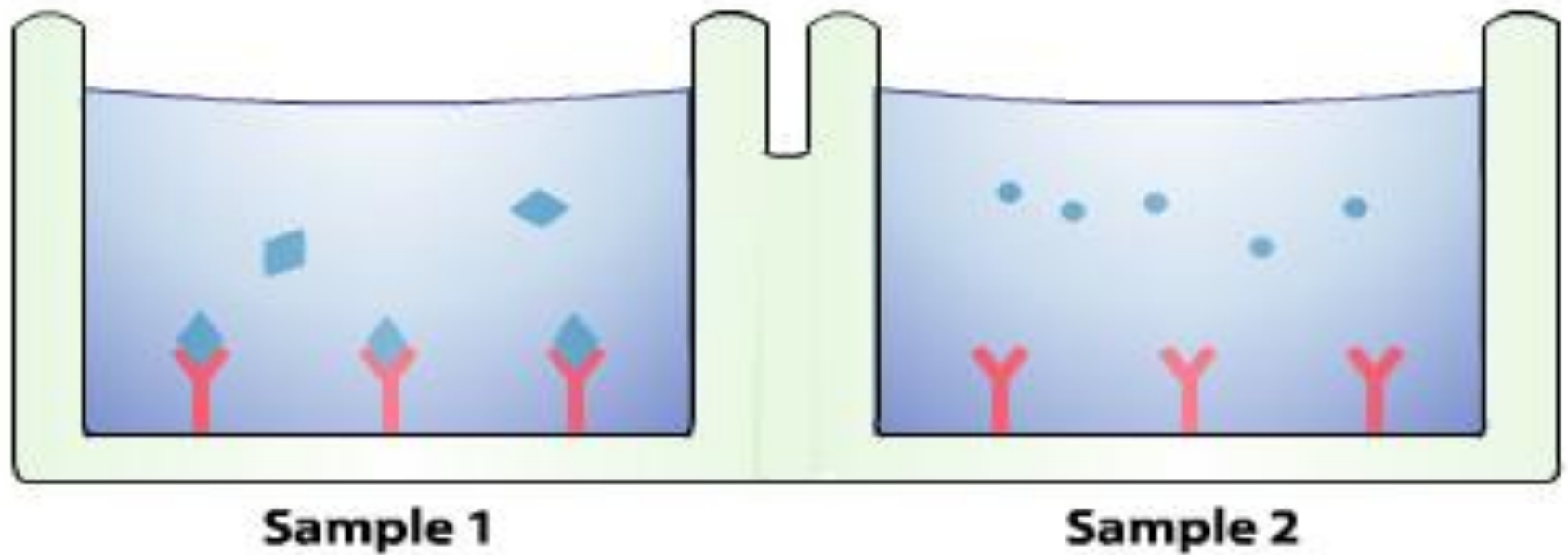
A suspension of serum or other fluid is added to the well to test for the presence of a complementary antigen. In this example, the sample on the left contains the complementary antigen whereas the sample on the right does not.

Direct ELISA Method



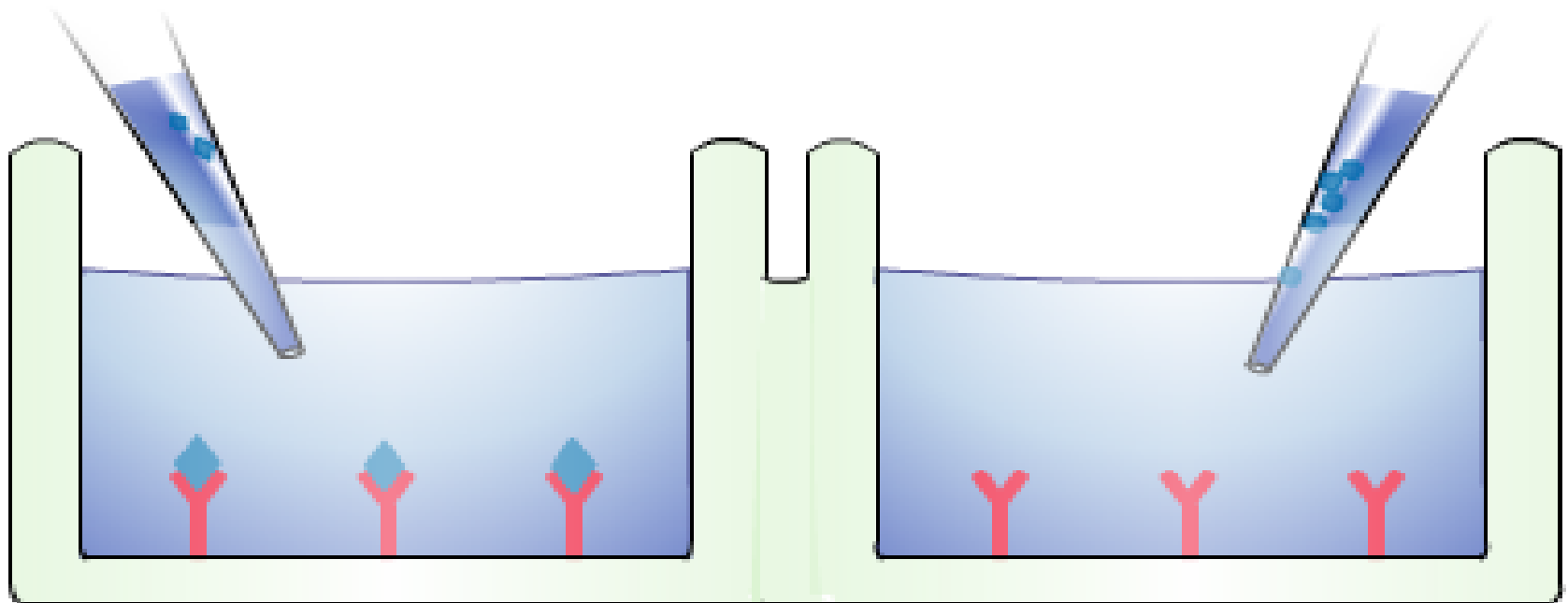
A suspension of serum or other fluid is added to the well to test for the presence of a complementary antigen. In this example, the sample on the left contains the complementary antigen whereas the sample on the right does not.

Direct ELISA Method

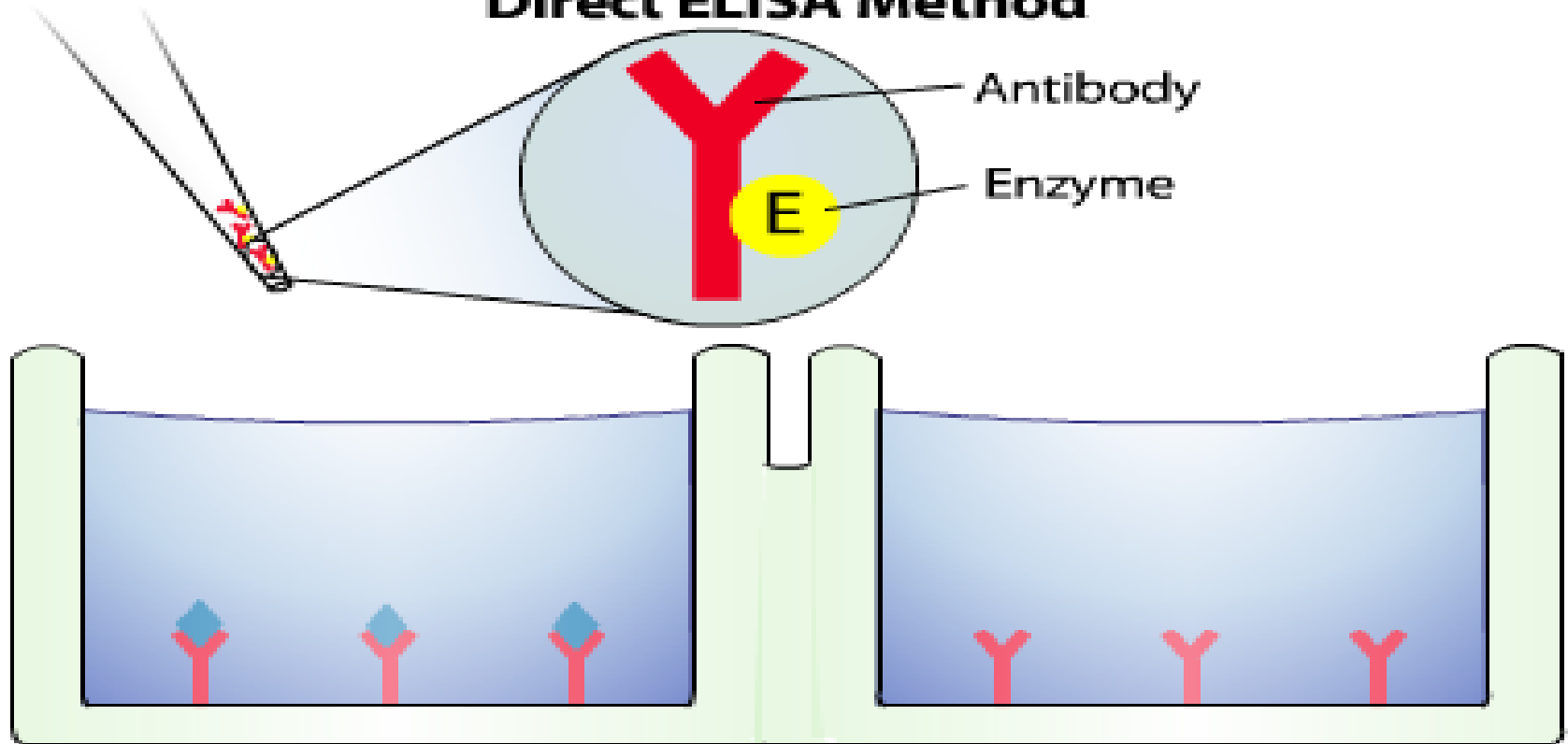


Binding of the antigen to the antibody is strong enough to withstand rinsing that removes the test fluid and unbound antigen.

Direct ELISA Method

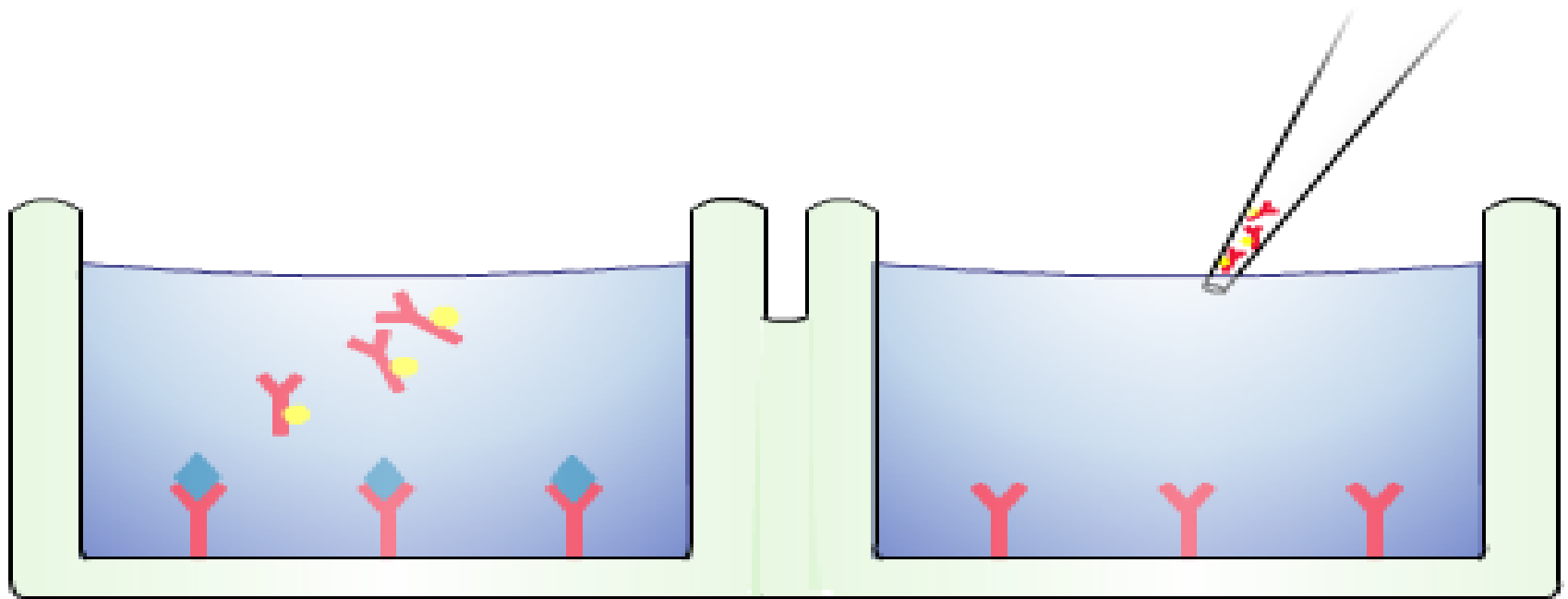


Direct ELISA Method



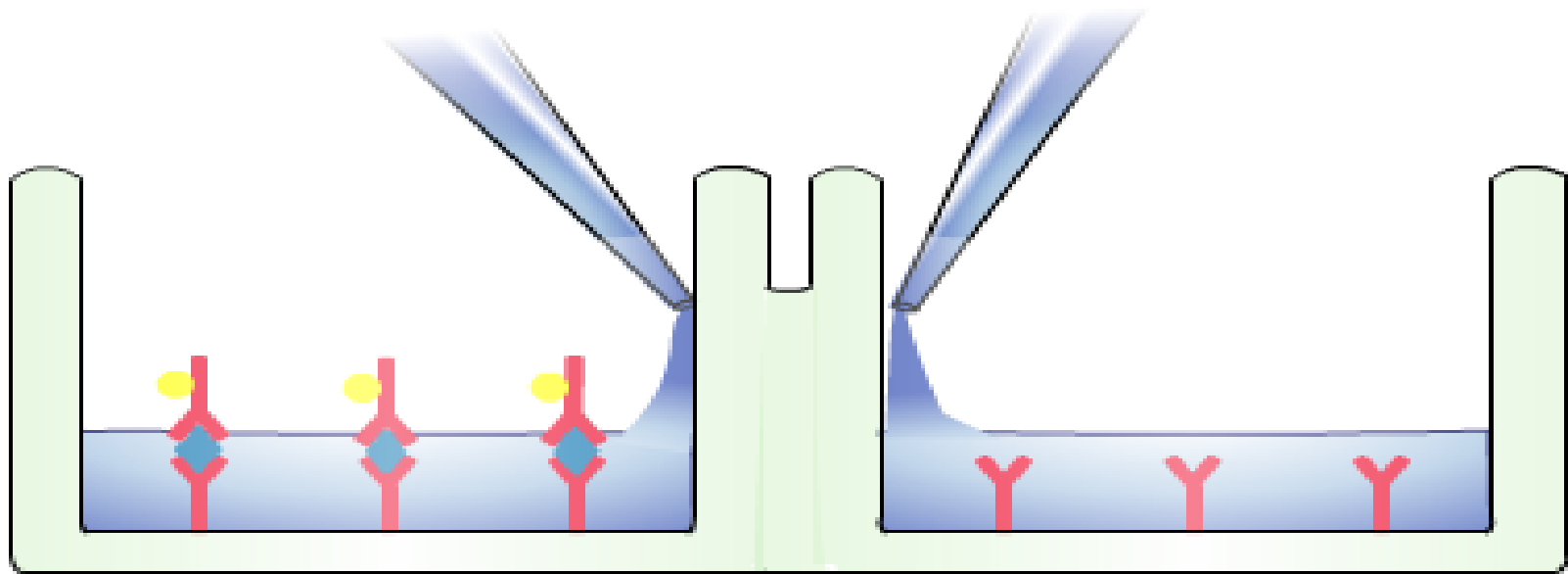
After rinsing to remove unbound antigen, another aliquot of the monoclonal antibody is added to the well. The antibodies in this aliquot are modified so that they carry what is known as a reporter enzyme. A reporter enzyme is designed to produce a color change when the enzyme reacts with its substrate.

Direct ELISA Method



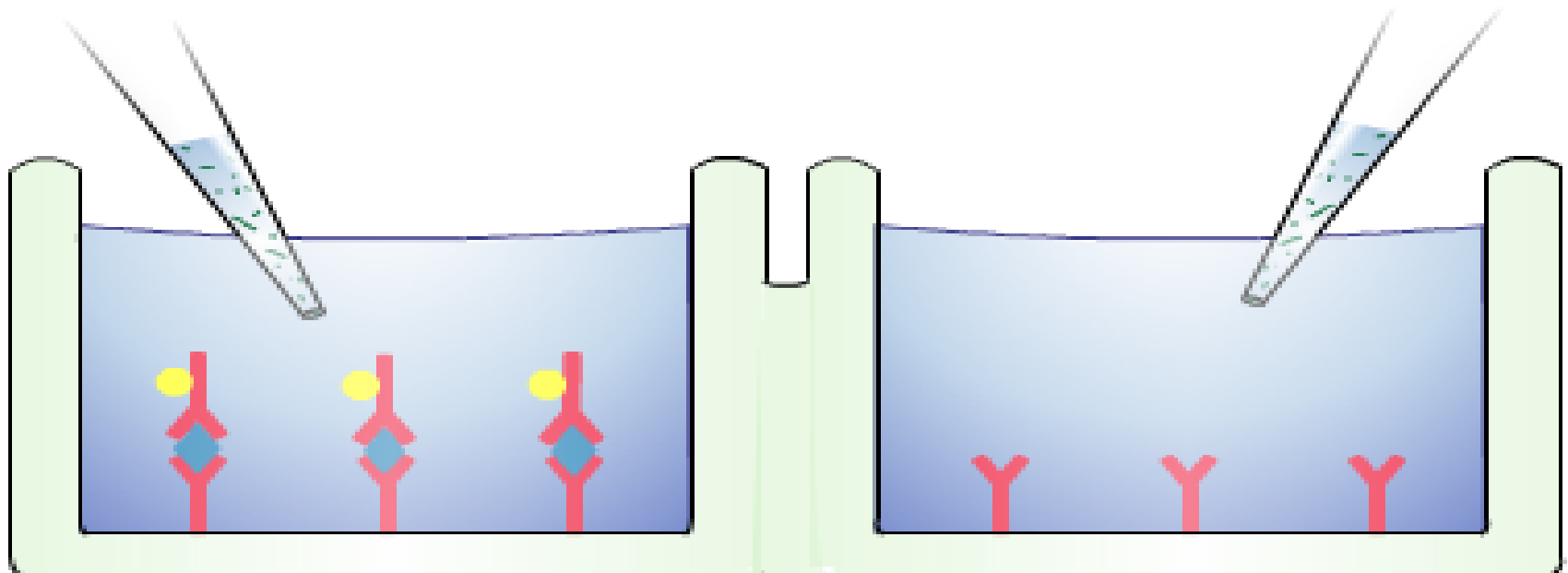
After rinsing to remove unbound antigen, another aliquot of the monoclonal antibody is added to the well. The antibodies in this aliquot are modified so that they carry what is known as a reporter enzyme. A reporter enzyme is designed to produce a color change when the enzyme reacts with its substrate.

Direct ELISA Method



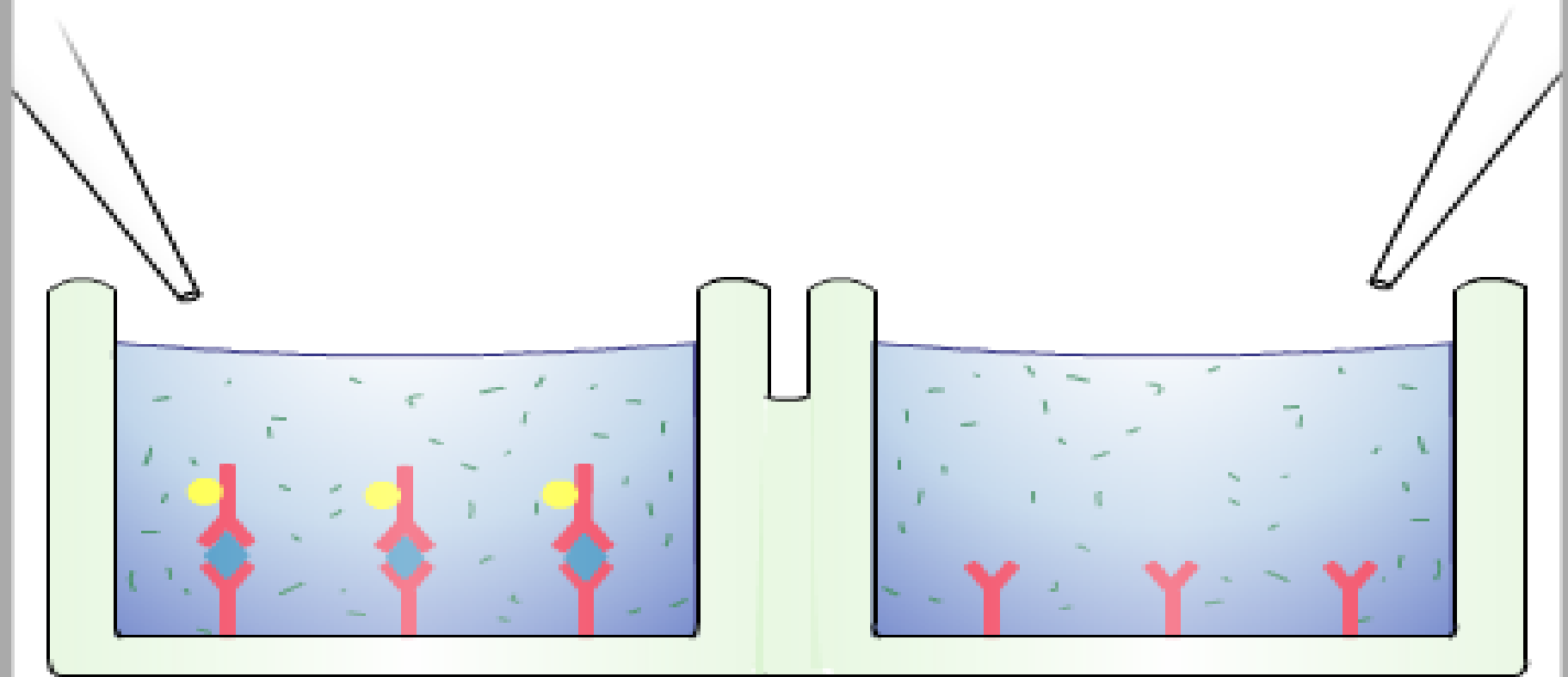
The sample is again rinsed to remove any unbound antibodies. If the antigen is present, a complex will have formed that includes the antibody bound to the well, the antigen, and the enzyme-conjugated antibody. If the antigen is not present, the enzyme-bound antibody will have been washed away.

Direct ELISA Method



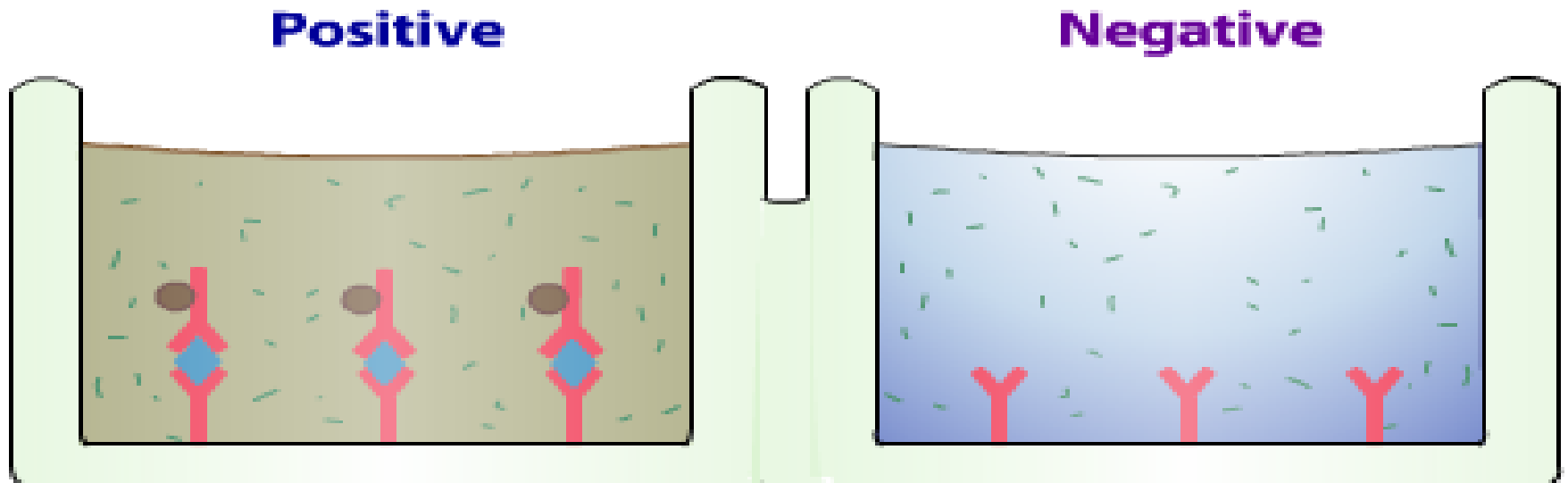
The enzyme's substrate is now added. A color change reveals the presence of enzyme-labeled antibody as well as its bound antigen. No color change indicates that antigen was not present in the test fluid—a negative test result.

Direct ELISA Method



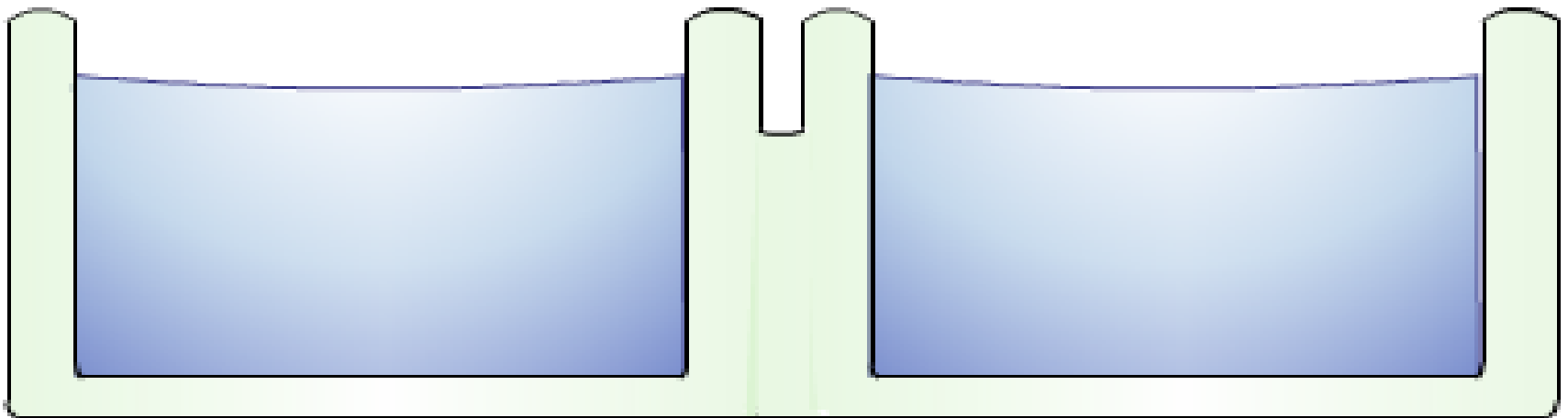
The enzyme's substrate is now added. A color change reveals the presence of enzyme-labeled antibody as well as its bound antigen. No color change indicates that antigen was not present in the test fluid—a negative test result.

Direct ELISA Method



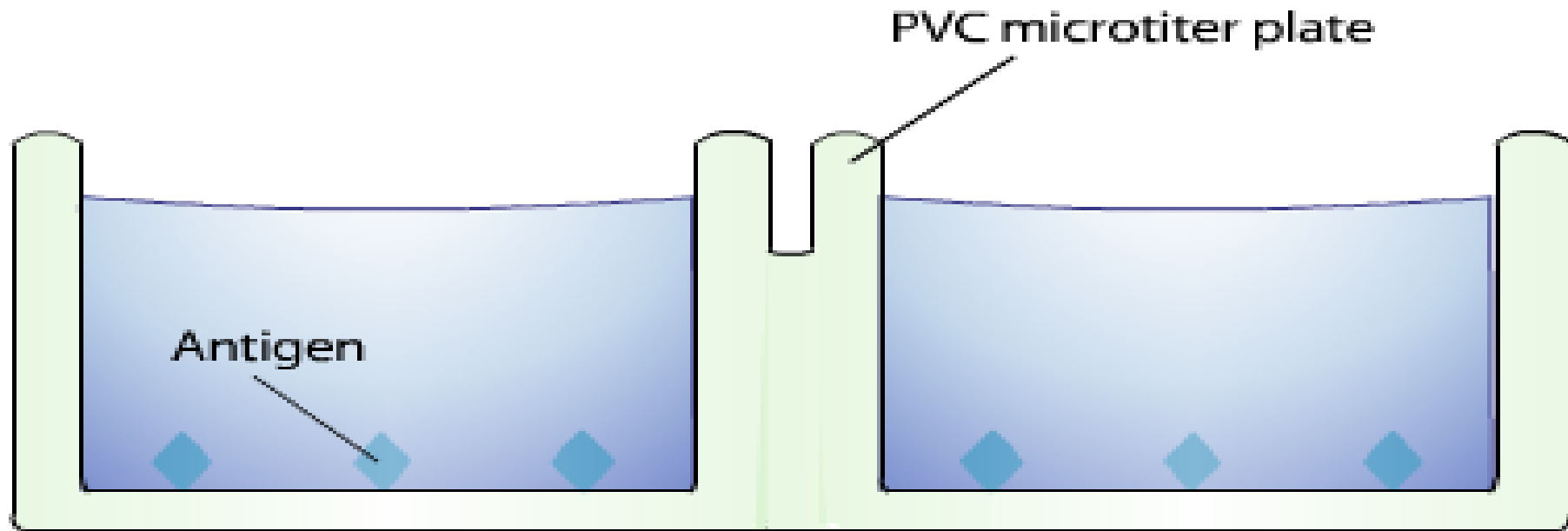
The enzyme's substrate is now added. A color change reveals the presence of enzyme-labeled antibody as well as its bound antigen. No color change indicates that antigen was not present in the test fluid—a negative test result.

Indirect ELISA Method



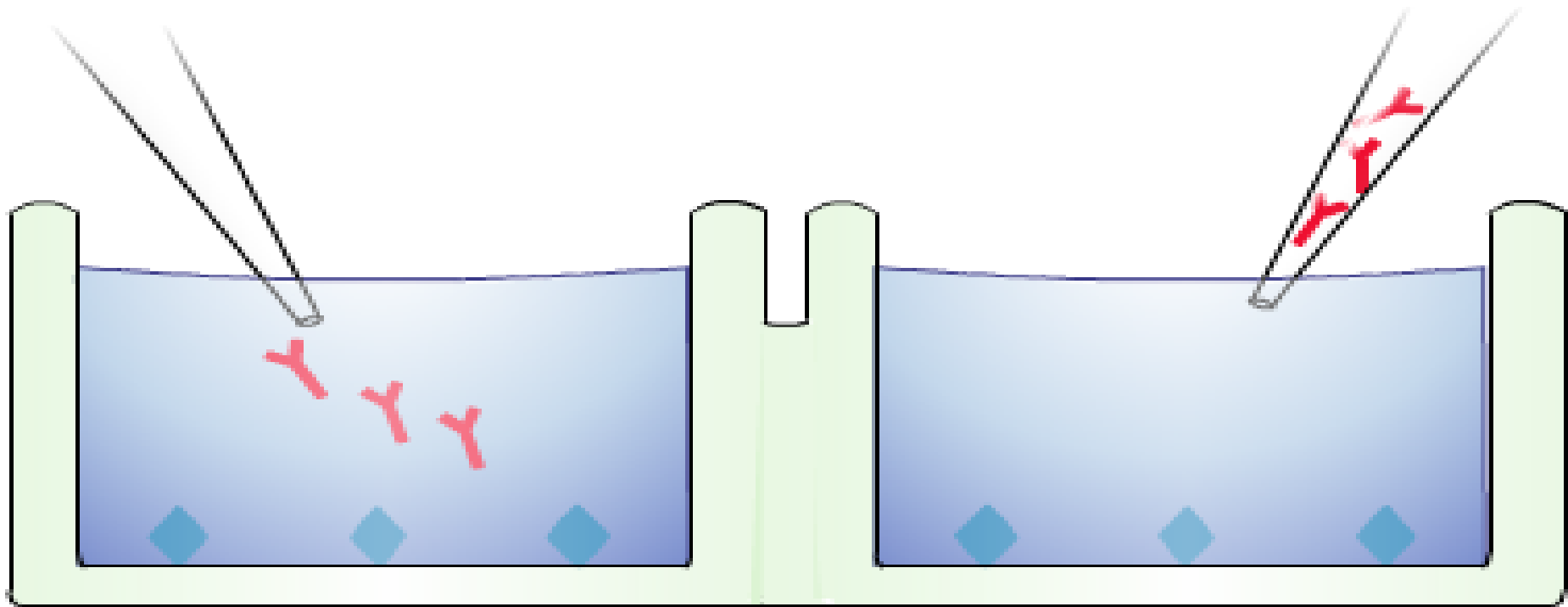
The indirect ELISA test is one that determines whether a specific antibody (e.g., HIV antibody) is present in a sample such as serum. In this case, the appropriate antigen is first absorbed to the walls of a microtiter plate.

Indirect ELISA Method



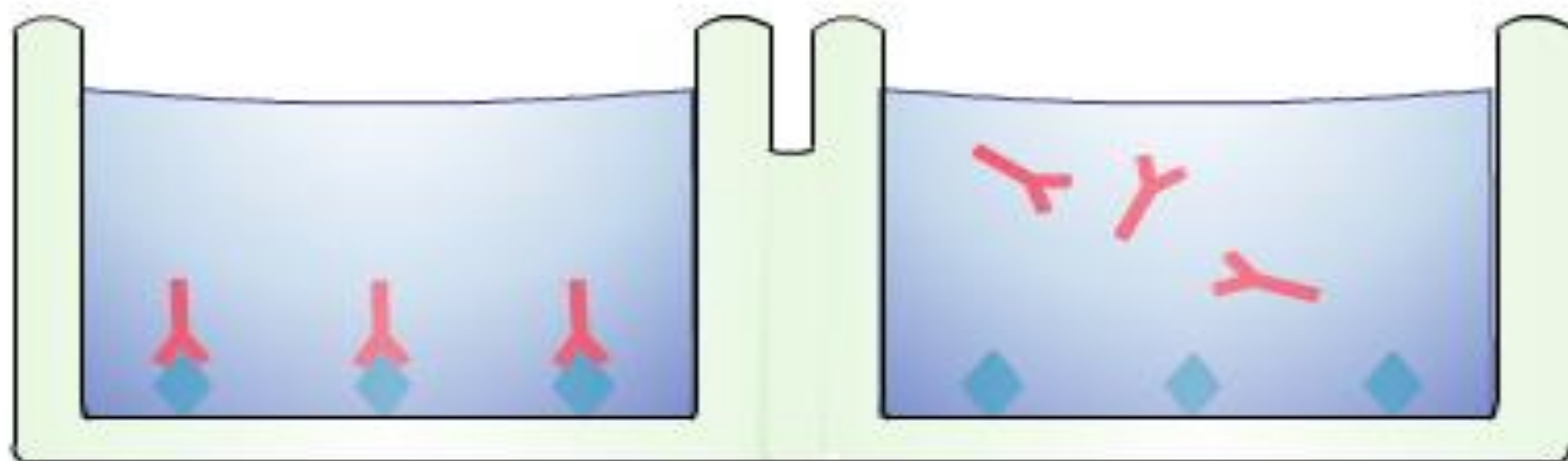
Serum that might contain antibodies against the antigen is added to the well. If the antibodies are present in the sample (Sample 1), they will bind to the antigens that are absorbed to the wall of the well. If the sample contains only non-specific antibodies, they will not bind to the antigen (Sample 2).

Indirect ELISA Method



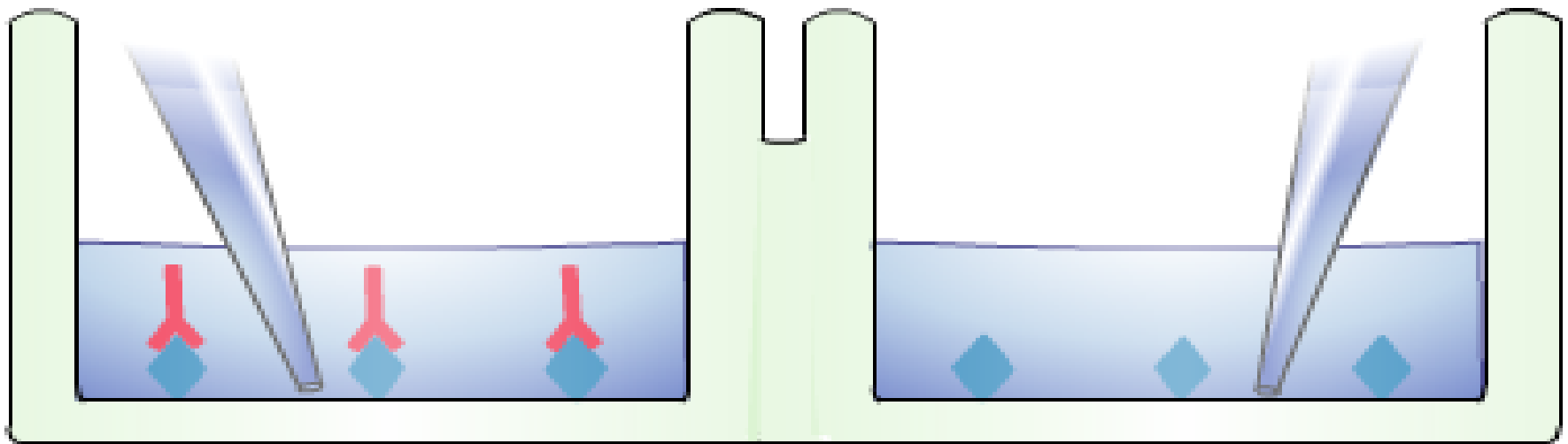
Serum that might contain antibodies against the antigen is added to the well. If the antibodies are present in the sample (Sample 1), they will bind to the antigens that are absorbed to the wall of the well. If the sample contains only non-specific antibodies, they will not bind to the antigen (Sample 2).

Indirect ELISA Method



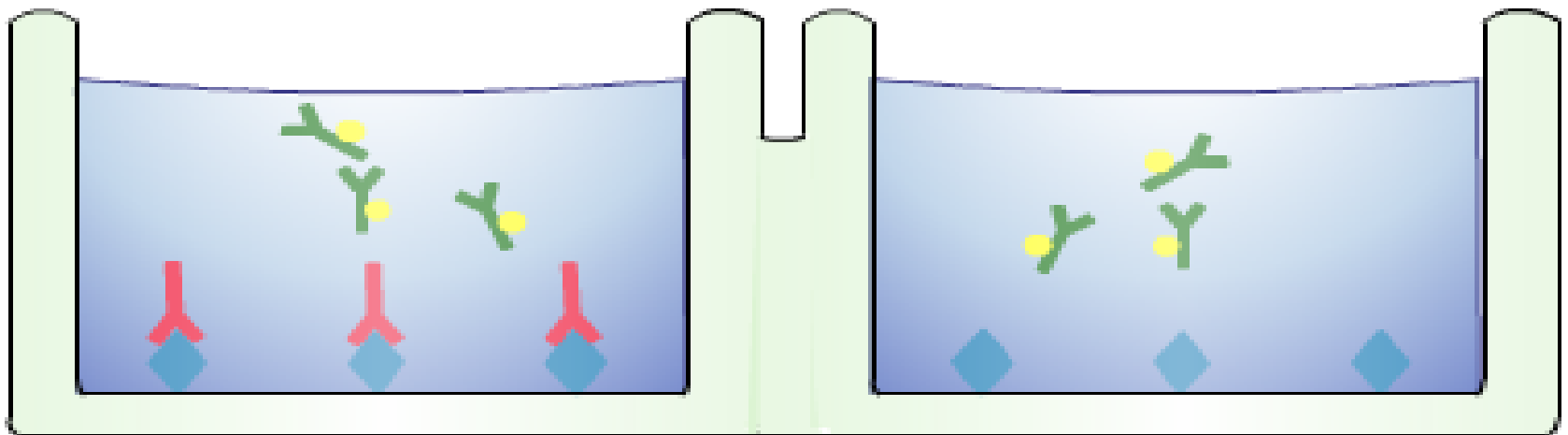
Rinsing removes any antibodies that do not specifically attach to the antigen absorbed to the well.

Indirect ELISA Method



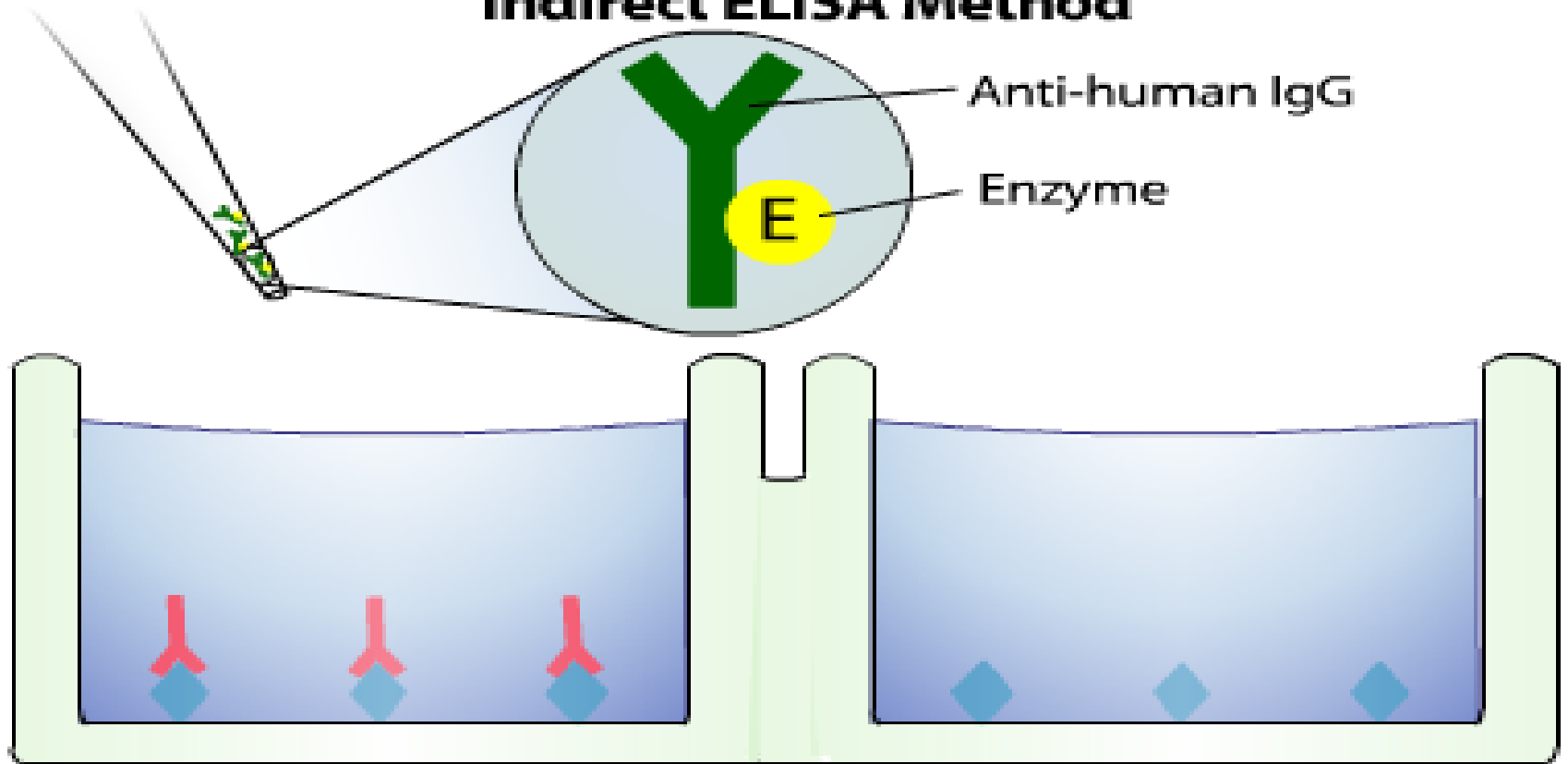
Rinsing removes any antibodies that do not specifically attach to the antigen absorbed to the well.

Indirect ELISA Method



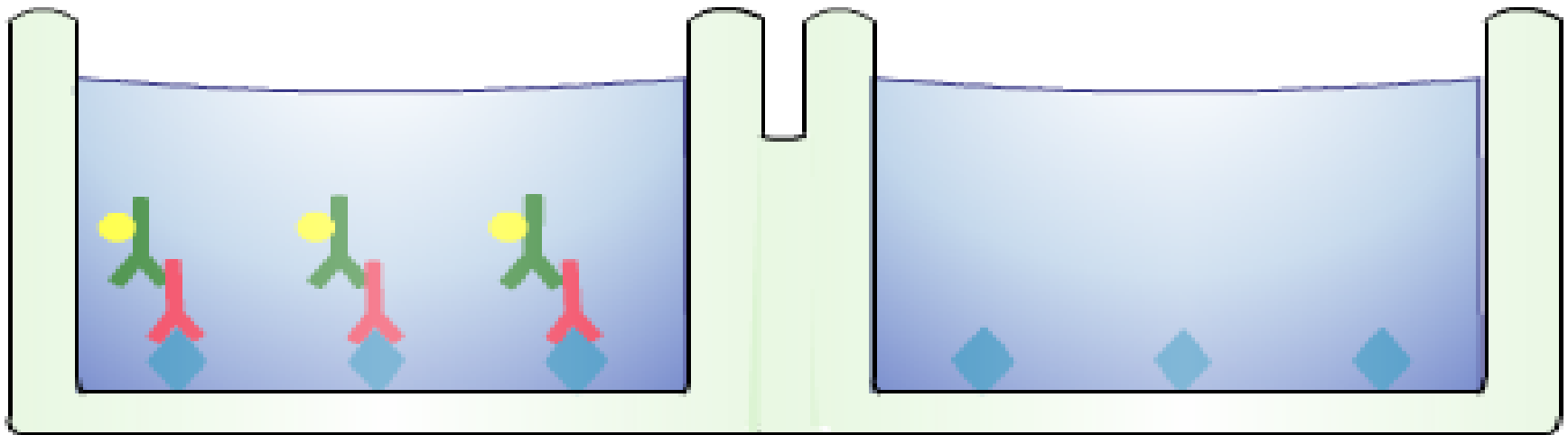
If the antibody was present in the sample, it will be bound to the absorbed antigen, and the enzyme-conjugated antibody will bind to this complex. The sample is again rinsed to remove any unbound antibodies.

Indirect ELISA Method



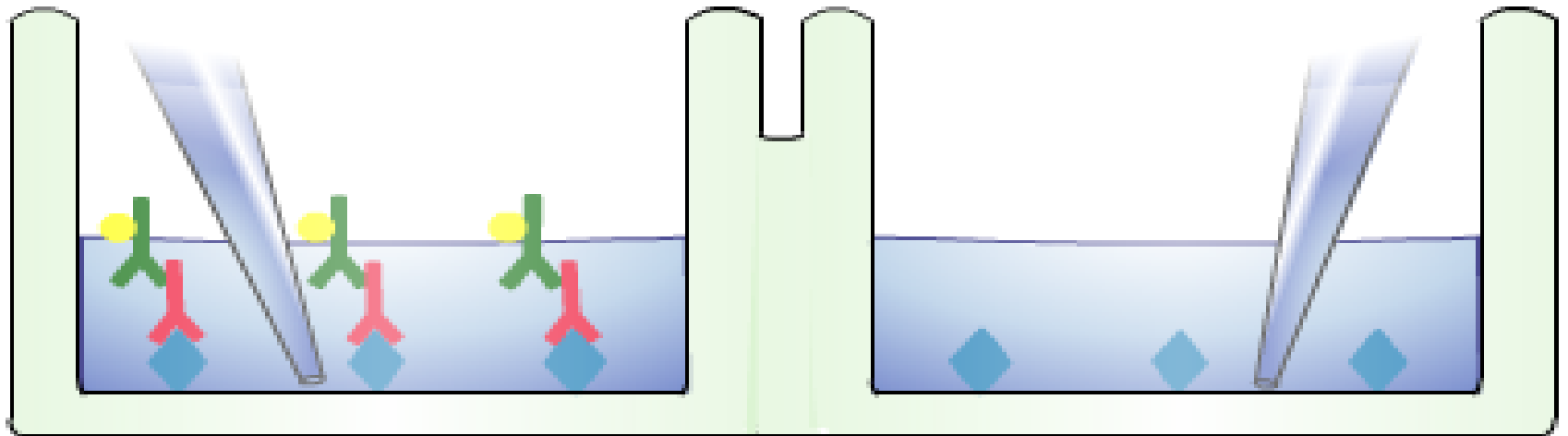
If antibodies do attach to the antigen, they can be detected by the addition of an antibody-enzyme conjugate. These reporter antibodies bind to the immunoglobulins (generally IgG) used in the previous step. Since this specimen contains human antibodies, we use enzyme-conjugated anti-human IgG antibodies for the reporter.

Indirect ELISA Method



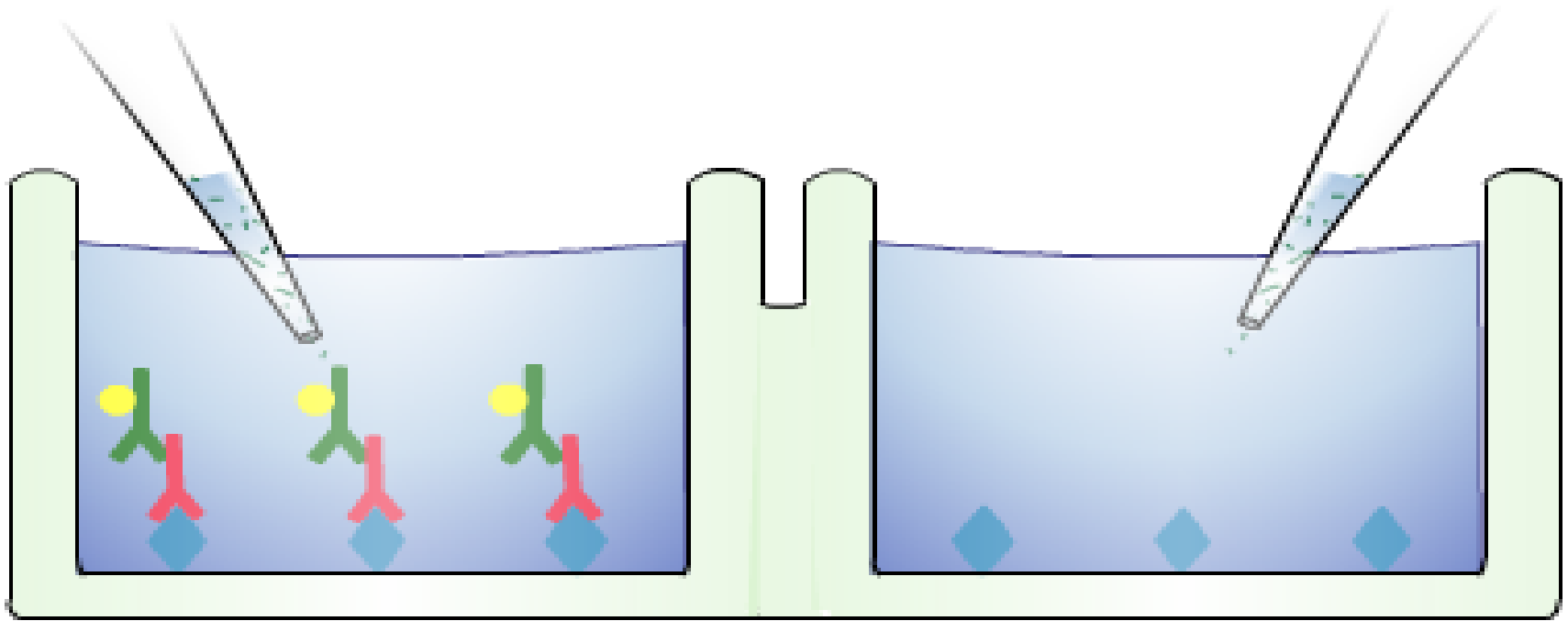
The substrate for the enzyme is now added. A color change indicates that Sample 1 contains antibodies that react against the original antigen.

Indirect ELISA Method



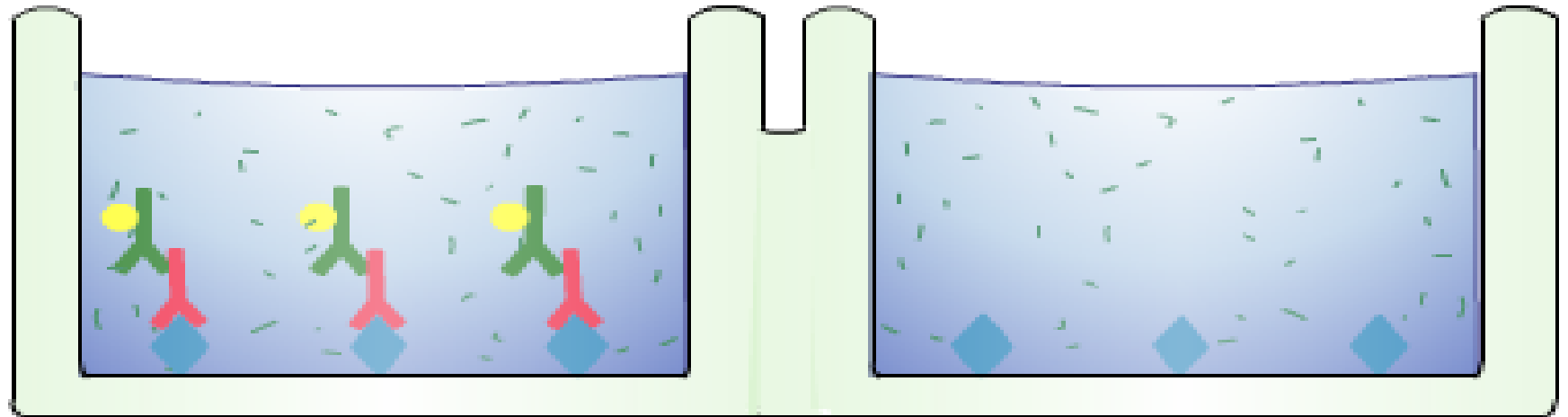
If the antibody was present in the sample, it will be bound to the absorbed antigen, and the enzyme-conjugated antibody will bind to this complex. The sample is again rinsed to remove any unbound antibodies.

Indirect ELISA Method



The substrate for the enzyme is now added. A color change indicates that Sample 1 contains antibodies that react against the original antigen.

Indirect ELISA Method

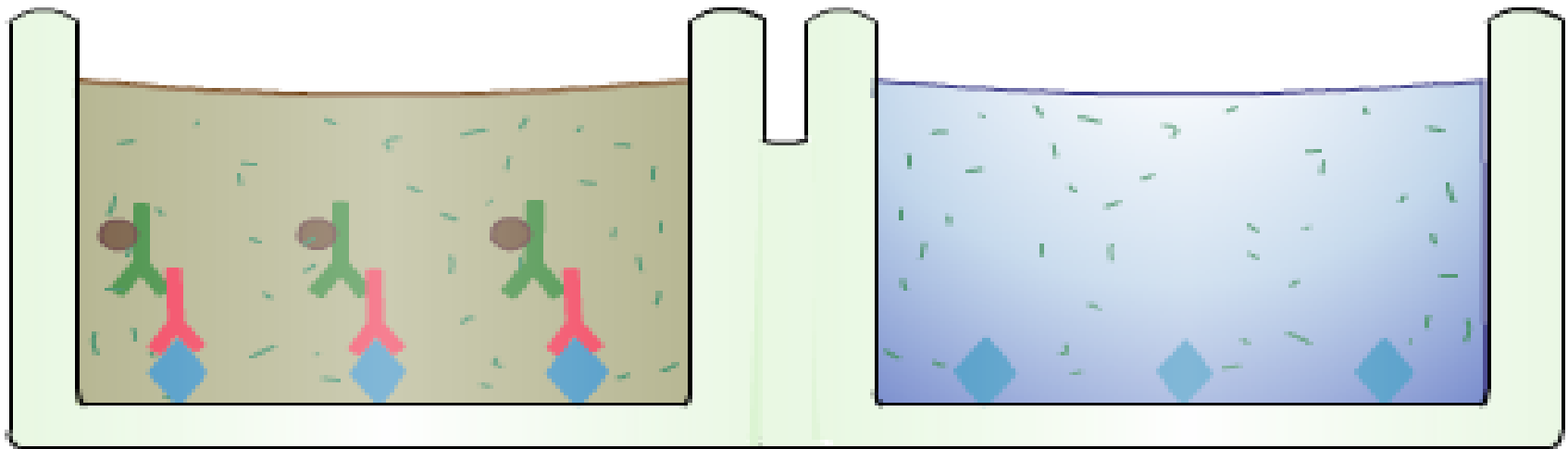


The substrate for the enzyme is now added. A color change indicates that Sample 1 contains antibodies that react against the original antigen.

Indirect ELISA Method

Positive

Negative

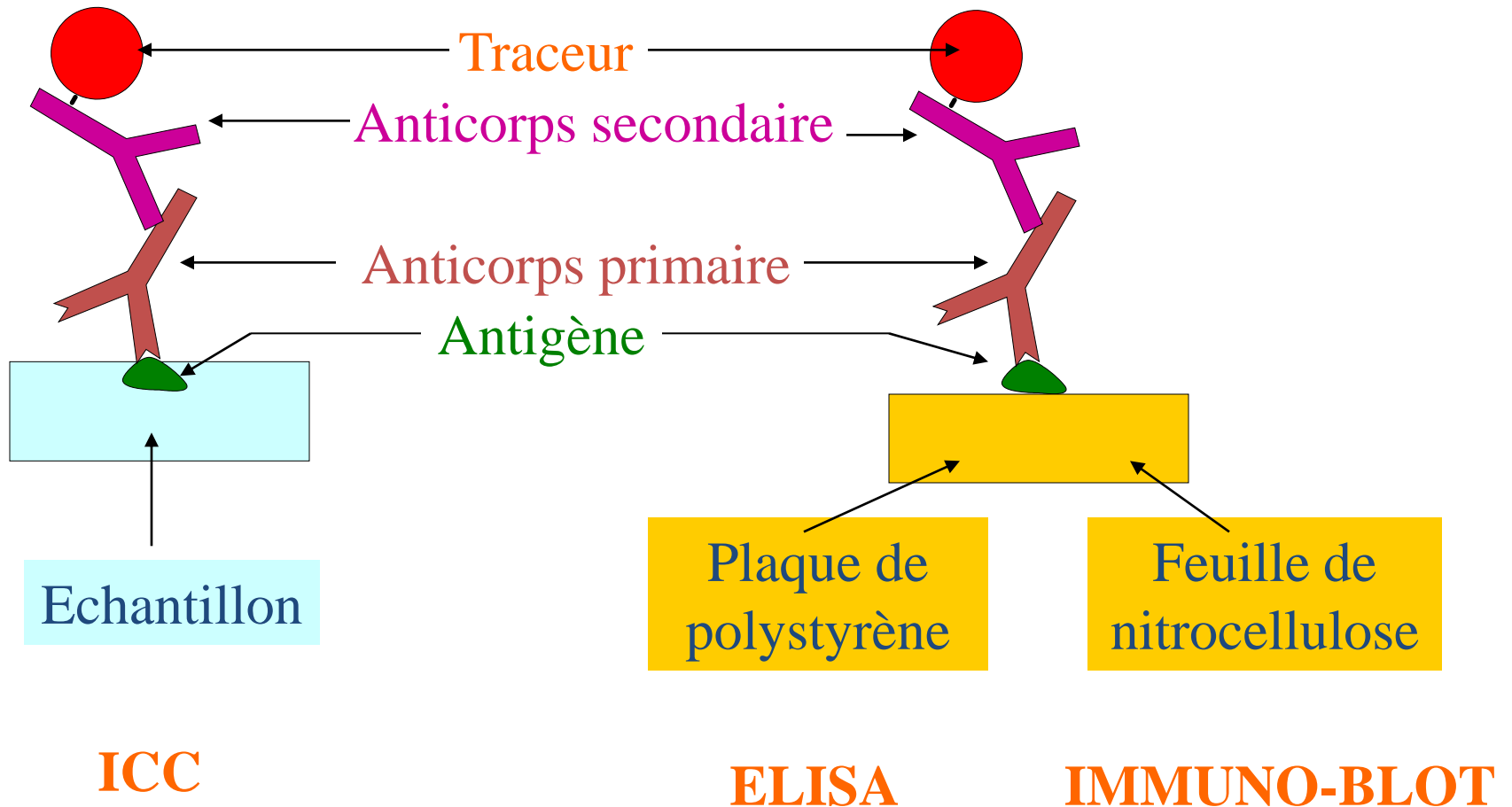


The substrate for the enzyme is now added. A color change indicates that Sample 1 contains antibodies that react against the original antigen.

un résultat qualitatif indiquera la présence ou l'absence d'un antigène dans l'échantillon. Les valeurs-seuil sont déterminées par l'analyste et peuvent être basées sur la statistique.

dans l'utilisation quantitative de l'ELISA, la densité optique ou les unités de fluorescence de l'échantillon sont interpolées sur une courbe d'étalonnage.

Comparaison des mécanismes réactionnels de différentes techniques



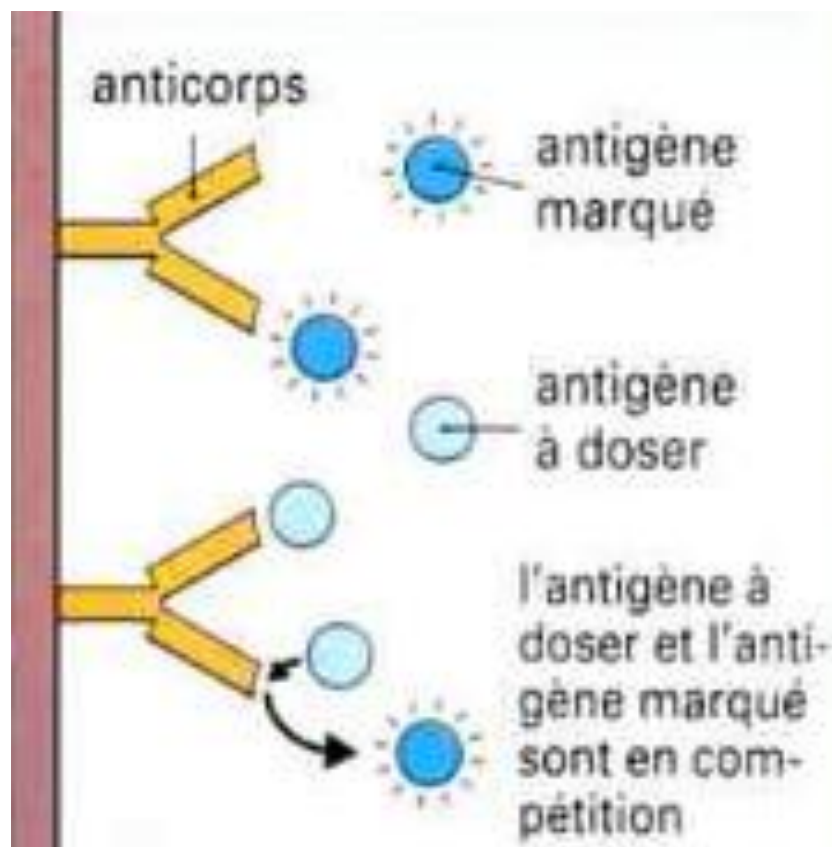
La technique ELISA compétition

La technique utilise une protéine à rechercher immobilisée sur un support plastique et un anticorps spécifique conjugué à une enzyme qui est révélé par l'addition d'un substrat qui se colore.

Ce système de révélation est mis en compétition par une mise en présence préalable d'un échantillon à doser avec l'anticorps conjugué.

L'anticorps conjugué est alors bloqué par la protéine recherchée et n'est donc pas révélé sur le support plastique.

Ce système fonctionne à l'envers dans le sens où plus il y a de protéine présente moins il y a de coloration.



Avantages de la technique

- L'utilisation d'anticorps monoclonaux rend la détection spécifique.
- Possibilité de quantifier grâce à la réalisation d'une gamme en parallèle.
- L'utilisation d'anticorps secondaires rend la technique sensible.
- technique accessible à tous les biologistes.
- La détection du signal ne nécessite pas la présence d'appareillage spécialisé.
- La validité des trousseaux est d'environ un an.

Inconvénients de la technique

- La limite de détection est moins bonne que la radio-immuno-assays: RIA.
- La réaction enzymatique rend cette technique dépendante de la température, du pH et de l'éclairement.