

# TECNICHE ANALITICHE

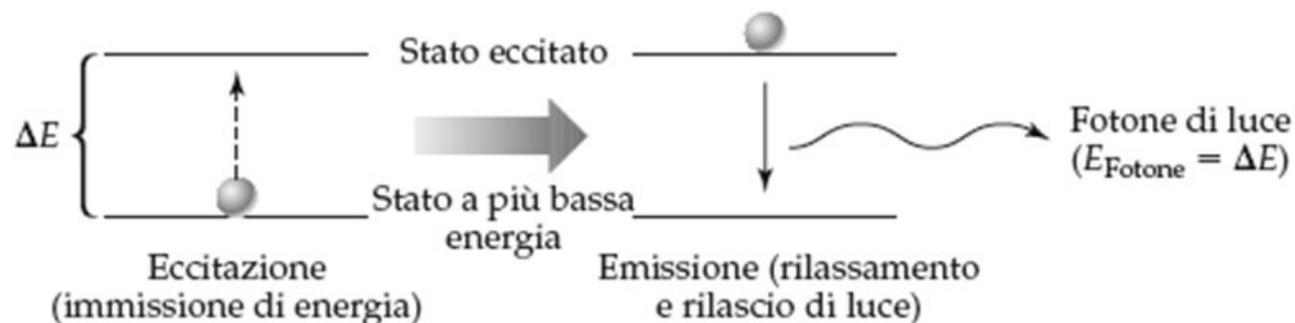
---

# Tecniche analitiche

- Spettroscopia molecolare
  - assorbimento UV-VIS, luminescenza, riflettanza
- Spettrometria di massa
- Tecniche elettrochimiche
- Determinazione dell'attività enzimatica
- Tecniche immunologiche
- Tecniche per la diagnosi molecolare

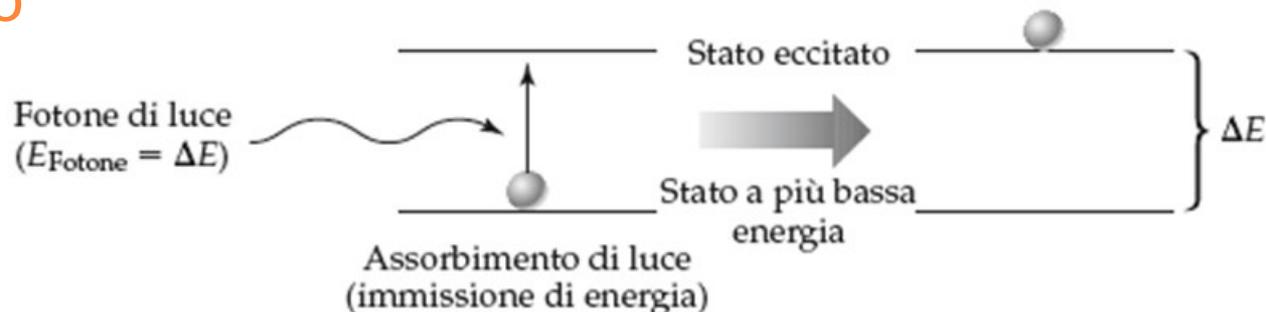
# Metodi spettroscopici: interazioni della radiazione con la materia

## Emissione



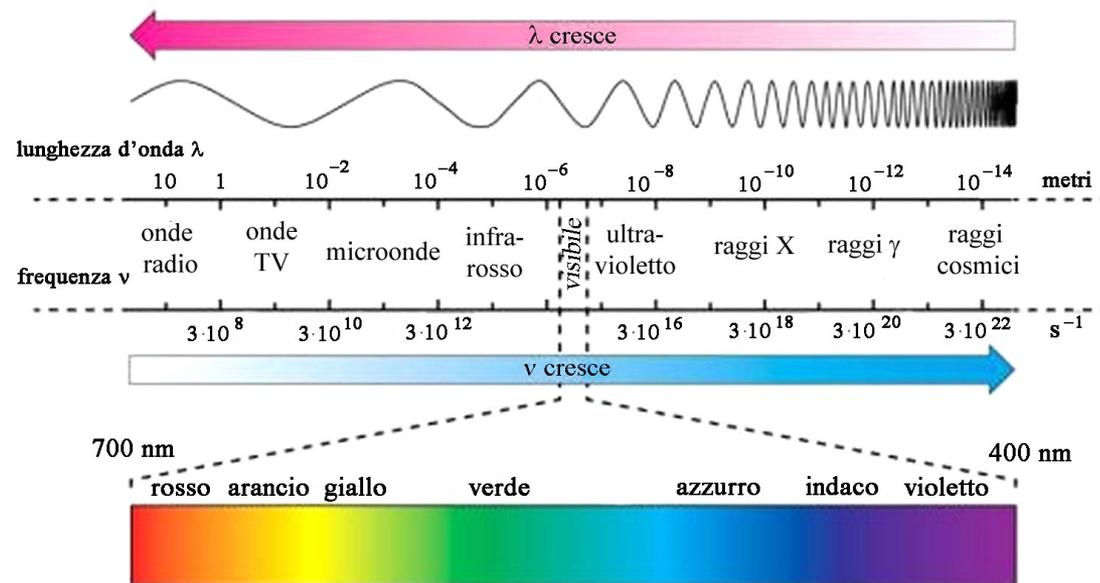
**FIGURA 17.8** Fenomeni coinvolti nell'emissione di luce dalla materia. Il valore di  $\Delta E$  rappresenta la differenza di energia tra lo stato eccitato e uno stato a più bassa energia. Il valore di  $E_{\text{Fotone}}$  rappresenta la quantità di energia trasportata da un fotone di luce emessa.

## Assorbimento



**FIGURA 17.9** Fenomeni coinvolti nell'assorbimento di luce dalla materia. Il valore di  $\Delta E$  rappresenta la differenza di energia tra lo stato eccitato e uno stato a più bassa energia. Il valore di  $E_{\text{Fotone}}$  rappresenta la quantità di energia trasportata da un fotone di luce assorbita.

# Spettroscopia di assorbimento UV-VIS



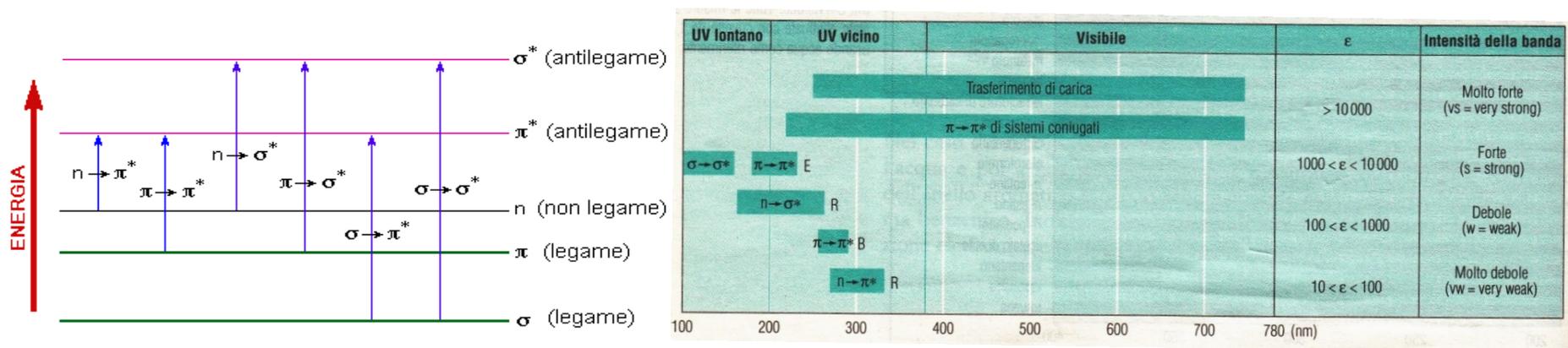
$$E = h\nu$$

$\lambda$  200-800 nm  
 200-400 nm UV  
 400-800 nm VIS

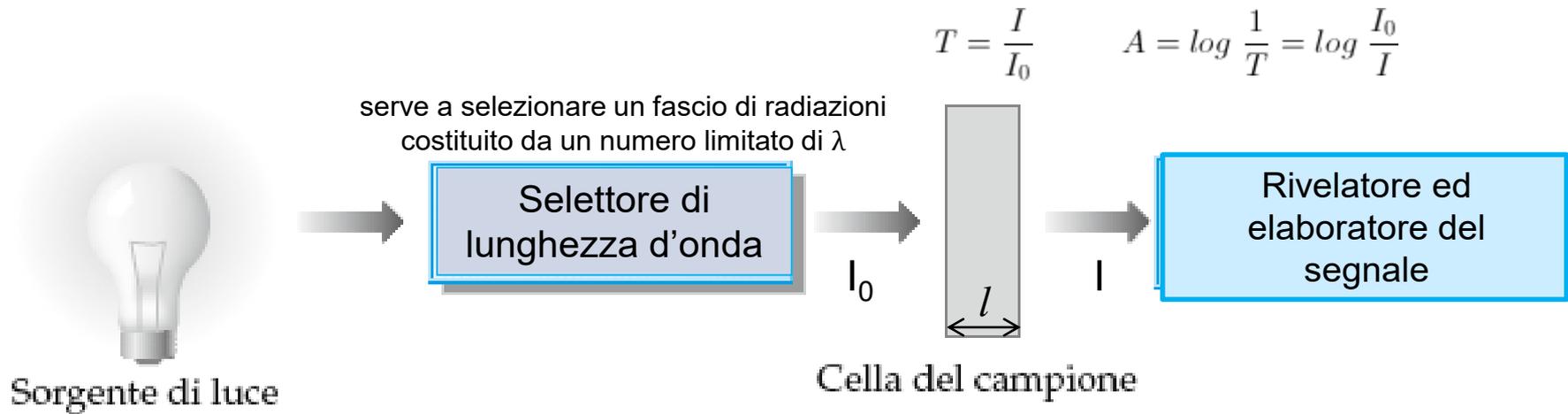
- Tali radiazioni permettono transizioni degli elettroni più esterni delle molecole dallo stato fondamentale a stati eccitati a più alta energia
- Nelle molecole organiche questi elettroni sono gli elettroni di legame, per cui:

In una molecola organica la radiazione assorbita può essere correlata alla tipologia di legami presenti nella specie

# Transizioni elettroniche molecolare nell'UV-VIS



# Spettrofotometro UV-VIS



# Procedura di analisi quantitativa

La spettroscopia UV-VIS è un metodo eccezionalmente valido per analisi quantitative sfruttando l'applicazione della legge di Lambert-Beer

$$A = abc$$

Esistono delle condizioni in cui è valida la legge di Lambert-Beer al di fuori delle quali non c'è linearità di risposta tra A e c:

Si assume che tutte le specie assorbenti agiscano in modo indipendente l'una dall'altra

valida per soluzioni diluite (< 0.01M)

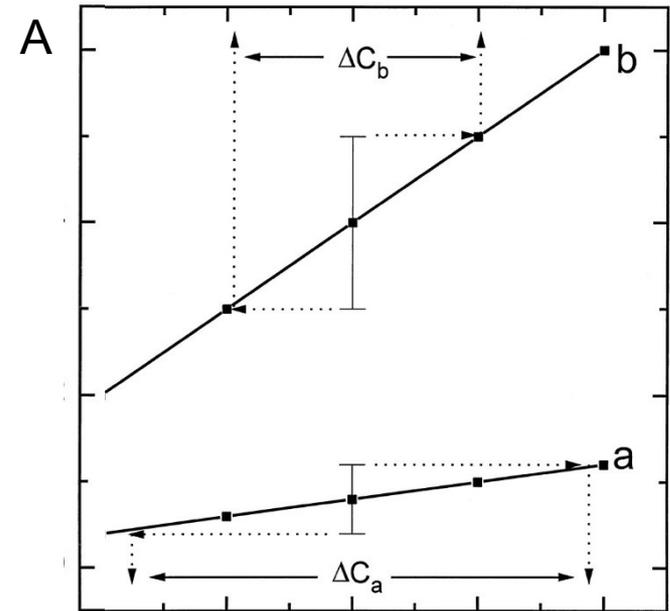
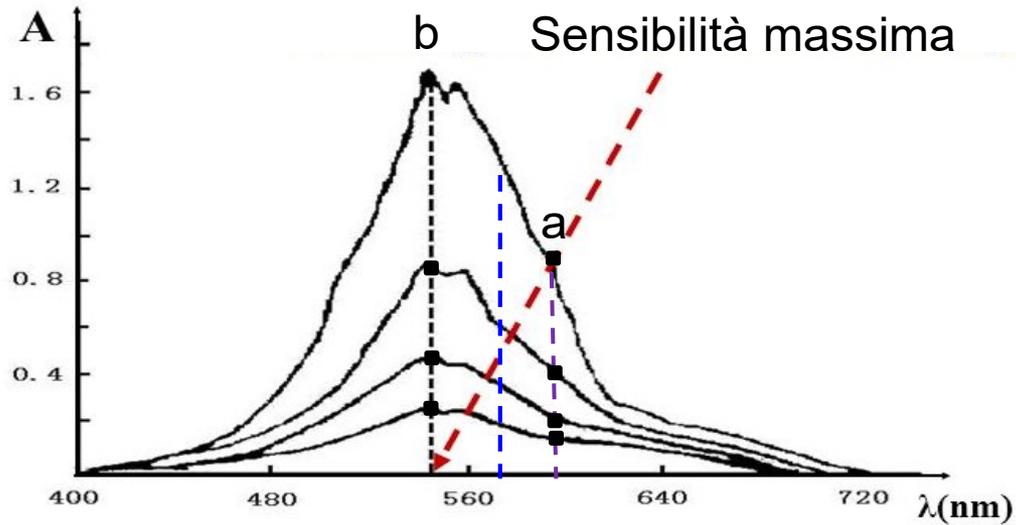
→ Ottimale  
10<sup>-3</sup>-10<sup>-6</sup>M

In soluzioni concentrate si osserva una deviazione negativa:

- Campo elettrico di un analita influenza l'assorbimento da parte di un altro

Misure con elevata sensibilità

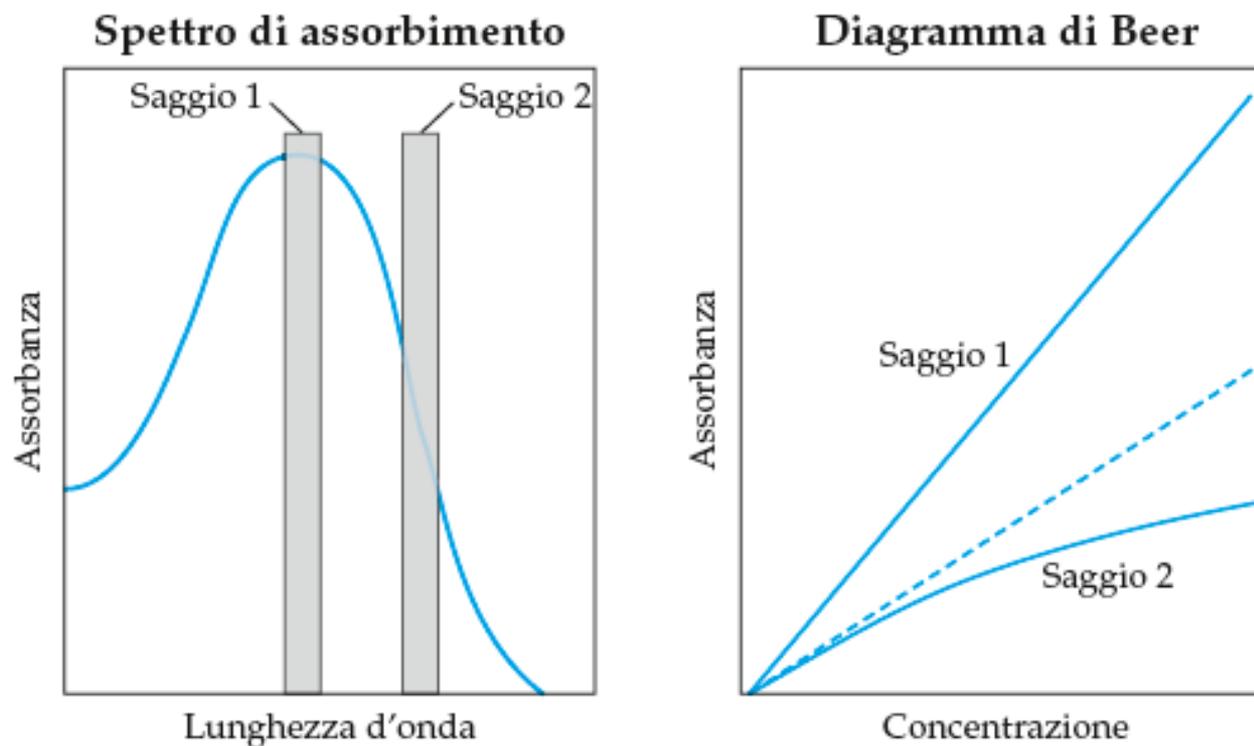
Misura di  $A$  alla  $\lambda$  del massimo di assorbimento



C

Si assume che la luce utilizzata sia monocromatica

Misura di  $A$  alla  $\lambda$  del massimo di assorbimento



**FIGURA 17.20** Effetti della luce policromatica sui grafici ottenuti secondo la legge di Beer.

Si assume che tutti i raggi che attraversano il campione percorrano la stessa distanza



Cammino ottico costante (porta campione quadrato)

Si assume che la concentrazione della specie assorbente sia uniforme in tutto il cammino ottico



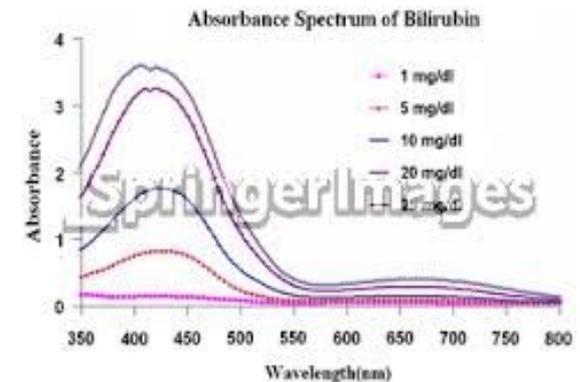
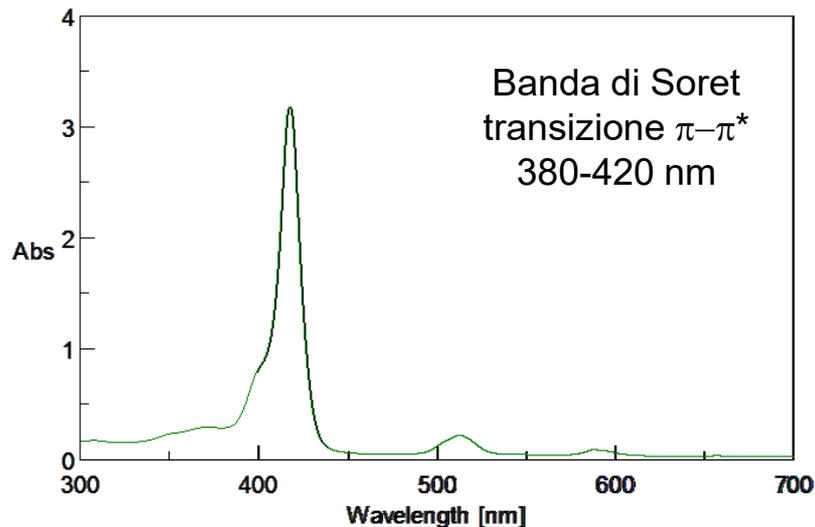
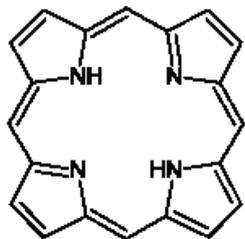
Soluzione omogenea

Si assume che la luce non venga diffusa dal campione

# Procedura di analisi quantitativa

## • Analisi di prodotti che assorbono nell'UV-VIS.

- Molti farmaci: barbiturici, chinino
- Tetrapirroli
  - Coproporfirine (banda di Soret)
  - Bilirubina
  - Emoglobina, carbossemoglobina (cromoproteine)



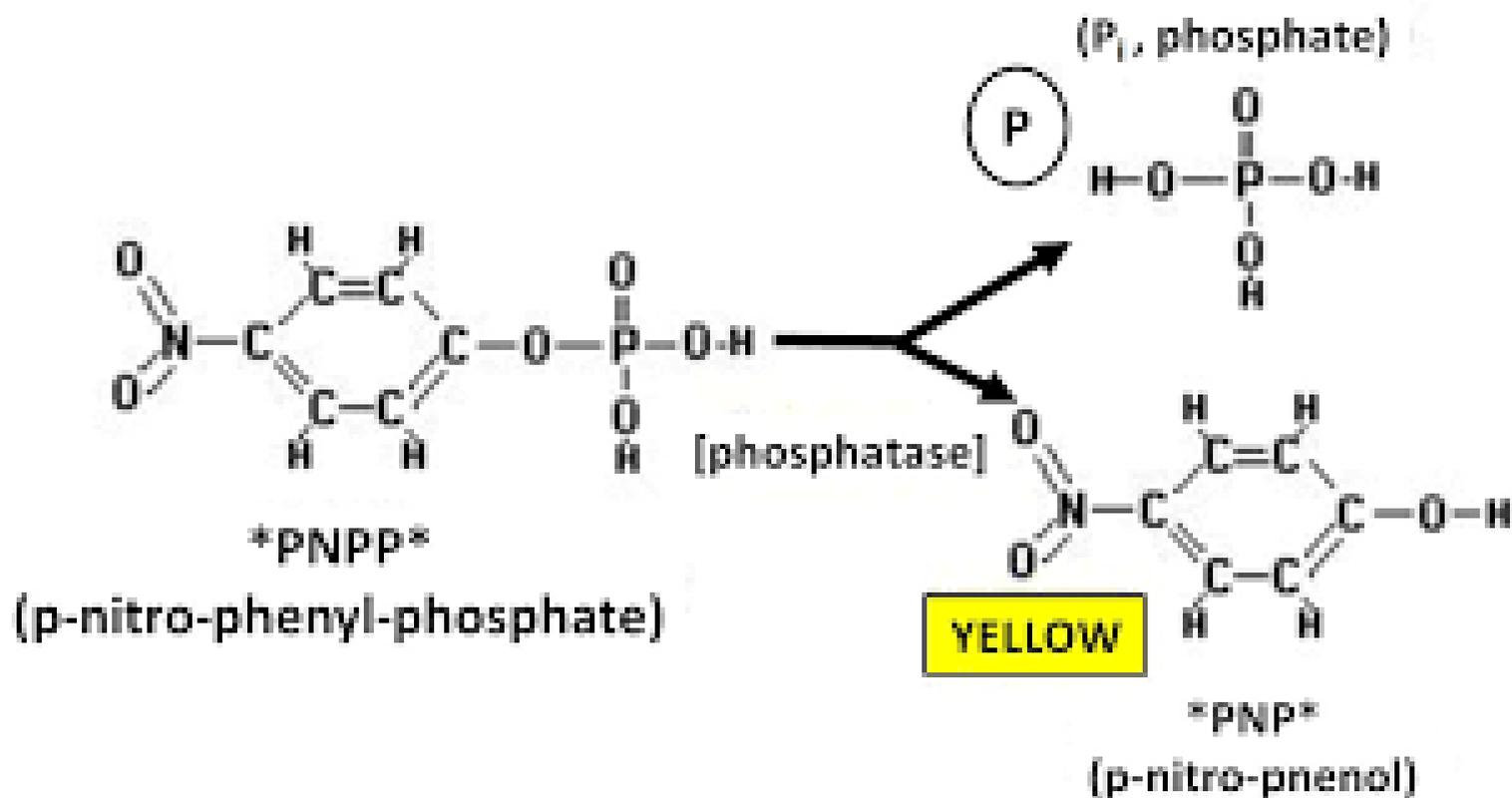
# Procedura di analisi quantitativa

- **Analisi con sviluppo di assorbimento.** Tale procedura richiede un pretrattamento chimico che deve possedere certe caratteristiche:
  - Riproducibilità
  - Conversione stechiometrica
  - Reazione specifica (selettività verso le altre specie presenti)

Le reazioni più comuni sono:

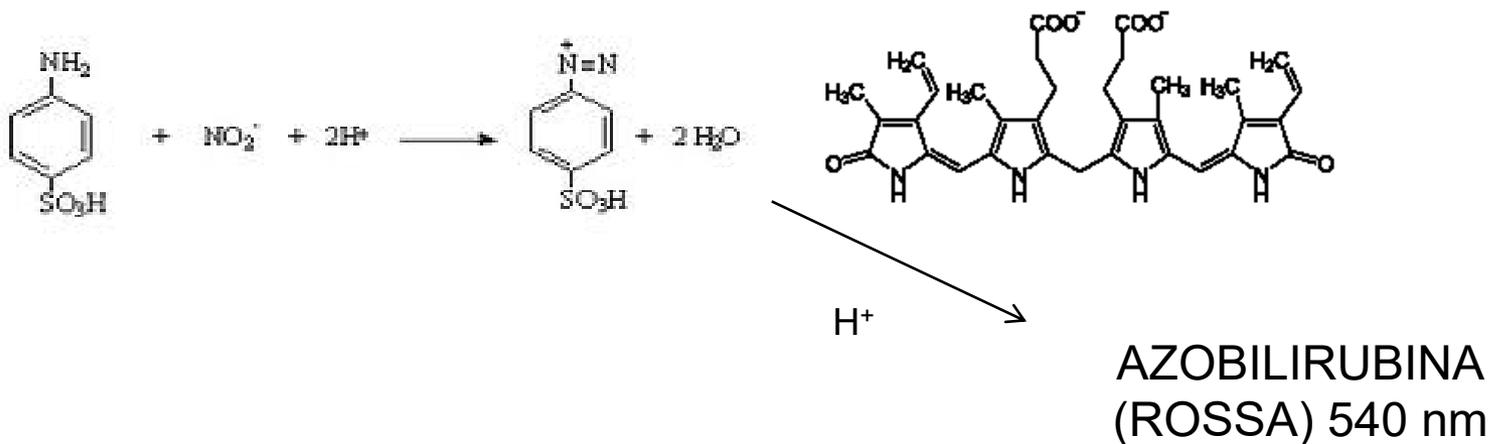
- Formazione di eterocicli condensati colorati
- Idrolisi con formazione di colore
- Ox-Red
- Reazioni di gruppo
- Reazioni di copulazione
- Reazioni di complessazione
- Reazioni di degradazione e rimaneggiamento molecolare
- Reazioni di spostamento

## Idrolisi con formazione di colore



## Copulazione

La bilirubina reagisce con l'acido diazo-solfanilico, dando un composto colorato. La intensità del colore sviluppato alla corretta lunghezza d'onda è proporzionale alla concentrazione della Bilirubina nel campione



# Procedura di analisi quantitativa

Scelta della lunghezza d'onda  $\rightarrow \lambda_{\max}$

## Metodi di analisi quantitativa in UV-VIS:

- Misura diretta
  - Confronto con uno standard:  $A_{st}: C_{st} = A_x: C_x$
  - Determinazione diretta conoscendo la  $\varepsilon$ :  $C = A/\varepsilon b$
- Retta di taratura (standardizzazione esterna)
- Metodo delle aggiunte
- Titolazione spettrofotometrica
- Metodi cinetici

# Determinazione del calcio

## reazione di complessazione

- La tecnica di elezione è l'assorbimento atomico che però non è adatto a misure di routine
- Esistono tecniche elettrochimiche oppure spettrofotometriche
- Metodo dell'arsenazo III

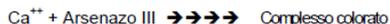
### Determinazione quantitativa del calcio

IVD

Conservare a 2-8°C

#### PRINCIPIO DEL METODO

La misura del calcio nel campione si basa sulla formazione di un complesso di colore blu tra il calcio e l'Arsenazo III in ambiente neutro:



L'intensità del colore formatosi è proporzionale alla conc. del calcio presente nel campione.

#### SIGNIFICATO CLINICO

Il calcio è il più abbondante e uno dei più importanti minerali presenti nel corpo umano. Approssimativamente il 99% del calcio si trova nelle ossa.

Un aumento nei livelli di albumina causa una diminuzione nel calcio serico. Bassi livelli di calcio si riscontrano nell'ipoparatiroidismo, nello pseudoipoparatiroidismo, nella carenza di vitamina D, malnutrizione e malassorbimento intestinale.

Tra le cause di ipercalcemia ci sono i tumori, la grossa immissione di vitamina D, l'aumento della ritenzione renale, l'osteoporosi, la sarcoidosi, la tirotossicosi, l'iperparatiroidismo.

La diagnosi clinica non dovrebbe essere fatta sul risultato di un singolo test; essa dovrebbe integrare i dati clinici e gli altri dati di laboratorio.

#### REAGENTI

R	Tampone Imidazolo	100 mmol/L
Arsenazo III	Arsenazo III	120 mmol/L
Cal. Calcio	Std. primario acquoso di calcio	10 mg/dL

PREPARAZIONE: tutti i reagenti sono pronti all'uso.

#### CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Tutti i componenti del kit sono stabili fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta se conservati ben chiusi a 2-8°C, protetti dalla luce e se si evitano contaminazioni durante l'uso.

Non utilizzare i reagenti oltre la data di scadenza.

**Cal. Calcio:** una volta aperto il flacone, il reagente è stabile fino a 1 mese se conservato ben chiuso a 2-8°C, protetto dalla luce e se si evitano contaminazioni durante l'uso.

#### Segnali di deterioramento dei reagenti:

- presenza di particelle e torbidità;
- assorbimento del bianco (A) a 650 nm > 0.25.

#### MATERIALE ADDIZIONALE

- Spettrofotometro o colorimetro che misuri a 650 nm.
- Cuvette con cammino ottico di 1 cm.
- Attrezzatura generale di laboratorio.

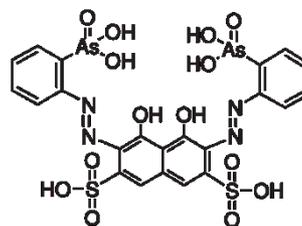
#### CAMPIONI

Siero o plasma. Separare appena possibile dall'emazie. Anticoagulanti come ossalato o EDTA non sono utilizzabili perché questi composti chimici possono risultare agenti fortemente chelanti per il calcio.

Urine: raccogliere le urine delle 24 ore in contenitori liberi da calcio. Il contenitore di raccolta deve contenere 10 ml di ac. Nitrico diluito (50% v/v).

Diluire un campione di urine 1:2 con acqua dist. Mescolare. Moltiplicare i risultati x 2.

Stabilità dei campioni: il calcio è stabile 10 gg. a 2-8°C.



#### PROCEDIMENTO

- Condizioni operative:
  - Lunghezza d'onda: 650 nm
  - Cuvette: cammino ottico 1 cm
  - T. costante: 37°C/15-25°C
- Azzerare lo strumento contro acqua distillata.
- Pipettare in cuvetta:

	Bianco	Standard	Campione
R 1 (mL)	1.0	1.0	1.0
Standard (μL)	---	10	---
Campioni (μL)	---	---	10

- Mescolare e incubare per 2 minuti a T.A.
- Leggere l'Assorbanza (A) dei campioni e dello standard, contro il bianco. Il colore è stabile per almeno 1 ora.

#### CALCOLI

$$\frac{(A) \text{ camp.}}{(A) \text{ std.}} \times 10 (\text{conc. std.}) = \text{mg/dL calcio nel campione}$$

Per urine 24h:  $\frac{(A) \text{ camp.}}{(A) \text{ std.}} \times 10 \times \text{vol. (dL) ur. 24h} = \text{mg/24h calcio}$

Fattore di conversione: mg/dL x 0.25 = mmol/L.

#### CONTROLLO QUALITÀ

Si consiglia di utilizzare dei sieri di controllo per monitorare le performance del procedimento.

Se i valori dei controlli sono al di fuori del range definito, controllare lo strumento, i reagenti e la tecnica per determinare i problemi.

Ciascun laboratorio dovrebbe stabilire un proprio schema di Controllo di Qualità e le azioni correttive se i controlli non rientrano nei limiti di tollerabilità.

#### VALORI DI RIFERIMENTO

Siero o plasma:

Adulti	8.5-10.5 mg/dL	o	2.1-2.6 mmol/L
Bambini	10-12 mg/dL	o	2.5-3.0 mmol/L
Neonati	8-13 mg/dL	o	2.0-3.25 mmol/L

Urine

Adulti	50-300 mg/24 h	o	1.25-7.5 mmol/24 h
Bambini	80-160 mg/24 h	o	2-4 mmol/24 h

# Applicazioni

**Tabella 7.2. Applicazioni della fotometria per la misura di analiti di interesse in chimica-clinica**

Sostanze	Reazione analitica
1) Carboidrati e metaboliti	
Glucosio	Glucosio ossidasi-perossidasi; esochinasi-glucosio-6-fosfato deidrogenasi; o toluidina ecc.
Acido lattico-piruvico	Conversione NAD-NADH in presenza di LDH
Galattosio	Conversione NAD-NADH in presenza di Gal-DH
D-Xiloso	Condensazione dei furfurolo con p-bromo-anilina
2) <i>Azoto non proteico</i>	
Urea	Ureasi-reazione Berthelot; condensazione con diacetilmonossina (in presenza di antipirina o tiosemicarbazide)
Acido urico	Riduzione dell'acido fosfotungstico o decremento dell'assorbimento nell'ultravioletto dopo trattamento con <u>uricasi</u>
Creatina-creatinina	Reazione di Jaffè, con picrato alealino
Ammoniaca	Reazione di Berthelot o <u>conversione NAD-NADH in presenza di glutamato-deidrogenasi</u>
3) <i>Proteine</i>	
Albumina	Lettura ultravioletto; dosaggio dell'ammoniaca con reazione Berthelot dopo mineralizzazione; reazione con biureto; reazione con biureto più reattivo Folin-Ciocalteu Reazione con bromocresolo; reazione con HABA

Sostanze	Reazione analitica
4) <i>Enzimi</i> Deidrogenasi; AST; ALT; CPK; fosfatasi-colinesterasi $\gamma$ GT ecc.	Test ottico semplice per deidrogenasi; test ottico accoppiato per AST; ALT-CPK ecc., impiego di substrati sintetici per fosfatasi, colinesterasi, leucinamino peptidasi $\gamma$ GT ecc.
5) <i>Emoglobina e metaboliti</i> Emoglobina Carbossiemoglobina Bilirubina Porfobilinogeno Acido $\delta$ -aminolevulinico  Uro e coproporfirine	Reattivo di Drabkin; reattivo di Vanzetti Auto-assorbimento Reattivo di Ehrlich; autoassorbimento Reattivo di Ehrlich aldeidico Reattivo di Ehrlich aldeidico dopo condensazione con acetil-acetone  Autoassorbimento nella banda di Soret
6) <i>Elettroliti e oligominerali</i> Calcio Magnesio Cloro ioni Fosfati inorganici Ferro Rame Piombo	Acido cloranilico; o-cresoltalein-complexione ecc. Giallo titanio Mercurio cloranilato Molibdato piú riduzione Batofenantrolina solfonata-TPTZ-ferrozina Neocupreina - dietilditiocarbammato Difeniltiocarbazone
7) <i>Lipidi</i> Lipidi totali Colesterolo Trigliceridi  NEFA TEFA	Reagente solfofosfovanillico Reattivo Liebermann-Burchard; $\text{FeCl}_3\text{-H}_2\text{SO}_4$ Test ottico accoppiato (glicerochinasi-NAD-NADH); acido cromotropico Ioni $\text{Cu}^{++}$ - dietilditiocarbammato Idrossilamina - $\text{Fe}^{+++}$
8) <i>Ormoni</i> 17-chetosteroidi 17-idrossicorticosteroidi Pregnandiolo Estriolo Iodoproteine-tirosina Acido 5-idrossiindolacetico Acido 4-idrossi-3-metossimandelico	Reazione di Zimmermann (m-dinitrobenzene) Reazione di Porter-Silber (fenilidrazina) $\text{H}_2\text{SO}_4$ 80% Reazione Kober (p-idrochinone- $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) Reazione cerico-arseniosa (catalizzata dagli ioni $\text{I}^-$ ) Reazione $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naftolo + $\text{HNO}_2$ Ossidazione a vanillina

Sostanze	Reazione analitica
<i>9) Sostanze usate per studi funzionali</i>	
Inulina	Reazione con antrone
Acido p-aminoippurico	Reazione di Bratton-Marschall (diazotazione e copulazione con N(1-naftil) etilendiamina)
Fenosulfonftaleina	Variazione di pH
Tetrabromofenolftaleina	Variazione di pH
Rosso Congo	Autoassorbimento
<i>10) Farmaci e veleni</i>	
Salicilati	Fe <sup>+++</sup>
Sulfamidici	Reazione di Bratton-Marschall
Barbiturici	Autoassorbimento nell'ultravioletto
Etanolo	<u>Test ottico (deidrogenasi NAD-NADH)</u>

# Tecniche analitiche

- Spettroscopia molecolare
  - assorbimento UV-VIS, **luminescenza**, riflettanza
- Spettrometria di massa
- Tecniche elettrochimiche
- Determinazione dell'attività enzimatica
- Tecniche immunologiche
- Tecniche per la diagnosi molecolare

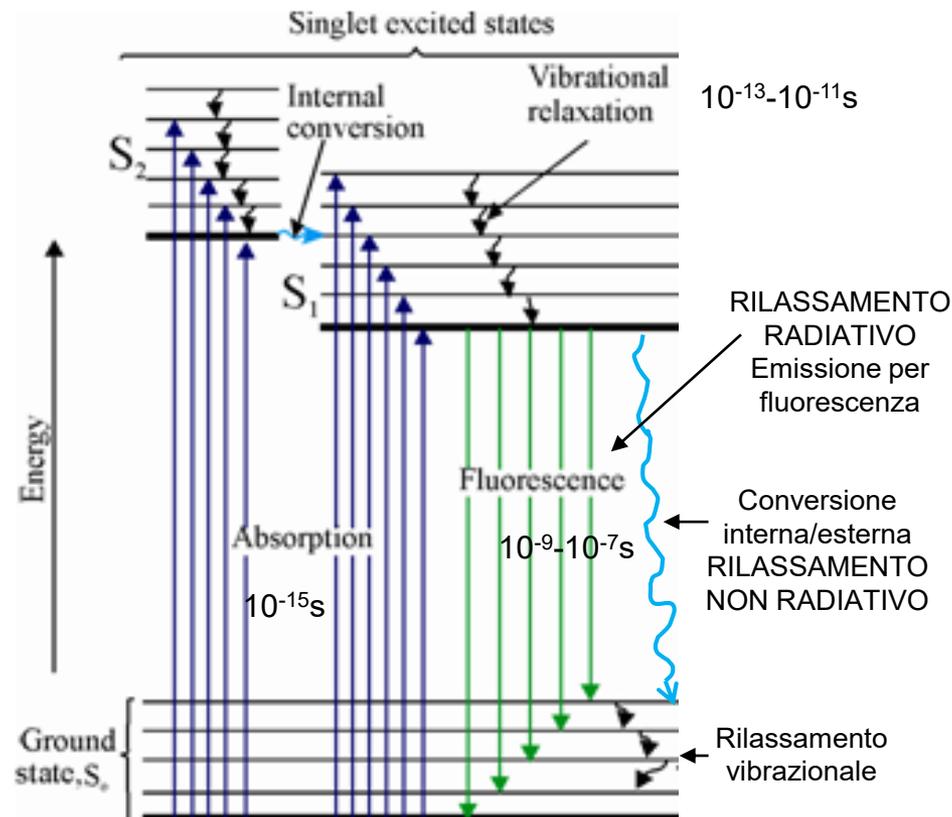
# Luminescenza

Fenomeno fisico che consiste nell'emissione di fotoni di luce da parte di materiali eccitati da cause diverse della temperatura.

A seconda della causa si distinguono:

- Bioluminescenza
- Chemiluminescenza
- Elettroluminescenza
- Fotoluminescenza
  - Fosforescenza
  - Fluorescenza
- Radioluminescenza
- Sonoluminescenza
- Termoluminescenza
- Triboluminescenza

# Spettroscopia di fluorescenza



La fluorescenza è la proprietà di alcune sostanze di riemettere le radiazioni elettromagnetiche ricevute.

Sensibilità 1000 volte superiore alla spettrometria per assorbimento

- Nella fluorescenza, essendo che parte dell'energia assorbita viene persa per rilassamento vibrazionale, l'energia della radiazione emessa avrà minore energia, cioè maggiore  $\lambda$ : **legge di Stokes**
- La differenza di  $\lambda$  è detta **Stokes shift**
- **Resa quantica di fluorescenza** è la frazione di molecole eccitate che emettono radiazioni (quindi va da 0 a 1),  $\phi$

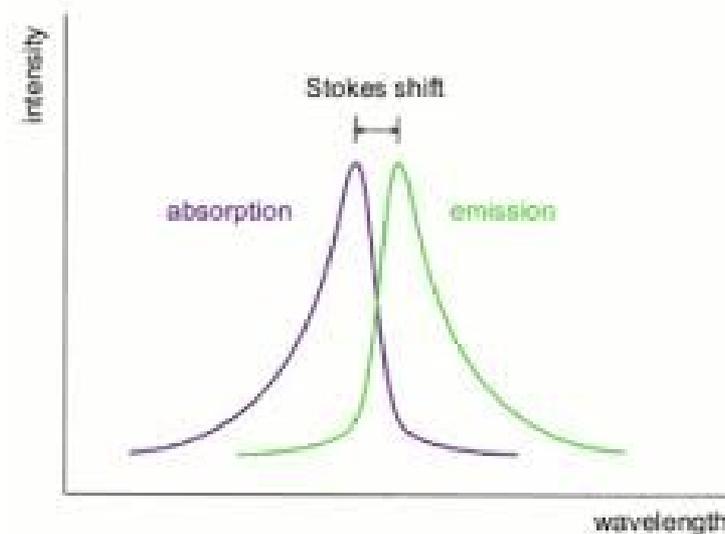
- $\lambda_{\text{ex}} < 250 \text{ nm}$  non danno fluorescenza
- Si osserva fluorescenza per transizioni

- $\pi^* \rightarrow \pi$  e  $\pi^* \rightarrow n$

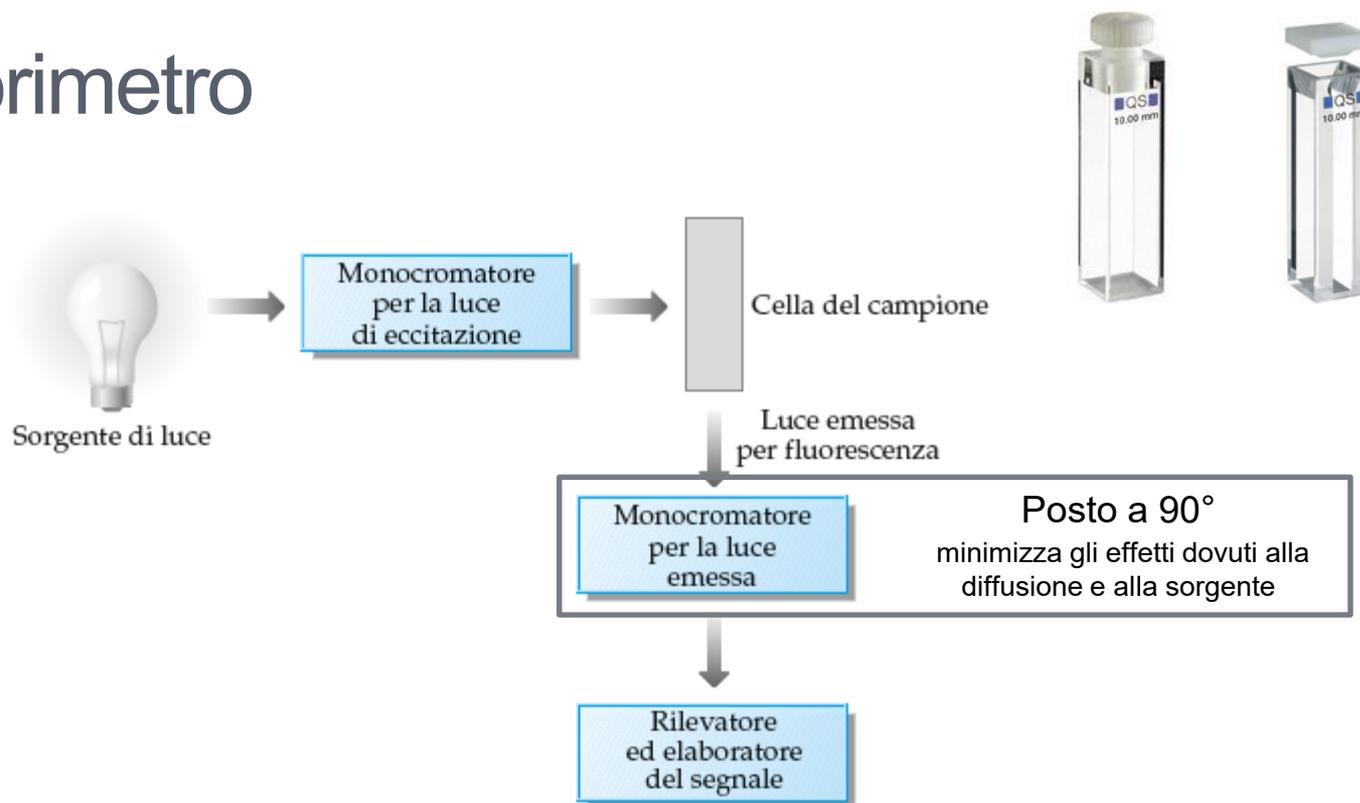
- **Gruppi aromatici**
- Gruppi carbonilici alifatici e aliciclici
- Strutture con doppi legami ad elevata coniugazione

- $\phi$  maggiore per  $\pi^* \rightarrow \pi$

- Intensità di fluorescenza direttamente proporzionale a concentrazione dell'analita e  $\phi$



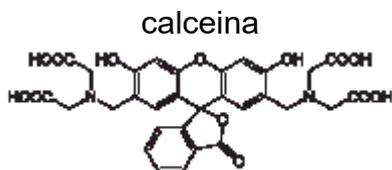
# Spettrofluorimetro



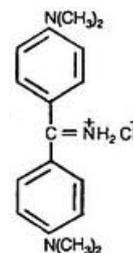
**FIGURA 18.21** Schema generale di uno spettrofluorimetro. In questo strumento sono presenti due monocromatori. Il primo seleziona la lunghezza d'onda della luce proveniente dalla sorgente utilizzata per l'eccitazione del campione. Il secondo seleziona le lunghezze d'onda della luce emessa dal campione per fluorescenza prima della misurazione. Se si varia la lunghezza d'onda al primo monocromatore mentre si mantiene costante quella al secondo, il grafico risultante che descrive l'intensità della fluorescenza in funzione della lunghezza d'onda prende il nome di "spettro di eccitazione". Al contrario se si mantiene costante la lunghezza d'onda al primo monocromatore variando invece quella al secondo, il grafico risultante intensità della fluorescenza/lunghezza d'onda viene detto "spettro di emissione" (o "spettro di fluorescenza".)

# Applicazioni

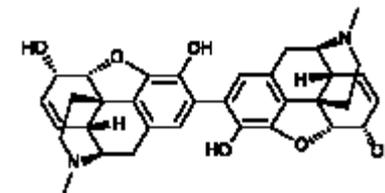
Sostanza	Reazione per la fluorescenza	Sostanza	Reazione per la fluorescenza
<i>Aminoacidi</i>		<i>Porfirine</i>	
Fenil-alanina	Ninidrina + leucilanina	Uroporfirina	Fluorescenza naturale
Tirosina	1) fluorescenza naturale 2) 1 - nitroso - 2- naftolo	Coproporfirina	Fluorescenza naturale
<i>Cationi</i>		<i>Proteine</i>	
Calcio	Calceina	Albumina	Acido 1 - anilino - naftalen - 8 - solfonico
Magnesio	1) o, o' - diidrossi-benzene 2) 8 - idrossichinolina	<i>Acidi nucleici</i>	
<i>Ormoni e metaboliti</i>		DNA	Auramina
Cortisolo	Riarrangiamento chimico in etanolo - H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<i>Farmaci e droghe</i>	
Estrogeni	Reazione di Kober in H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Barbiturici	Fluorescenza naturale
Catecolamine	Ossidazione - adrenocromo	Salicilati	Fluorescenza naturale
<i>Lipidi</i>		Chinidina	Fluorescenza naturale
Trigliceridi	Glicerina - formolo + acetilacetone + NH <sub>4</sub> - 3,5 diacetil - 1,4 diidrolutidina	LSD	Fluorescenza naturale
Colesterolo	Riarrangiamento chimico in H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Indometacina	Fluorescenza naturale
Lipoproteine	Colorazione con protoporfirina o tetraciclina	Fenotiazine	Ossidazione
<i>Enzimi</i>		Librium	Lattame
NAD e NADP dipendenti (AST - ALT - CK - LDH)	NADH	Eroina-morfina	Pseudomorfina
Isoenzimi (LDH - fosfatasi ecc.)		<i>Cataboliti</i>	
Fosfatasi - glucoronidasi	Substrati sintetici	Urea	Diacetilmonossina
Colinesterasi - glicosidasi		Acido urico	Uricasi-perossidasi + acido omovanillico
Carbossipeptidasi ecc.		Bilirubina	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85% - albumina



Complesso del  
magnesio con 8-  
idrossichinolina



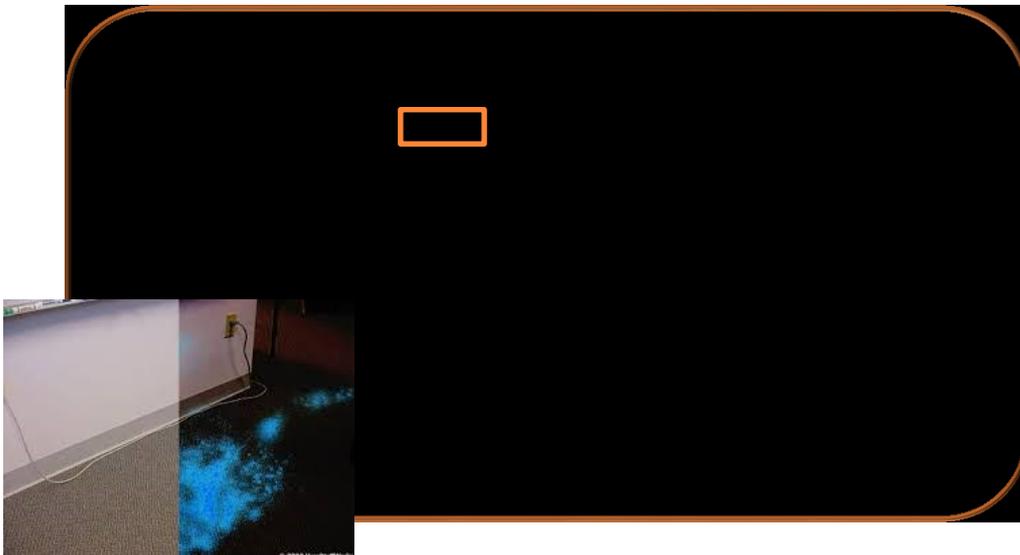
auramina



pseudomorfina

# Chemiluminescenza

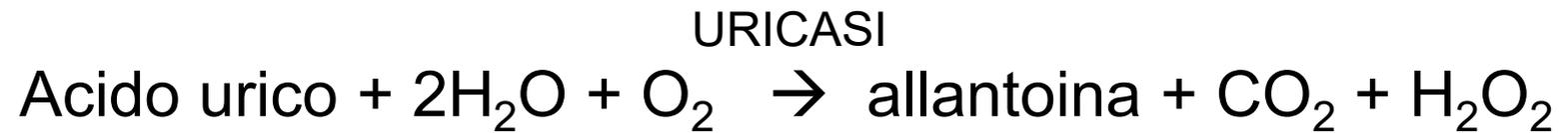
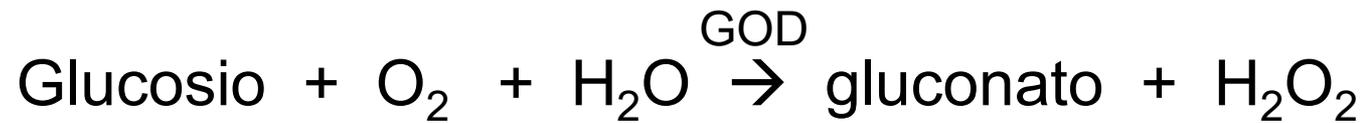
- Lo stato elettronico eccitato della molecola viene prodotto da una reazione chimica
- Un luminometro non necessita di una lampada ma solo di un fotomoltiplicatore
- Le reazioni devono produrre energia sufficiente a provocare un'attivazione elettronica, quindi esoergoniche, come le ossidazioni:



Può essere misurata qualunque sostanza di interesse biologico che può essere coinvolta in reazioni enzimatiche che producono  $H_2O_2$

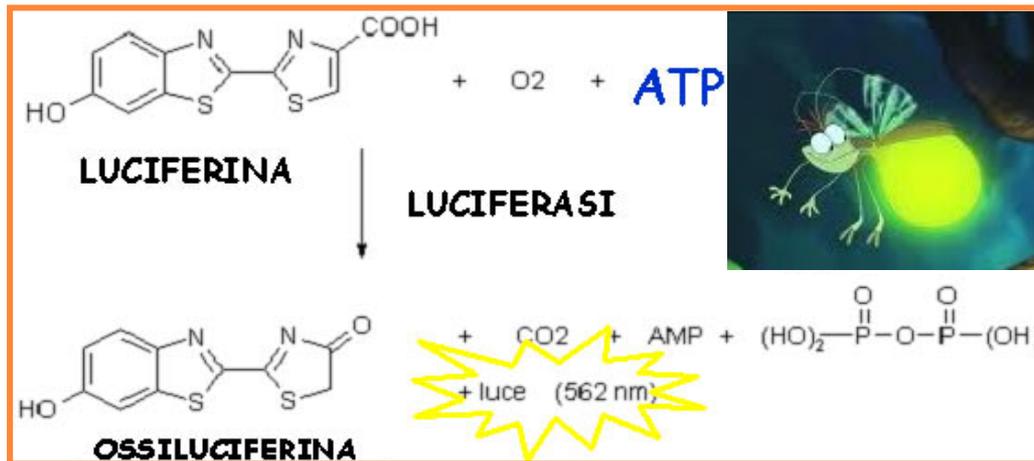


- Determinazione quantitativa di differenti ossidasi
- Determinazione di substrati (Glu, Ipoxantina, Acido urico, Colesterolo, ecc.)



# Bioluminescenza

- Lo stato elettronico eccitato della molecola viene prodotto da una reazione chimica mediata da un organismo vivente
- La sostanza coinvolta generalmente in queste reazioni è la **luciferina** che tramite l'intervento della **luciferasi** (estratta dalla lucciola) catalizza la reazione:



Può essere misurata l'ATP, tutte le attività enzimatiche ATP dipendenti (chinasi) e anche i substrati corrispondenti (ADP, creatinfosfato, glucosio, ecc)

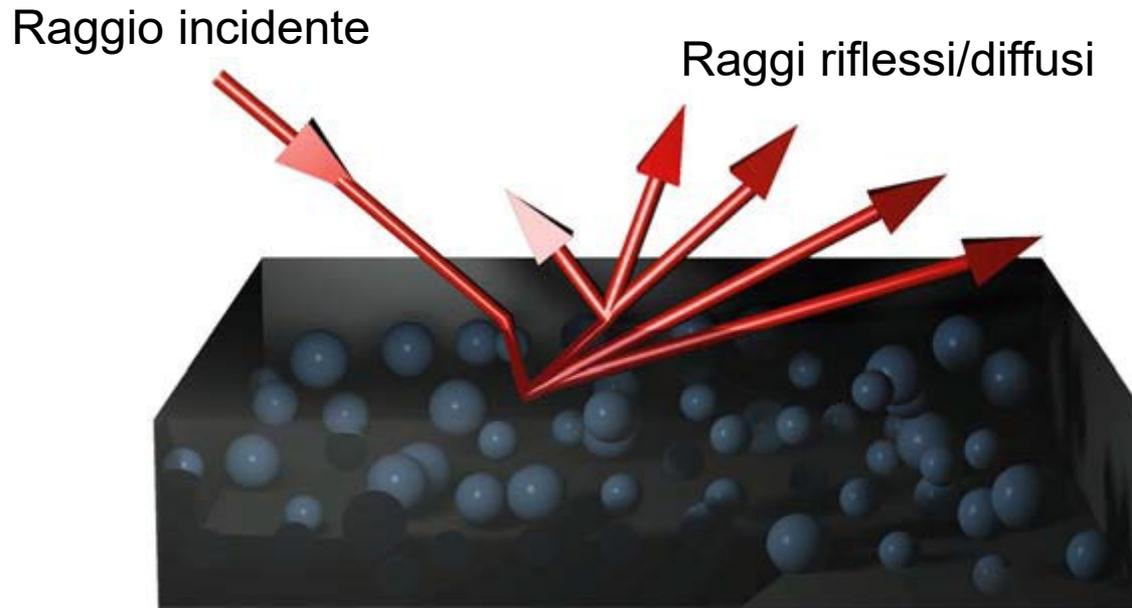
Sensibilità  $10^{-14}M$ , linearità in 2-3 ordini di concentrazione

# Tecniche analitiche

- Spettroscopia molecolare
  - assorbimento UV-VIS, luminescenza, riflettanza
- Spettrometria di massa
- Tecniche elettrochimiche
- Determinazione dell'attività enzimatica
- Tecniche immunologiche
- Tecniche per la diagnosi molecolare

# SPETTROSCOPIA DI RIFLETTANZA

Studia la luce in funzione della lunghezza d'onda riflessa o diffusa da un solido



Il campione assorbe alcune componenti della radiazione incidente riducendo l'intensità di luce diffusa

# SPETTROSCOPIA DI RIFLETTANZA

Reazioni cromogene su supporto solido  
(cellulosa modificata o altri materiali)

**DRY  
CHEMISTRY**

Zone reattive delimitate



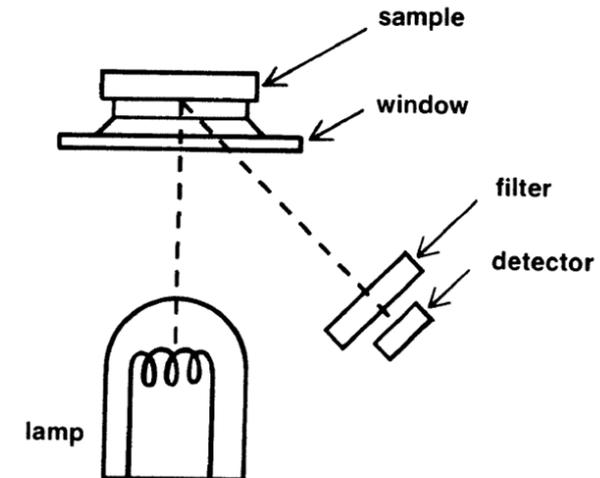
ANALITA  
nel fluido biologico

Intensità della colorazione in funzione  
della concentrazione dell'analita

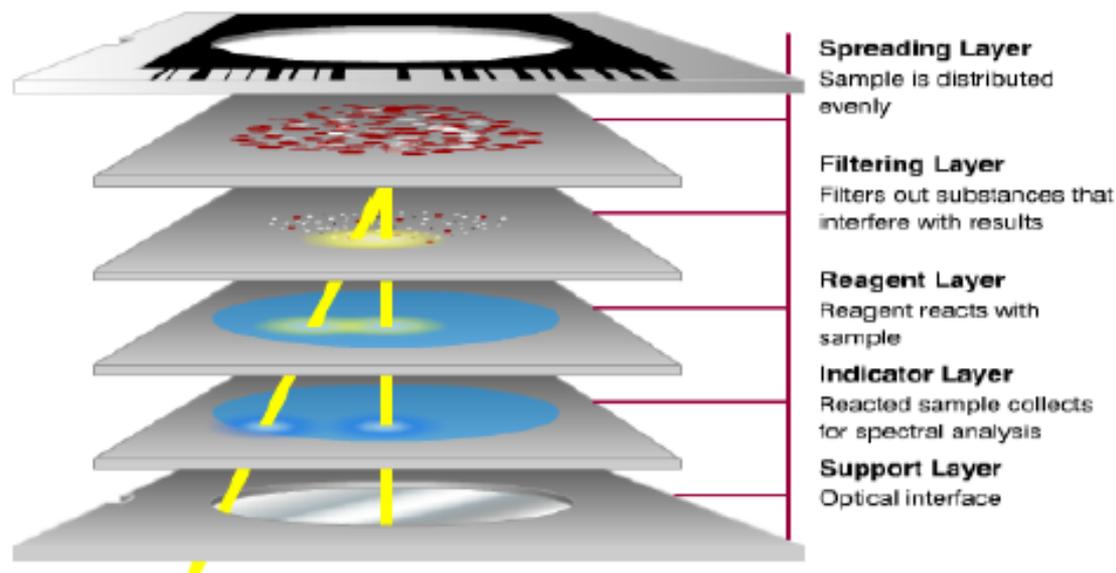


Misura della luce  
riflessa

**ANALISI QUANTITATIVA**



# dry slide technology



- **Tecnica vantaggiosa:**

- Possibile applicare reattivi diversi in diverse zone dello stesso supporto (strisce ad immersione per l'analisi delle urine)
- Reattivi nel supporto allo stato secco quindi facilità di conservazione
- I reattivi possono essere stratificati, quindi separati l'uno dall'altro (dissoluzione solo al momento dell'analisi)
- La zona reattiva può essere costruita in modo da assorbire una quantità standard di campione

## Applicazioni della spettroscopia a riflettanza

- Glucosio
- Colesterolo totale
- Colesterolo HDL
- Trigliceridi
- Creatinina
- Enzimi: Gamma glucosio transferasi, GOT (AST), GPT (ALT)
- Emoglobina
- Anaboliti e cataboliti vari nelle urine (acido urico)

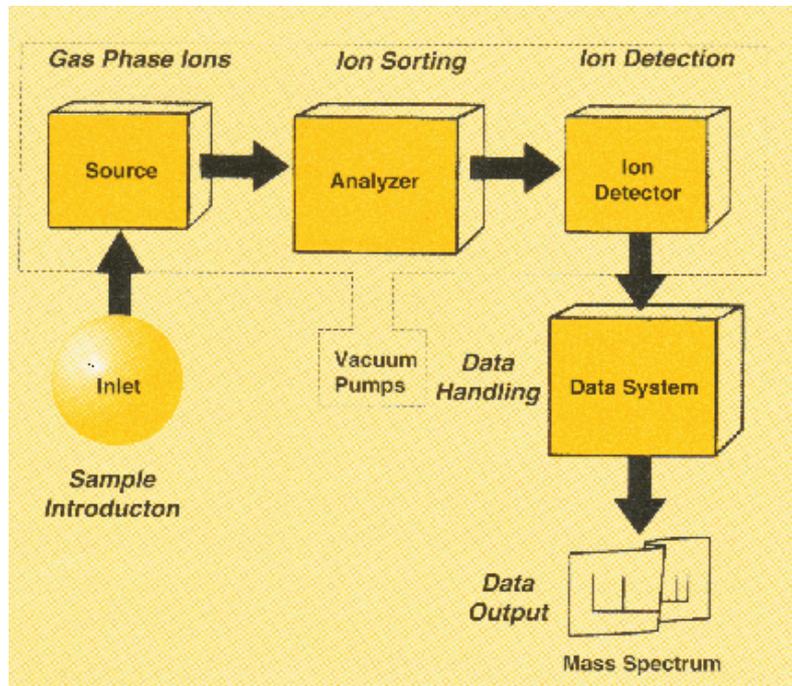


# Tecniche analitiche

- Spettroscopia molecolare
  - assorbimento UV-VIS, luminescenza, riflettanza
- Spettrometria di massa
- Tecniche elettrochimiche
- Determinazione dell'attività enzimatica
- Tecniche immunologiche
- Tecniche per la diagnosi molecolare

# Spettrometria di massa

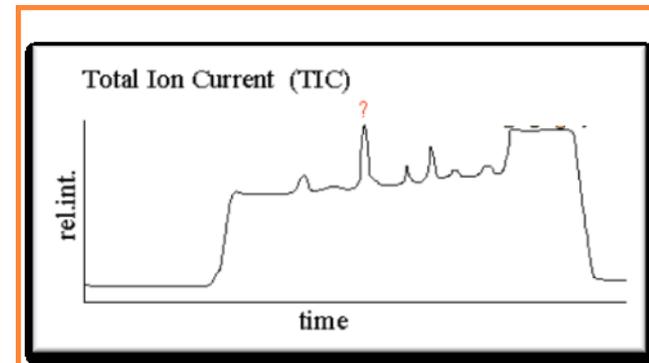
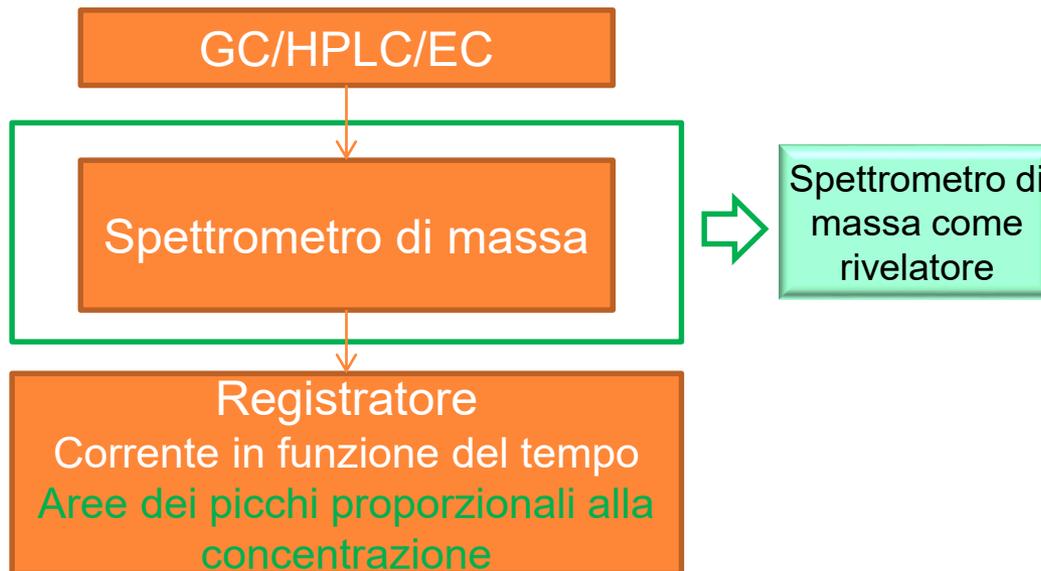
Tecnica che consente di separare gli ioni gassosi in funzione del rapporto massa/carica ( $m/z$ )



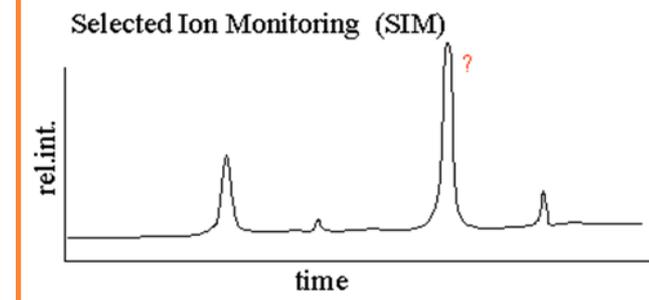
Le molecole di analita vengono inserite nella sorgente di ionizzazione dove vengono ionizzate acquistando una carica positiva o negativa. Gli ioni poi viaggiano all'interno dell'analizzatore dove vengono separati secondo il loro rapporto  $m/z$  e poi a contatto con il rivelatore si genera un segnale che va a formare uno spettro di massa.

# Analisi quantitativa in spettrometria di massa

- Quando si lavora su liquidi biologici è indispensabile l'accoppiamento con il sistema cromatografico

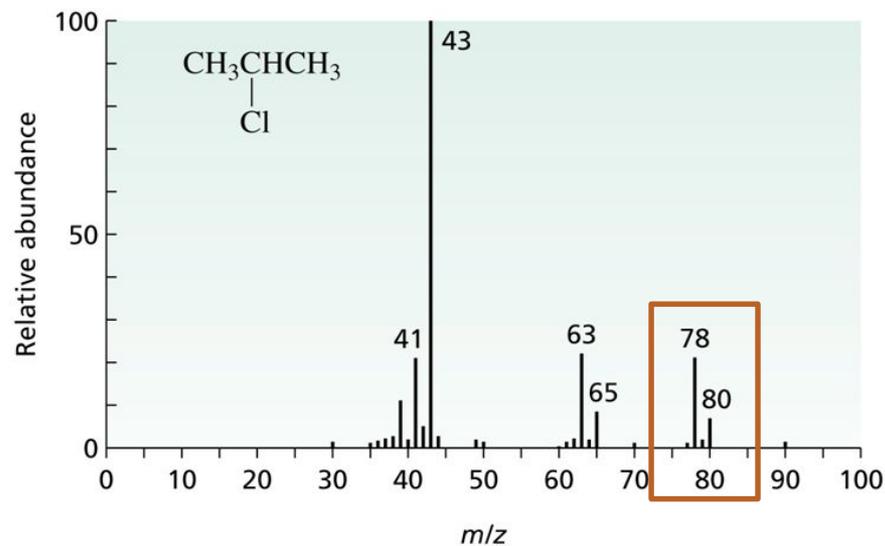
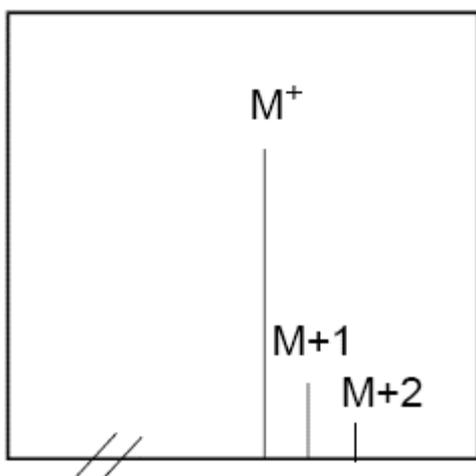


## Massa come rivelatore in cromatografia



*Picchi isotopici*, dipendono da:

- abbondanza naturale degli isotopi più pesanti presenti nella molecola
- numero di atomi dell'elemento che presenta degli isotopi più pesanti

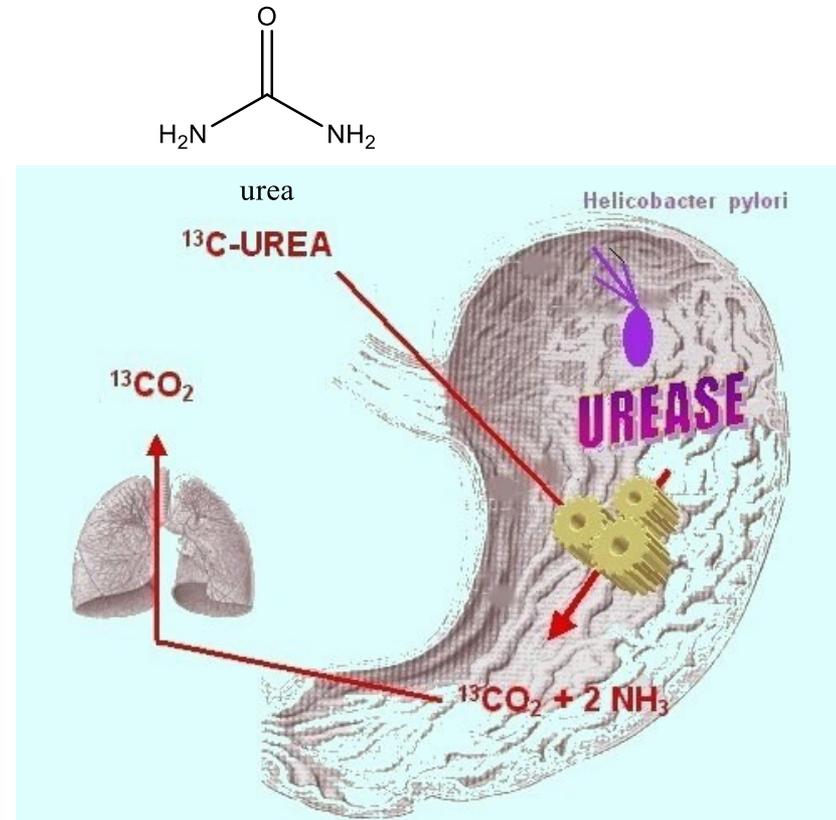


Abbondanza isotopica Cl

$^{35}\text{Cl}$  (75.77%) 3 :  $^{37}\text{Cl}$  (24.23%) 1

# $^{13}\text{C}$ -Urea Breath Test

- L'*Helicobacter pylori* è considerato la maggior causa di gastrite cronica ma è anche importante per la patogenesi dell'ulcera peptica e del carcinoma gastrico.
- Procedura poco invasiva, basata sulla capacità di *H. pylori* di metabolizzare l'urea somministrata per bocca, fino a ottenere ammoniaca e anidride carbonica.
- Se l'urea viene marcata con  $^{13}\text{C}$ , non radioattivo e presente in natura, si può misurare l'eliminazione attraverso il respiro, di anidride carbonica marcata.
- Un suo aumento tra due prove consecutive (prima e mezz'ora dopo la somministrazione dell'urea) è indice indiretto della presenza di infezione, si rileva quindi la presenza di battere attivo
- Nel test UBT viene misurato il  $^{13}\text{C}$  come rapporto tra i picchi degli isotopi  $^{13}\text{CO}_2$ : $^{12}\text{CO}_2$  (45:44)
- La tecnica è accoppiata ad un GC che permette di isolare l'anidride carbonica dal resto delle molecole contenute nel respiro

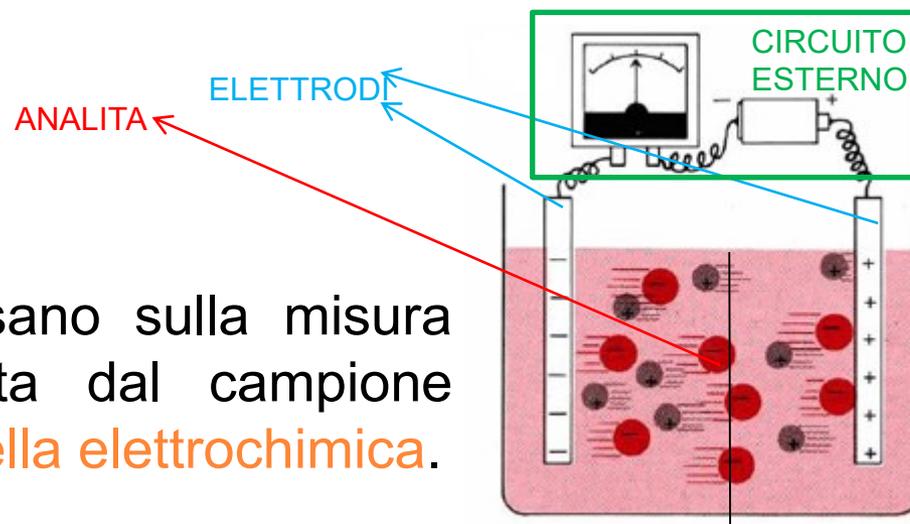


# Tecniche analitiche

- Spettroscopia molecolare
  - assorbimento UV-VIS, luminescenza, riflettanza
- Spettrometria di massa
- Tecniche elettrochimiche
- Determinazione dell'attività enzimatica
- Tecniche immunologiche
- Tecniche per la diagnosi molecolare

# Elettrochimica

I metodi elettrochimici si basano sulla misura della risposta elettrica fornita dal campione quando viene inserito in una **cella elettrochimica**.



Una cella elettrochimica è formata da:

- due conduttori solidi (**elettrodi**)
- collegati ad un circuito esterno e
- separati da una soluzione elettrolitica (**contenente l'analita**) dove una reazione chimica produce (pile, **potenziometria**) o utilizza una corrente elettrica (celle elettrolitiche, **amperometria**).

Sono reazioni di ossidoriduzione.

# Applicazioni di metodi elettrochimici potenziometrici

## Misure di pH

- pH delle urine (stato acidotico pH<5.9 al mattino)
- pH del sangue, 7.35-7.45 (acidosi/alcalosi metabolica o respiratoria)

## Misure di ioni selettivi (elettrodi iono-selettivi):

- Na<sup>+</sup>, siero
- K<sup>+</sup>, siero
- Ca<sup>2+</sup>, siero
- Cl<sup>-</sup>, fibrosi cistica
- ~~NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, crescita microbica~~

## Misura di gas in soluzione

- pCO<sub>2</sub>
  - Ammoniaca
- } Si basa sempre sulla misurazione del pH

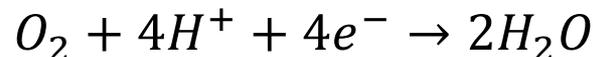
Sfruttano elettrodi a membrana

# Applicazione del metodo amperometrico: Misura della $pO_2$ nel sangue

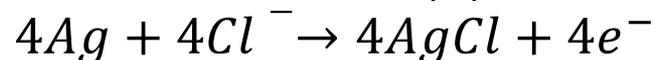
## Sensore di Clark

- Catodo al platino e anodo all'Ag/AgCl
- Ai due elettrodi viene applicata una d.d.p. costante (600 ÷ 800 mV) e l'ossigeno diffonde verso il catodo dove viene ridotto:

Al catodo (-)



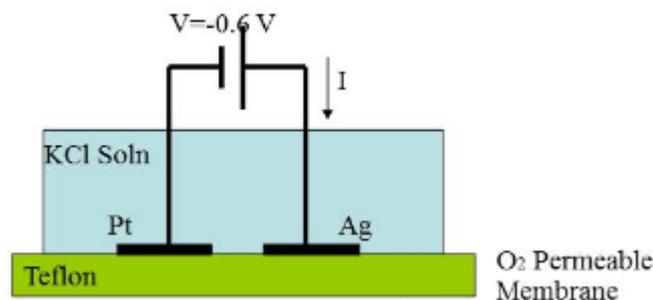
All'anodo (+)



Catodo: elettrodo sul quale avviene una semireazione di riduzione

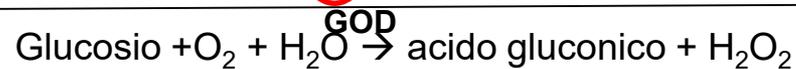
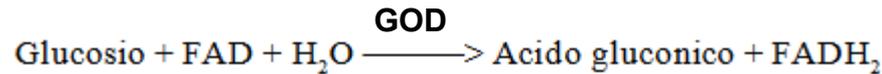
Anodo: elettrodo sul quale avviene una semireazione di ossidazione

- L'intensità di corrente misurata sarà direttamente proporzionale alla pressione dell' $O_2$  che diffonde all'elettrodo



# Misura del glucosio nel sangue

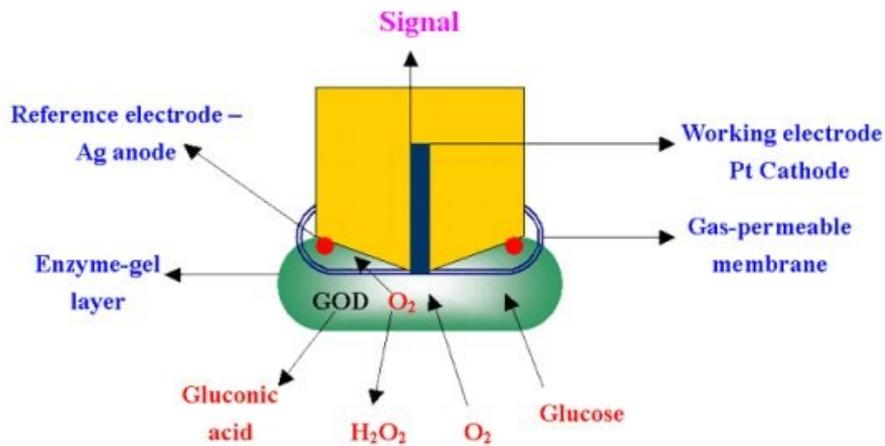
Elettrodi di prima generazione



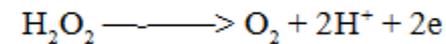
Misurare la  $\downarrow \text{O}_2$



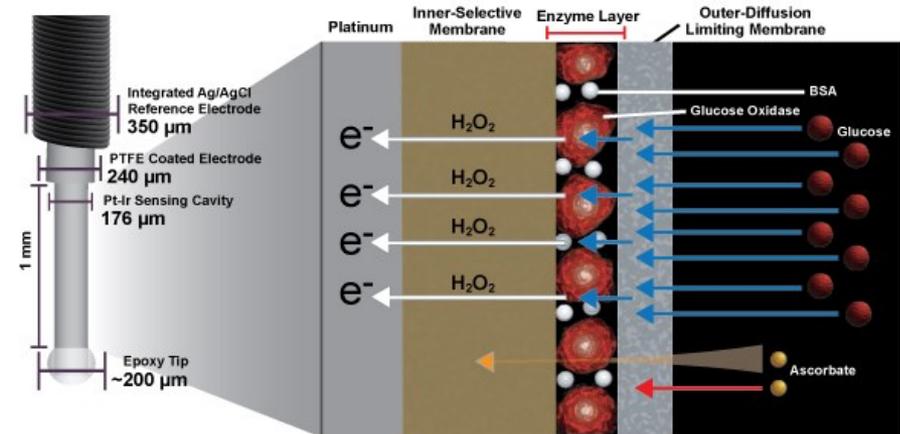
Sensore di Clark



Misurare la  $\uparrow \text{H}_2\text{O}_2$



Elettrodo selettivo per l'acqua ossigenata



**BASSA SOLUBILITÀ DELL'OSSIGENO NEI FLUIDI BIOLOGICI!!!**

# Tecniche analitiche

- Spettroscopia molecolare
  - assorbimento UV-VIS, luminescenza, riflettanza
- Spettrometria di massa
- Tecniche elettrochimiche
- **Determinazione dell'attività enzimatica**
- Tecniche immunologiche
- Tecniche per la diagnosi molecolare

# Enzimi

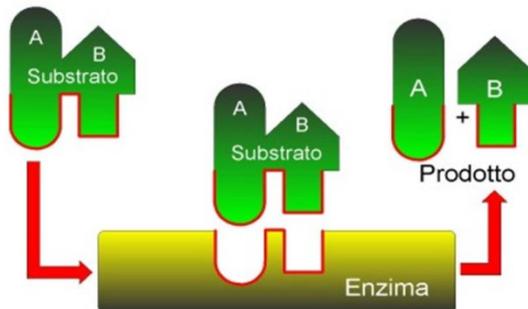
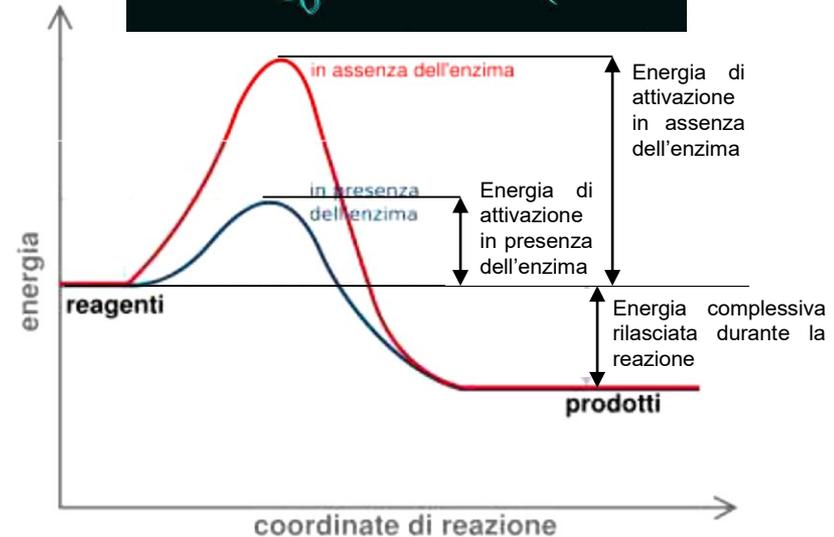
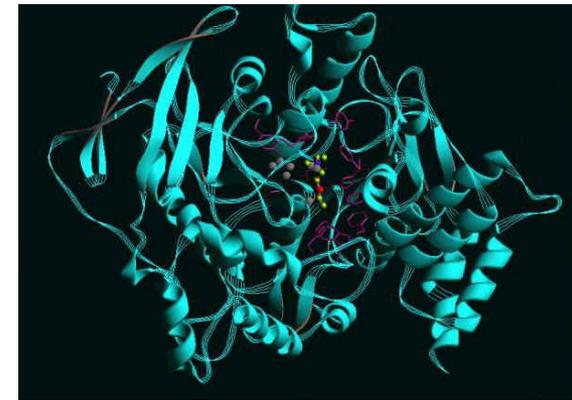
Proteine dotate di attività catalitica

Modificano la velocità delle reazioni chimiche (termodinamicamente permesse) intra ed extra-cellulari senza essere consumati.



Regolano le varie vie metaboliche.

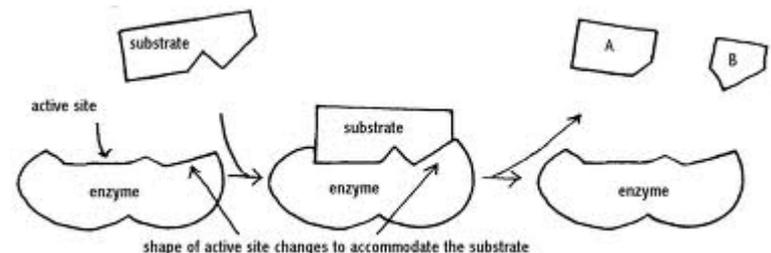
Essendo proteine subiscono un continuo turn-over (biosintesi, degradazione) e la loro sintesi è controllata a livello genico.



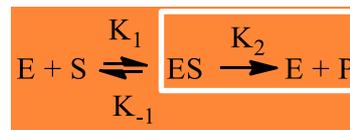
Alta specificità per il substrato

Modello chiave-serratura

Modello dell'adattamento indotto

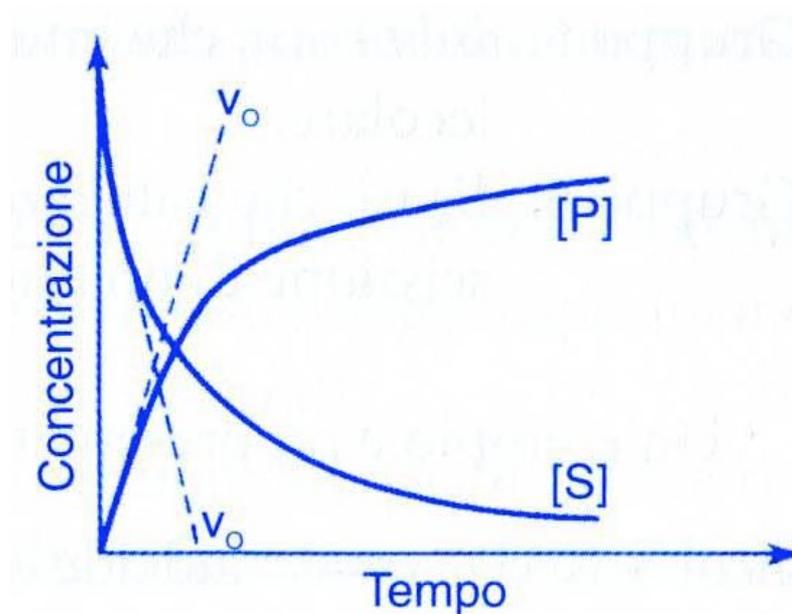


# Cinetica enzimatica



La quantità di enzima presente in un campione può essere valutato misurando la velocità di comparsa del prodotto o di consumo del substrato

## EFFETTO DEL TEMPO SULLA VELOCITÀ DI REAZIONE ENZIMATICA

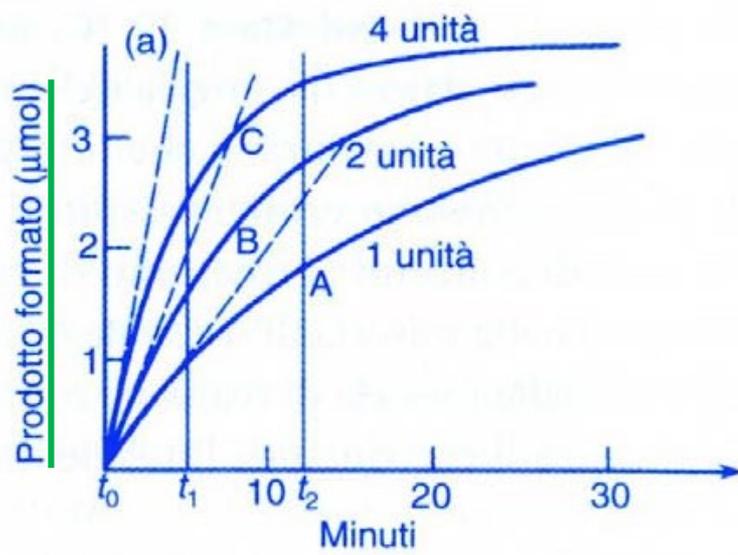


# Cinetica enzimatica

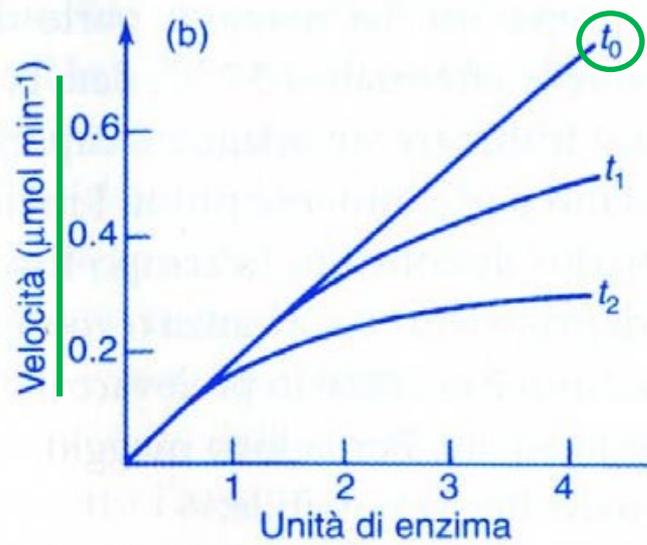


## EFFETTO DEL TEMPO SULLA VELOCITÀ DI REAZIONE ENZIMATICA

In un saggio enzimatico è importante misurare la **VELOCITÀ INIZIALE**



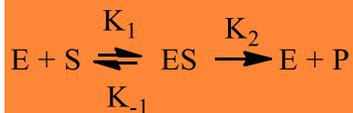
Variazione nel tempo della concentrazione di prodotto in presenza di 1, 2 o 4 unità di enzima



Variazione della velocità di reazione in funzione della concentrazione di enzima usando la velocità iniziale (calcolata a  $t_0$ ) o la velocità determinata a  $t_1$  e  $t_2$

La velocità di reazione iniziale è direttamente proporzionale alla concentrazione di enzima

Dato quantitativo per gli enzimi



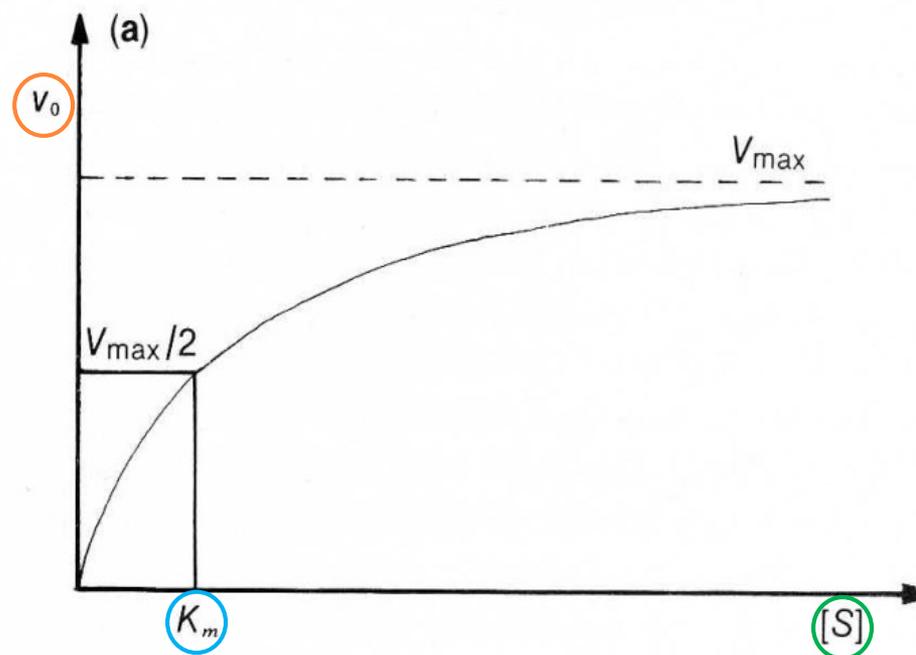
$$V_0 = \frac{K_2[E]_0[S]}{[S] + \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}}$$

$$V_0 = \frac{K_2[E]_0[S]}{[S] + K_m}$$

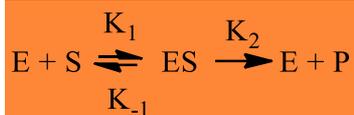
EQUAZIONE DI  
MICHAELIS MENTEN

La velocità iniziale è funzione delle concentrazioni del substrato, dell'enzima totale e delle costanti di velocità

Velocità massima di reazione ( $V_{max}$ ) → tutti i siti dell'enzima sono saturati dal substrato.

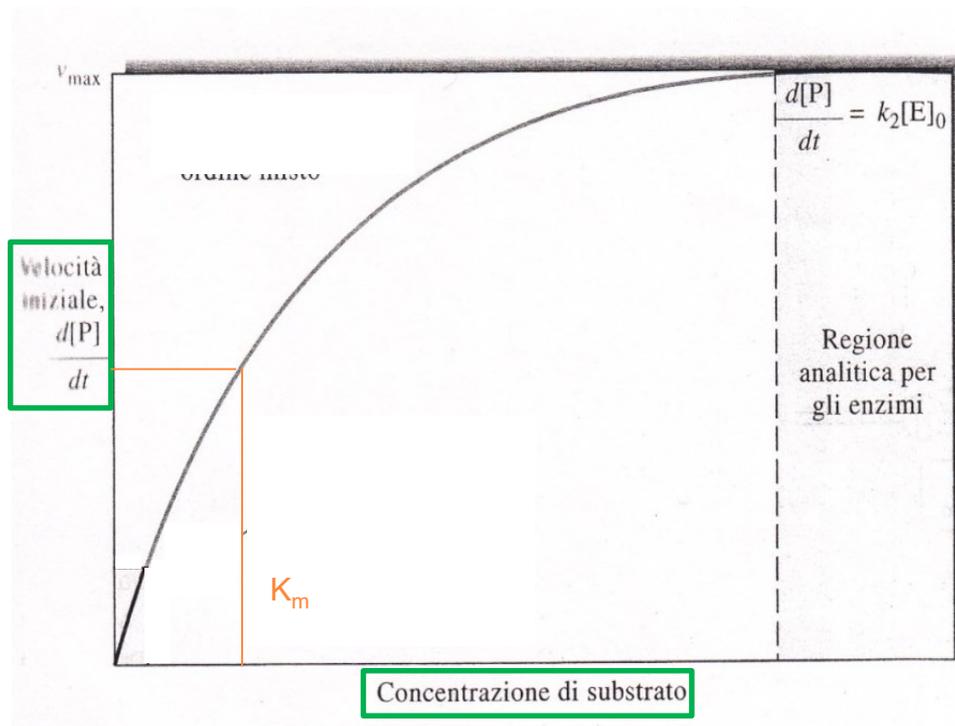


La concentrazione per cui la velocità di reazione iniziale è metà di quella massima coincide numericamente con la  $K_m$ .



$$V_0 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{K_2[E]_0[S]}{[S] + K_m}$$

### EQUAZIONE DI MICHAELIS MENTEN



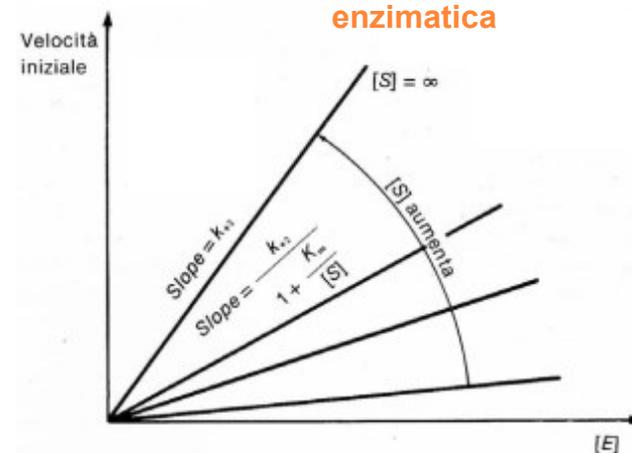
Se  $[S] \gg K_m$

$$V_0 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{K_2[E]_0[S]}{[S] + K_m} \rightarrow [S]$$

$V_0 = K_2[E]_0$  ed è **Vmax**

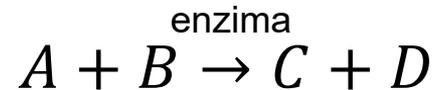


**Misura dell'attività enzimatica**



10.3 Effetto della concentrazione di enzima sulla velocità iniziale di una reazione enzimatica a varie concentrazioni di substrato.

# Determinazione dell'attività enzimatica

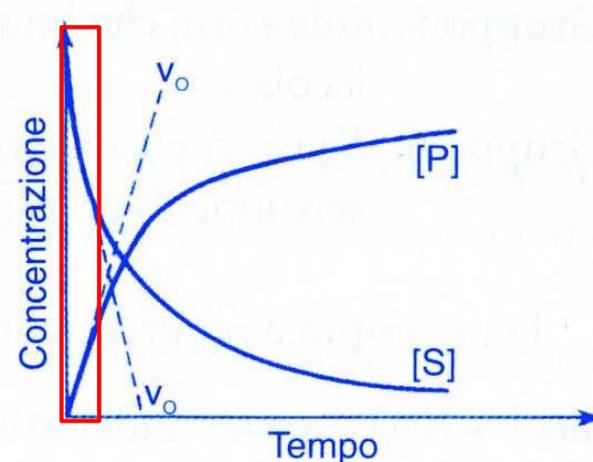
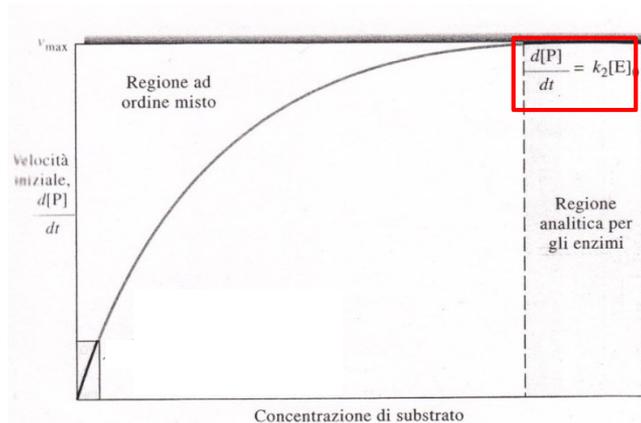


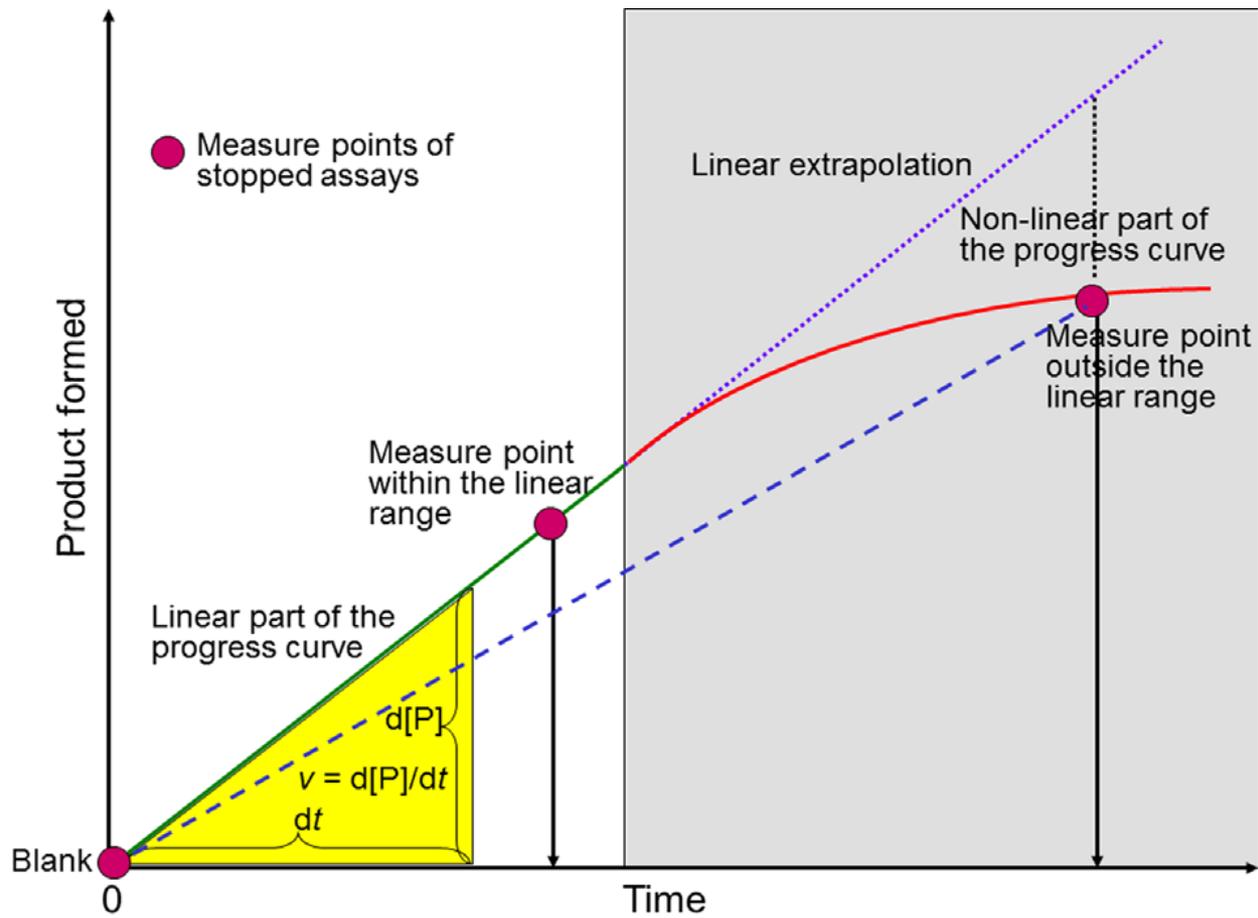
Ci si deve assicurare di essere in condizioni saturanti di substrato.

I metodi analitici per determinare l'attività enzimatica si possono distinguere in:

I **metodi continui (cinetici)** permettono di seguire la progressione della reazione enzimatica nel tempo.

I **metodi discontinui (a tempo fisso)**, la reazione viene stoppata dopo un determinato tempo e il prodotto/substrato formato/rimasto viene convertito per essere analizzato.



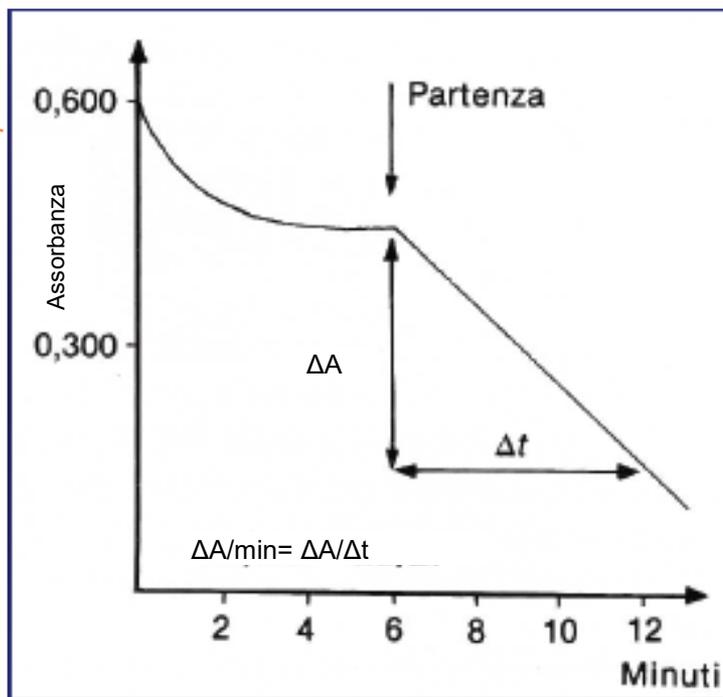


# Metodo spettrofotometrico (S o P assorbono nell'UV-VIS)

$$1U = \frac{1 \mu\text{mol substrato consumato (prodotto formato)}}{\text{min}}$$

U = unità enzimatica

Esempio di misura della diminuzione dell'A del substrato



Legge di Lambert-Beer

$$A = abc$$

$$c = \frac{A}{ab} \quad \Delta c = \frac{\Delta A}{ab}$$

$$1U/mL = \frac{\Delta A}{ab\Delta t}$$

Nel saggio

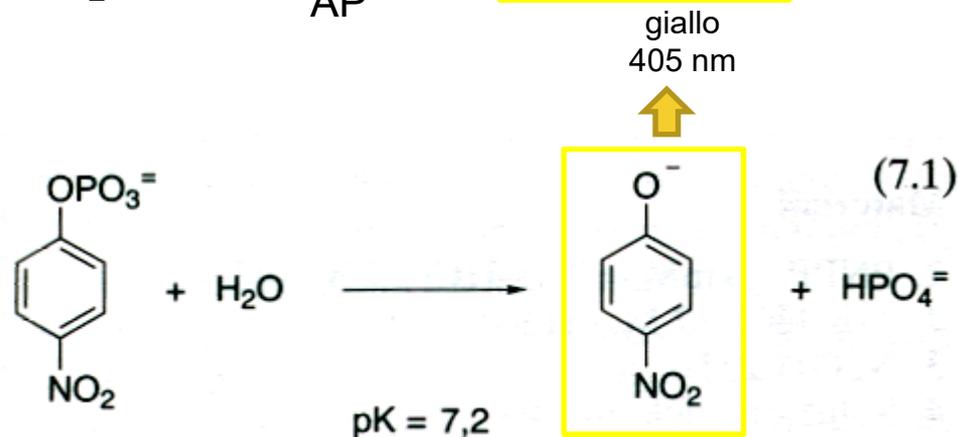
Tenendo conto del volume di campione (v), del volume totale di reazione (V):

**ATTIVITÀ ENZIMATICA**

$$U/mL = \frac{\Delta A V}{v ab\Delta t}$$

## Esempi di prodotti che assorbono nell'UV-VIS

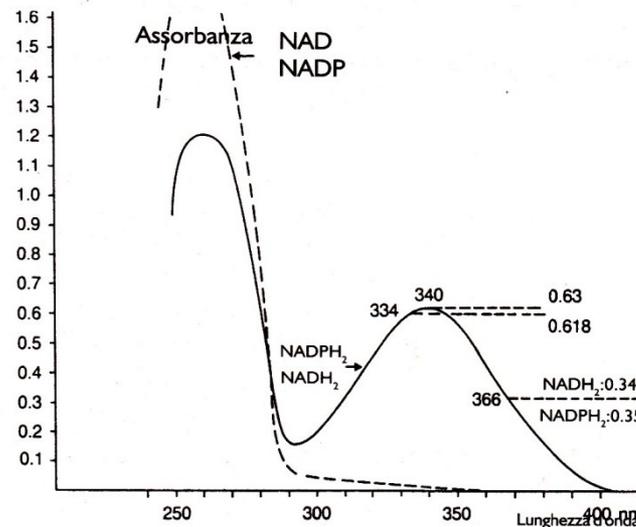
- $p$ -nitrofenil fosfato +  $H_2O$   $\xrightarrow[\text{AP}]{\text{Fosfatasi alcalina}}$   **$p$ -nitrofenolo** + fosfato



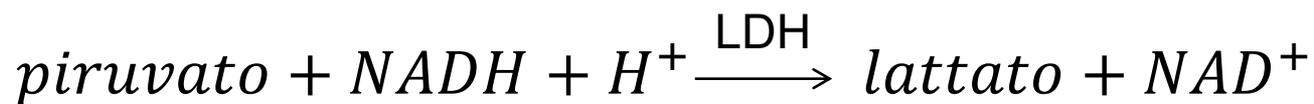
- $\gamma$ -glutamil- $p$ -nitroanilide + glicina  $\xrightarrow{\text{GGT}}$   **$p$ -nitroanilina** +  $\gamma$ -glutamilglicina
- giallo  
405 nm

- NADH nelle reazioni deidrogenasiche (test ottico semplice di Warburg)





**Figura 6.2** – Spettro di assorbimento di soluzioni 0,1 nmol/l rispettivamente di NAD, NADP (linea tratteggiata) e NADH<sub>2</sub>, NADPH<sub>2</sub> (linea continua). Nota: sono riportati i valori di assorbimento dei coenzimi ridotti a 340 nm (massimo di assorbimento nel vicino u.v.) e a 334 e 366 nm: queste ultime due lunghezze d'onda sono interessanti dal punto di vista pratico quando si impiegano fotometri con lampade a vapori di Hg che presentano una emissione luminosa intensa alla λ citate.



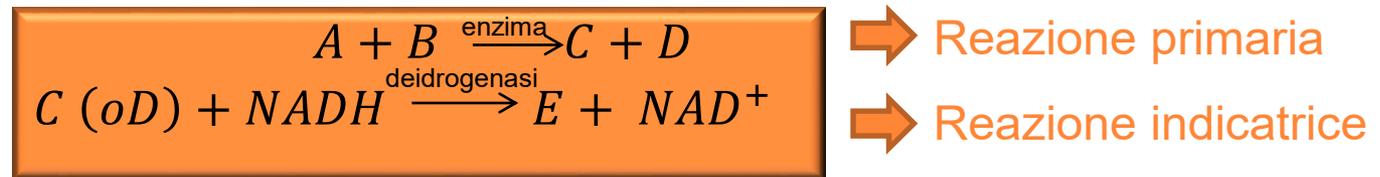
si misura il decremento di NADH

**LDH, lattato deidrogenasi:** (miocardio, globuli rossi, reni, milza, pancreas, tiroide, linfonodi, fegato, muscoli scheletrici) il suo aumento in circolo può indicare un danneggiamento o necrosi degli organi o tessuti in cui esso è presente.

Altre deidrogenasi di interesse clinico: sorbitolo deidrogenasi, malato deidrogenasi, glucosio-6-fosfato deidrogenasi eritrocitaria, ecc.

## Test ottico accoppiato

- A volte nessun composto che prende parte alla reazione enzimatica assorbe nell' UV-VIS
- È possibile accoppiare la reazione con una reazione secondaria indicatrice che utilizzi uno dei prodotti della prima reazione secondo il principio del test ottico semplice.



Esempio: *chetoglutarato + alanina*  $\xrightarrow{\text{ALT}}$  *glutammato + piruvato*  
*piruvato + NADH + H<sup>+</sup>*  $\xrightarrow{\text{LDH}}$  *lattato + NAD<sup>+</sup>*

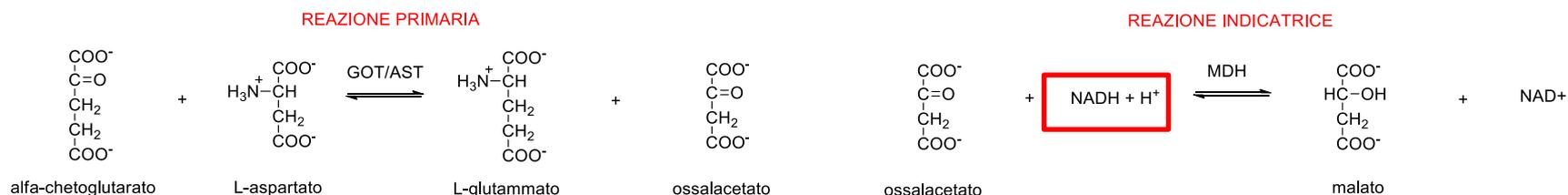
**AST (o GOT), aspartato aminotrasferasi:** è un enzima legato ai mitocondri. Presente nel fegato, miocardio, muscolatura scheletrica, tessuto renale e cerebrale.

**ALT (o GPT), alanina aminotrasferasi:** è libero nella frazione citoplasmatica soprattutto degli epatociti, con una quota minore legata ai mitocondri.

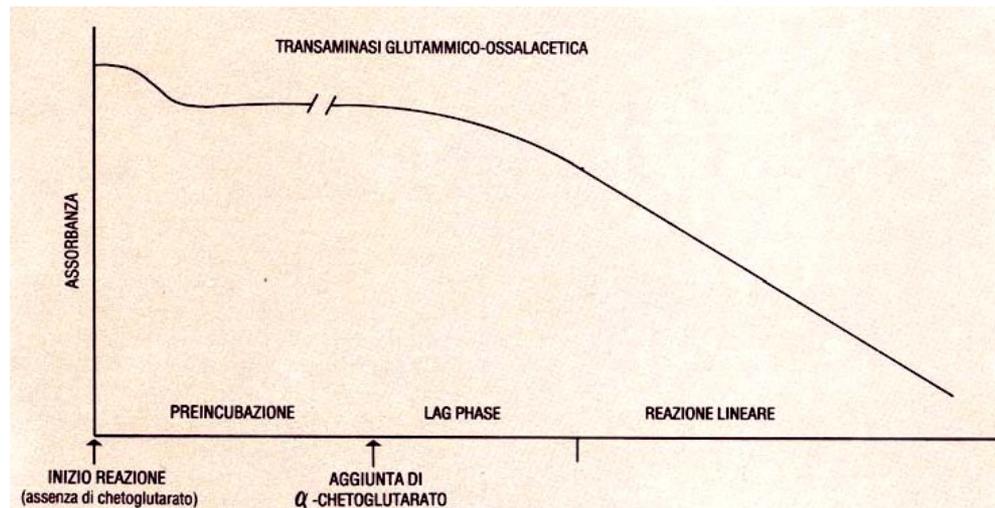
Sono intracellulari e le membrane cellulari sono impermeabili ad essi. Il rapporto tra il comparto extra ed intracellulare è 1:10000 per ALT e 1:100000 per AST.

AST aumenta nella epatopatie ma anche in molte altre malattie. Invece la determinazione sierica di ALT viene usata per diagnosticare le epatopatie.

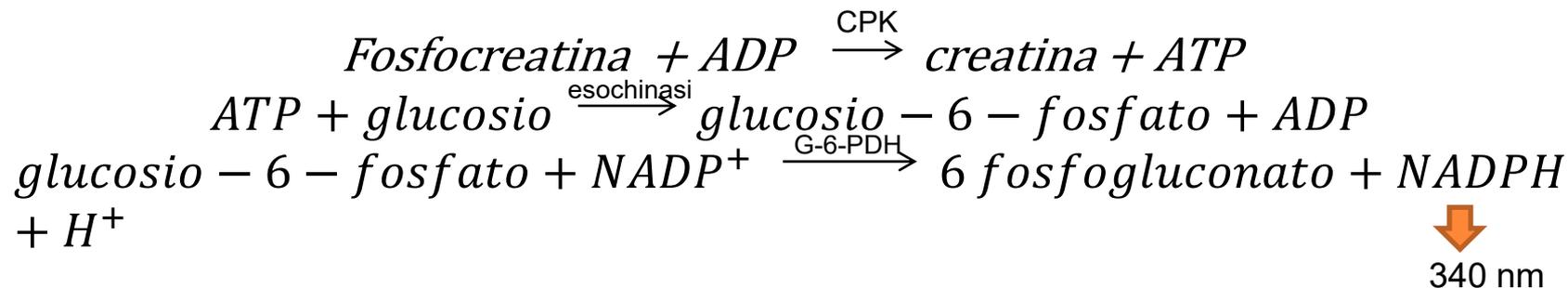
Per poter misurare la velocità della reazione primaria il prodotto deve essere rapidamente consumato dalla reazione indicatrice, essa non deve costituire il fattore limitante (enzima indicatore con attività 100 volte superiore all'enzima da misurare, e substrati (coenzimi piridinici) in concentrazioni tali da saturare l'enzima indicatore).



decremento di A a 340 nm



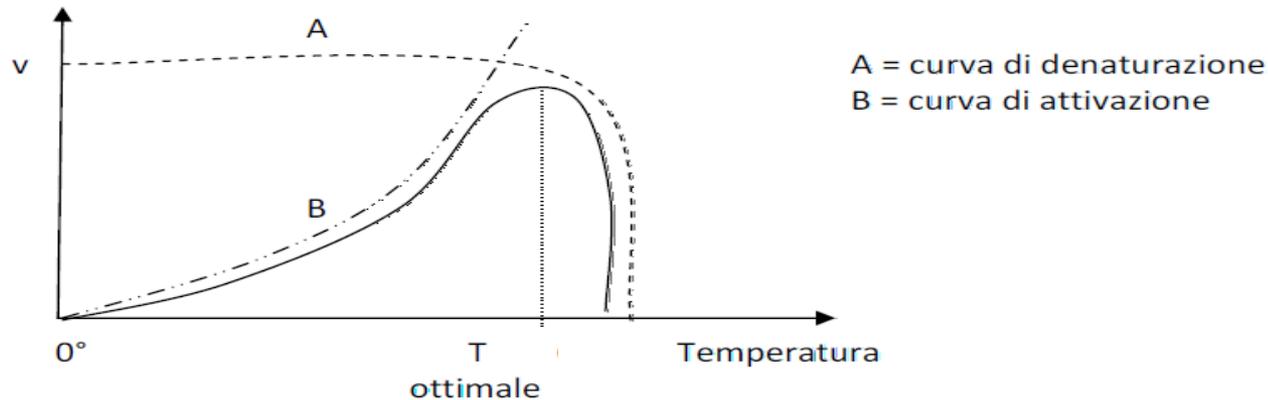
- In qualche caso sono necessarie ben tre reazioni enzimatiche accoppiate:
  - Reazione primaria
  - Reazione ausiliaria
  - Reazione indicatrice che utilizzi uno dei prodotti della reazione ausiliaria
- Un esempio è la determinazione dell'attività della creatinfosfochinasi (CPK):



**CPK, creatinfosfochinasi:** diagnosi di infarto del miocardio.

È presente prevalentemente ma non esclusivamente nei muscoli scheletrici, miocardio e cervello.

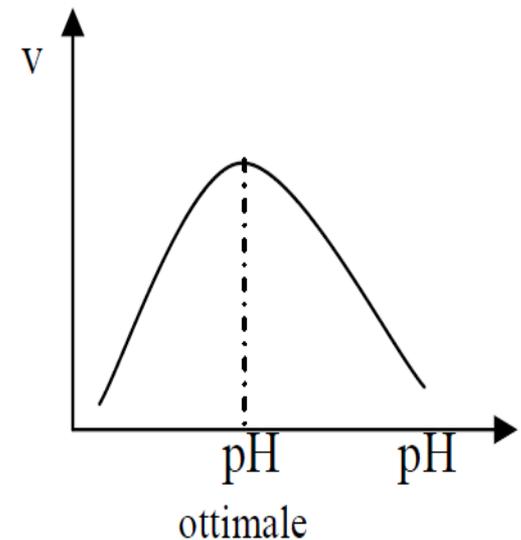
## Effetto della T sulla velocità di reazione



Mantenere la T costante durante la misura (25-30-37°C)

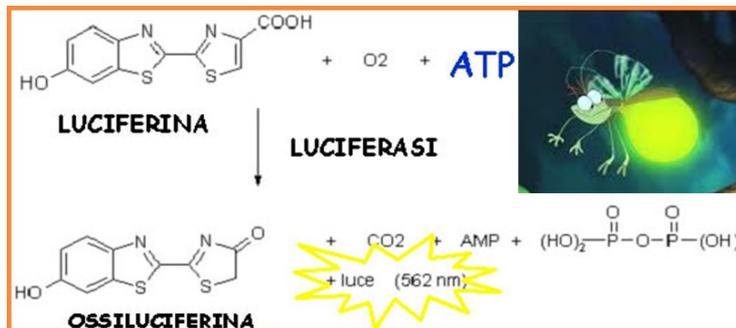
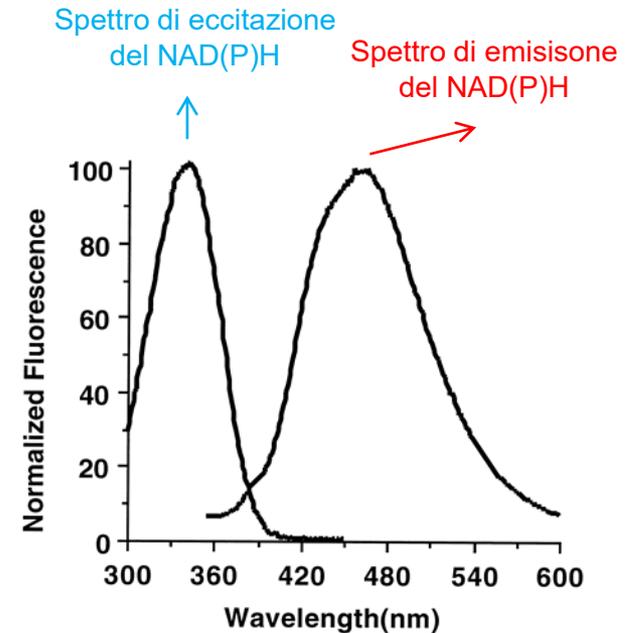
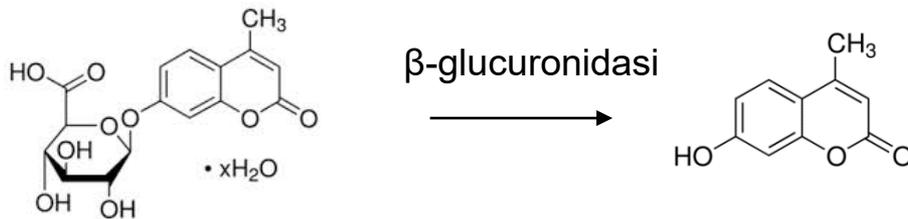
## Effetto del pH sulla velocità di reazione

Variazione della dissociazione dei gruppi acidi e basici degli aa dell'enzima a pH diversi



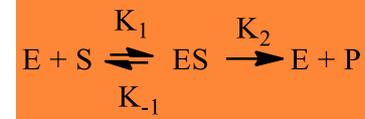
# Altri metodi per la misura dell'attività enzimatica

- Metodi spettrofluorimetrici
- Metodi a luminescenza

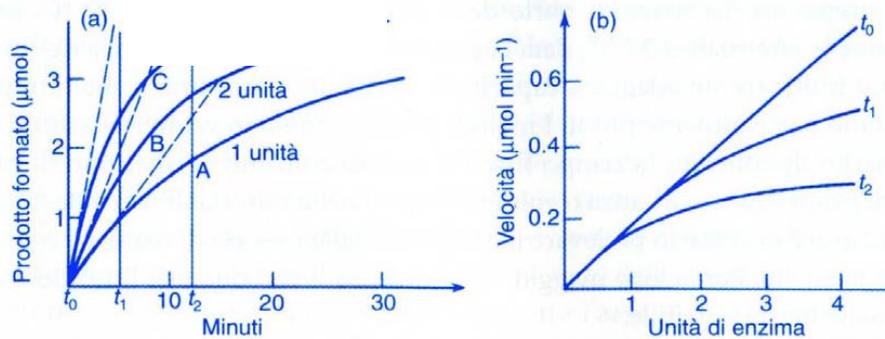


# Riassunto Cinetica enzimatica

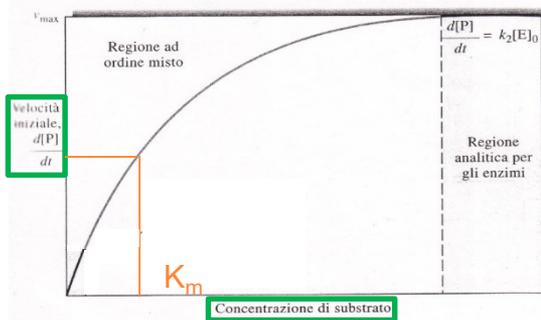
## Determinazione concentrazione enzimi



è importante misurare la **VELOCITÀ INIZIALE**  $V_0$



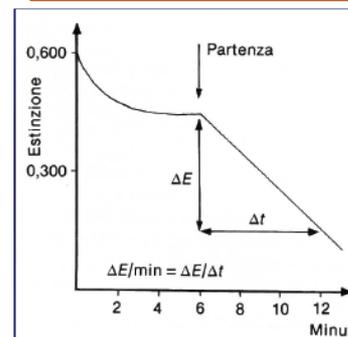
è importante lavorare in **CONCENTRAZIONI SATURANTI DI SUBSTRATO** ( $V_0 = V_{max}$ )



Se  $[S] \gg K_m$

$$V_0 = \frac{d[P]}{dt} = \frac{K_2[E]_0[S]}{[S] + K_m} \rightarrow [S]$$

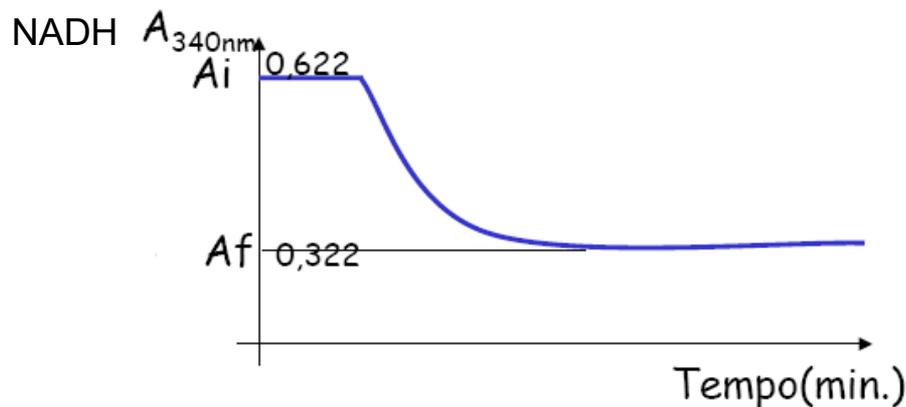
$V_0 = K_2[E]_0$  ed è  **$V_{max}$**



$$U/mL = \frac{\Delta A V}{v \text{ ab} \Delta t}$$

# Dosaggio dei metaboliti mediante enzimi

- Permettono il dosaggio di metaboliti nei campioni biologici
- Si usa il **metodo a termine (end-point)**: se tutto il substrato è convertito in prodotto, la variazione complessiva di A permette di calcolare la concentrazione di substrato iniziale.
  - Enzima in quantità che assicurino tempi di reazione brevi (in eccesso)
  - Spostare l'equilibrio a favore dei prodotti
- Si possono usare reazioni accoppiate



$$\Delta A = A_f - A_i$$

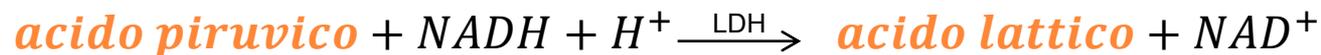
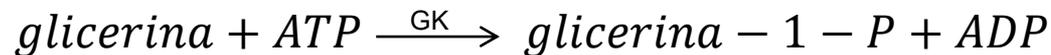
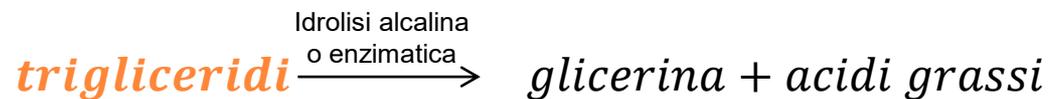
$$\Delta A = \epsilon b \Delta c$$

$$\Delta c = \Delta A / \epsilon b$$

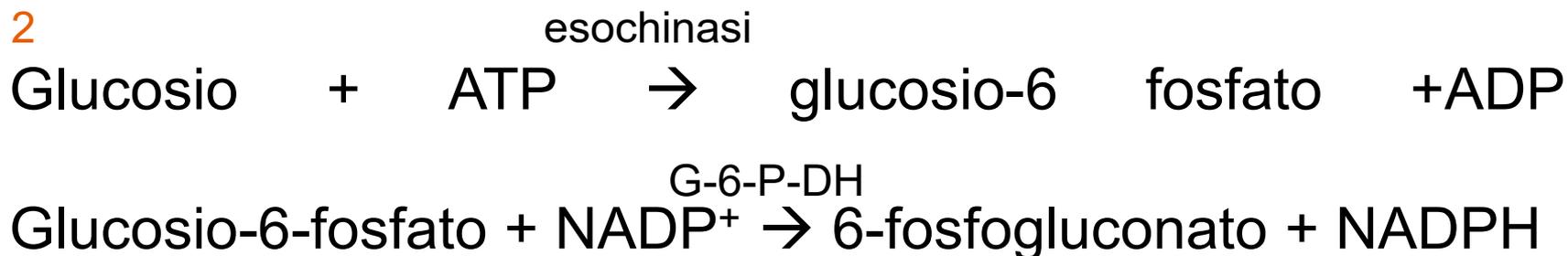
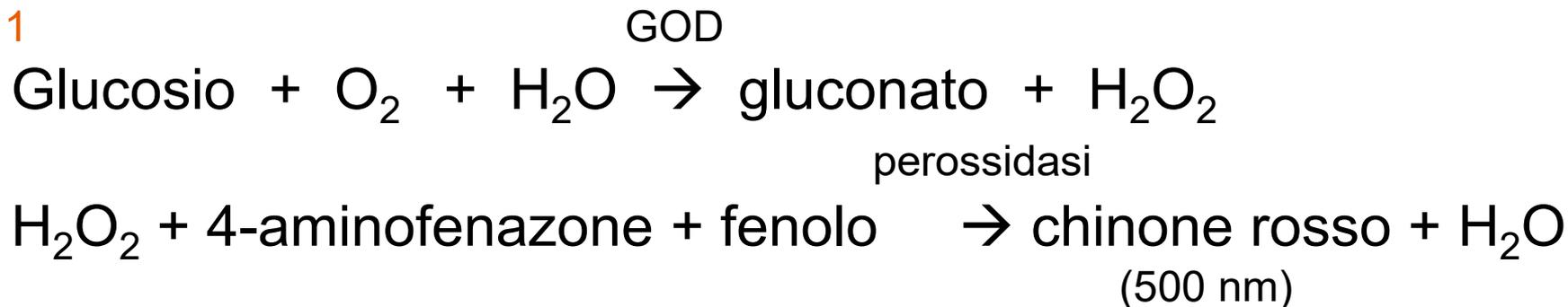
- Esempi di sostanze di interesse biologico:

- Acido lattico
  - Acido piruvico
  - Glucosio
  - Trigliceridi
- } Nel siero/plasma

Esempio:



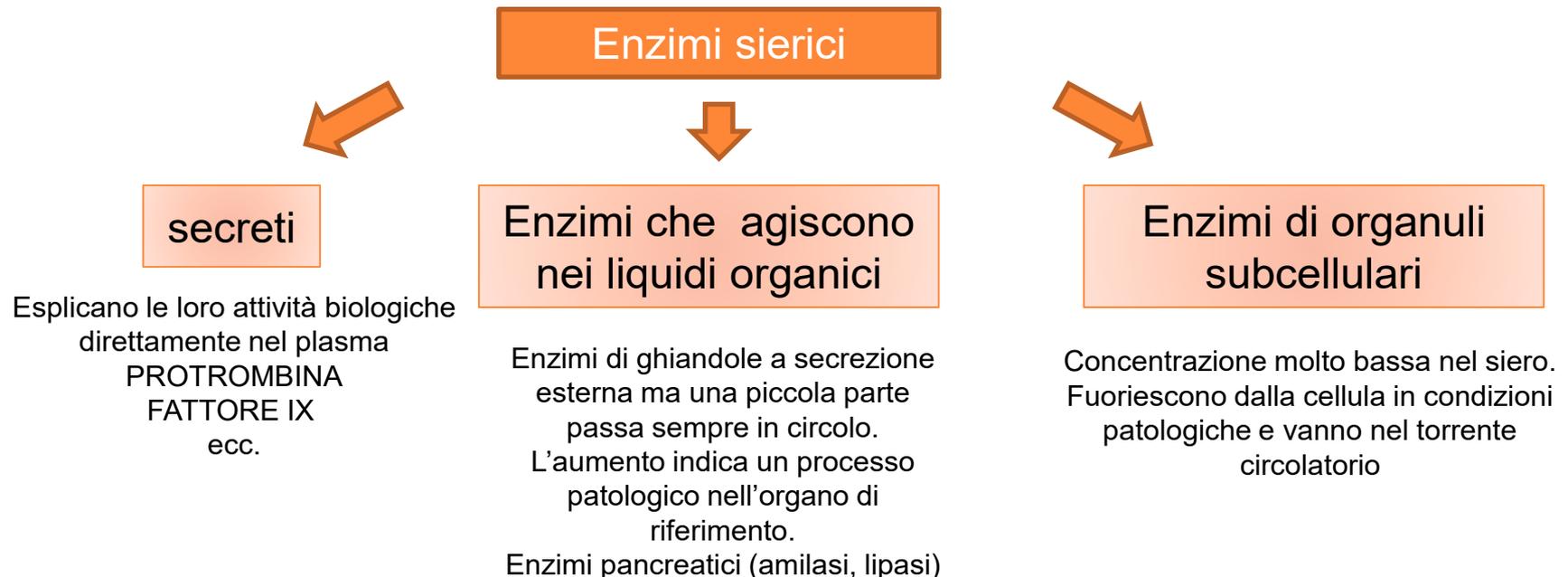
# Misura della glicemia



Quindi si misura l'incremento di assorbanza a 340nm

# Studio dell'attività degli enzimi sierici

- Sono utili in diagnostica anche le analisi su altri liquidi biologici (urina, succhi digestivi, feci, emolisi di emazie e preparati di leucociti)



**Tabella 6.7. Meccanismi responsabili delle variazioni di attività degli enzimi sierici in condizioni patologiche**

Meccanismo	Enzimi interessati
<b>A. Aumento dell'attività sierica per:</b>	
<b>1. aumento della mobilizzazione degli enzimi cellulari:</b>	
<b>a) per necrosi cellulare:</b>	
– infarto del miocardio	CK, LDH, AST
– epatiti tossico-infettive	ALT, AST, CCT
– pancreatite acuta, ricorrente...	AMS, LIP
<b>b) senza apparente necrosi cellulare:</b>	ALD, CK, LDH, AST
– miopatie congenite e acquisite (polimiasite, dermatomiosite)	
<b>2. incremento della sintesi-enzimatica:</b>	
<b>a) per fenomeni di induzione o riattivazione genetica:</b>	
– stasi biliare	GGT, ALP, LAP
– metastasi epatiche	GGT ALP, LAP
– abuso di alcool, farmaci epatotossici	GGT
<b>b) per proliferazione cellulare (*):</b>	
– carcinomatosi diffusa	LDH
– emopatie sistemiche	lisozima
– aumento dell'attività osteoblastica	ALP
– proliferazione placentare, neoplastica	ALP (antigene di Regan)
– carcinoma prostatico	ACP
– processi flogistici e neoplastici	AMS
<b>3. ritenzione urinaria:</b>	
– uremia	AMS
<b>B. Diminuzione dell'attività sierica per:</b>	
<b>1. diminuita sintesi dell'enzima:</b>	
<b>a) congenita: nei deficit congeniti</b>	pseudocolinesterasi: CHE
	fosfatasi alcalina
	ceruloplasmina
<b>b) acquisita: cirrosi epatica</b>	CHE

Enzimi della lisi

Può essere causato anche da forme lievi e reversibili di danno cellulare (ipossia, iperattività cellulare, alterazione del pH, ecc): delirium tremens, distrofia muscolare, ecc.

Eliminata con le urine per le sue caratteristiche molecolari

Meno frequente ← B. Diminuzione dell'attività sierica per:

→ Dosaggio di routine preoperatorio

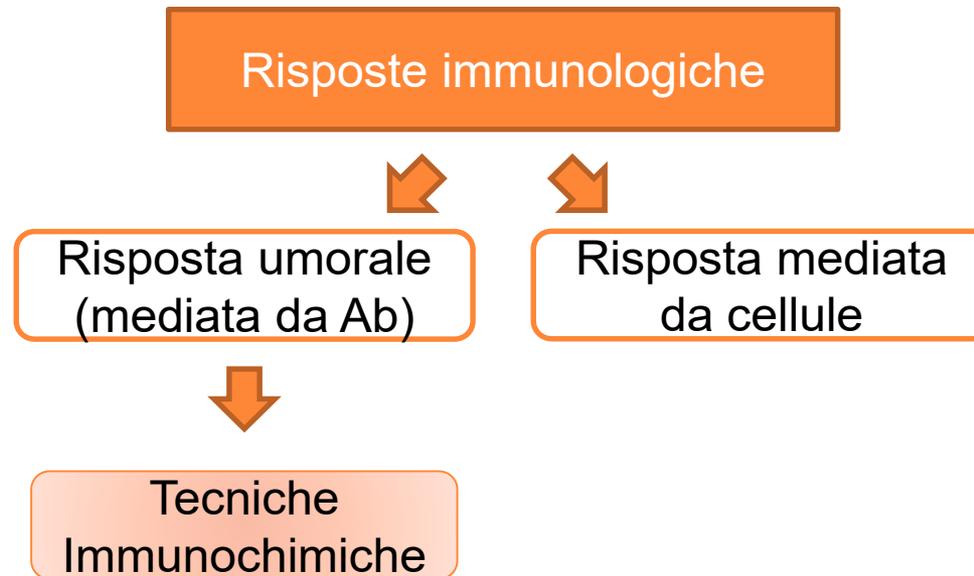
→ Indice della capacità sintetica del fegato

(\*) può essere associata a fenomeni di riattivazione genica o a processi necrotici

# Tecniche analitiche

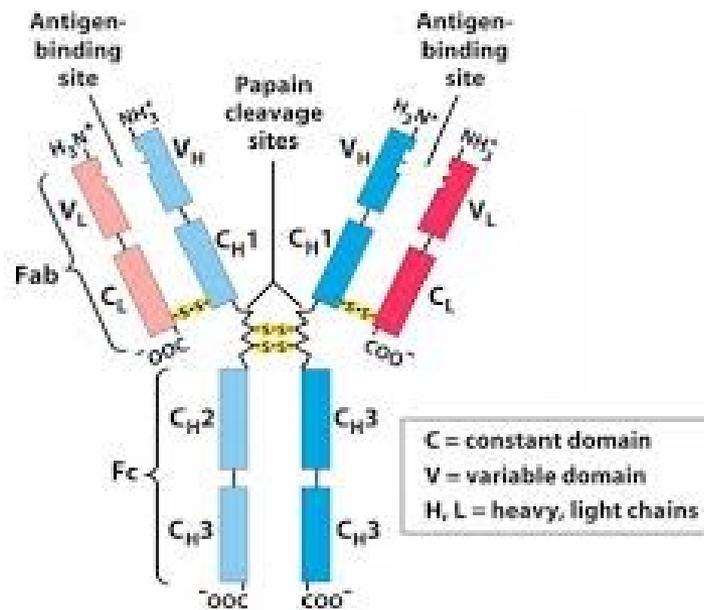
- Spettroscopia molecolare
  - assorbimento UV-VIS, luminescenza, riflettanza
- Spettrometria di massa
- Tecniche elettrochimiche
- Determinazione dell'attività enzimatica
- Tecniche immunologiche
- Tecniche per la diagnosi molecolare

# Immunochimica



# Anticorpi

- Sostanze proteiche formate *in vivo* in risposta alla somministrazione di un antigene, con cui reagiscono in maniera specifica
- Appartengono alla famiglia di proteine detta immunoglobuline o gamma globuline (frazione elettroforetica in cui si collocano)





	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
<b>PM</b>	160000	160000	900000	160000	190000-200000
<b>Catena pesante</b>	$\gamma$	$\alpha$	$\mu$	$\delta$	$\epsilon$
<b>Catena leggera</b>	k o $\lambda$	k o $\lambda$	k o $\lambda$	k o $\lambda$	k o $\lambda$
<b>Distribuzione primaria</b>	Liquidi interstiziali e sangue (40%)	Colostro, saliva, secrezioni intestinali e respiratorie, sangue (40%)	Sangue (80%)	Sangue (75%)	Sangue (50%)
<b>Concentrazione e nel siero normale (g/dL)</b>	1.0-1.5	0.1-0.4	0.05-0.15	0.003	Estremamente bassa
<b>% nel siero normale</b>	73%	19%	7%	1%	-
<b>Attività principale</b>	Facilitano la fagocitosi	Neutralizzazione di tossine e virus	Effetto battericida e opsonizzante	Differenziano il linfocita B in plasmacellule	Reazione: ipersensibilità di tipo immediato
<b>Placenta</b>	Passano	no	no	no	no
<b>Complemento</b>	Fissano	no	Fissano	no	no

# Antigene

- Sostanza che in condizioni adatte è capace di indurre in un animale la formazione di uno o più anticorpi (*immunogenicità*) e di reagire specificatamente con essi
- Generalmente deve avere un PM > 5,000 Da.
- La maggior parte delle proteine dei fluidi biologici (plasma, latte, secrezioni) sono ottimi Ag
- Nelle proteine la specificità antigenica è alterata per denaturazione, riduzione dei S-S, ecc.
- Glicoproteine, lipoproteine, lipopolisaccaridi, polisaccaridi e acidi nucleici possono essere Ag anche se a volte molto modesti
- *Determinante antigenico o epitopo*: porzione di una molecola di Ag che entra in contatto con il sito di legame di un Ab (in una proteina: 5/6 aa)
- *Aptene*, sostanza a basso PM di per sé non immunogenica, ma che se legata ad un carrier è in grado di stimolare la produzione di Ab. Quindi presenta l'epitopo.

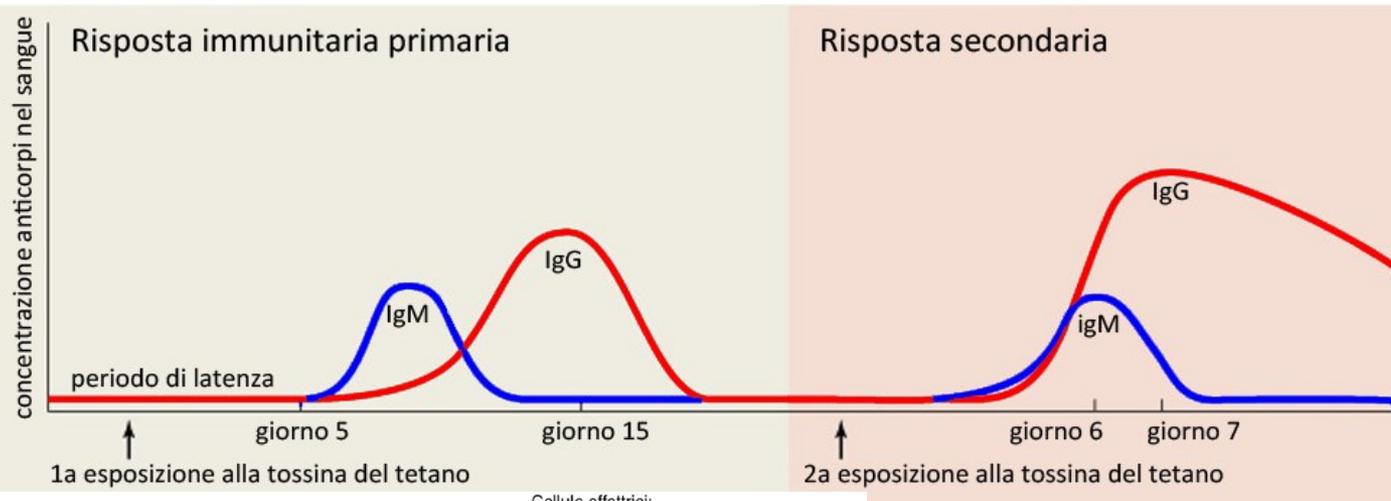
# Reazione Ag-Ab

- **Velocità di reazione.** Una delle più alte in campo biochimico, la costante di associazione non può essere calcolata se non a concentrazioni molto basse dei reagenti
- **Temperatura.** A volte la costante di associazione può diminuire con l'aumento della temperatura, mentre altre volte rimane invariata anche tra 4 e 40°C. Quindi non aumenta mai.
- **pH e forza ionica.** Se le molecole leganti presentano gruppi dissociati, la costante di associazione diminuirà se ci si discosta dalla neutralità o se si aumenta la forza ionica
- **Legame Ag-Ab, reversibile:**
  - Forze coulombiane, attrazione tra cariche di segno opposto ( $\text{NH}_3^+/\text{COO}^-$ )
  - Forze di Van der Waals
  - Legami idrogeno

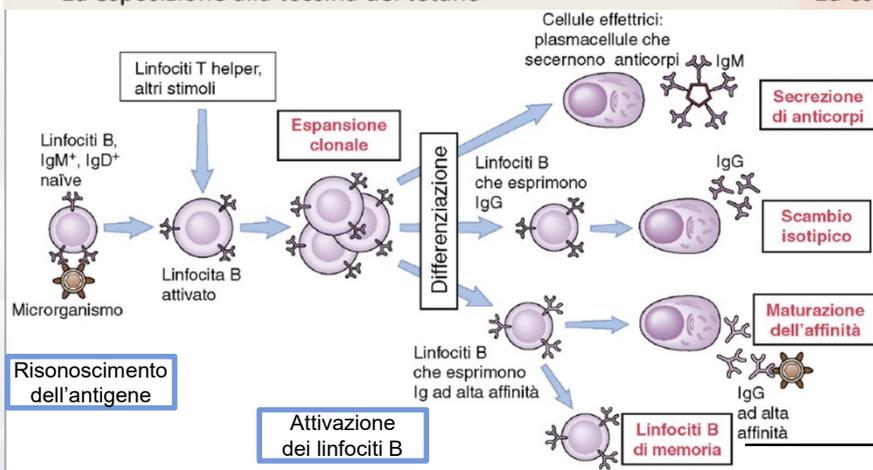
# Reazioni sierologiche

Sono le reazioni che permettono di quantificare Ag e Ab *in vitro*:

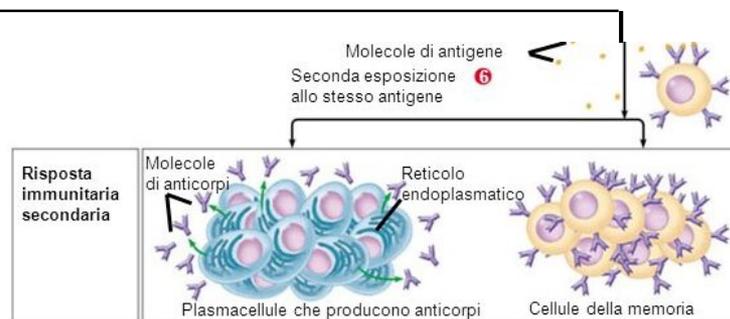
- **Agglutinazione**, quando l'antigene è corpuscolato (globuli rossi, batteri)
- **Precipitazione**, quando l'antigene è solubile
- **Neutralizzazione**, quando l'antigene, per azione del corrispondente anticorpo, perde la sua attività
- **Fissazione del complemento**, quando l'antigene è corpuscolato e la reazione avviene in presenza di complemento
- **Ab o Ag marcati**



➔ **Ab policlonali**

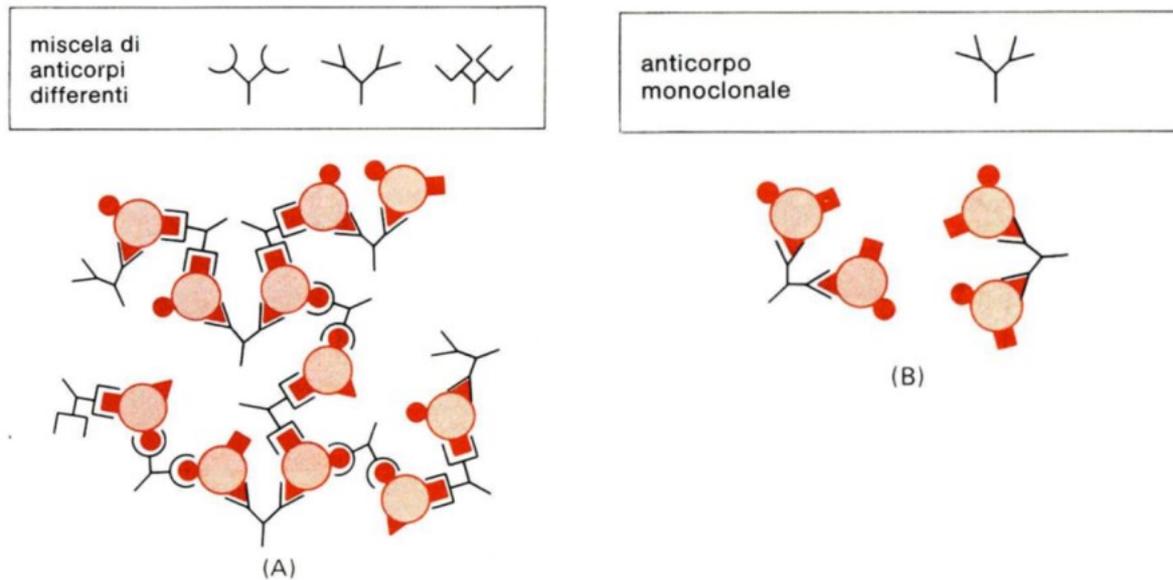


**Risposta immunitaria umorale secondaria:** indotta da una successiva iniezione di Ag dopo un certo intervallo di tempo dalla risposta primaria → risposta più rapida e oltre alle IgM aumentano le IgG



# Ab monoclonali

- Grande affidabilità dei risultati ottenuti, estrema specificità
- Affinità minore rispetto agli antisieri ottenuti con lo stesso Ag

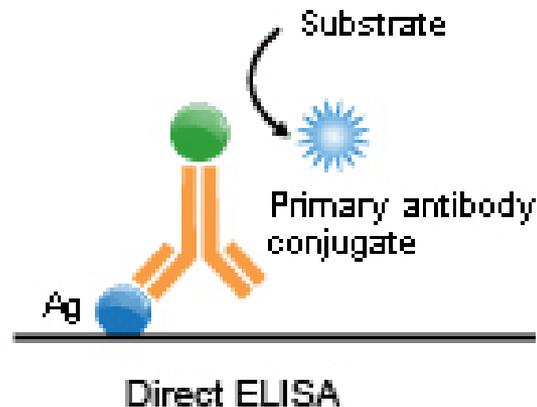


# Saggi con Ag o Ab marcati

- **Marcatura con enzimi:** uniscono la specificità degli Ab con la sensibilità del dosaggio spettrofotometrico di un enzima (facilmente dosabile)
  - Ag marcati con enzimi (saggio competitivo per la determinazione dell'Ag)
  - **Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA: Ab marcati con enzima**
  - **Tecnica enzimo-immunochimica in fase omogenea, EMIT**
- Marcatura con radioisotopi
- Marcatura con sostanze fluorescenti
- Marcatura con sostanze luminescenti
- **Immunoblot: Western blot**

# ELISA *Enzyme-linked immunosorbent assay*

## Ab marcato con l'enzima

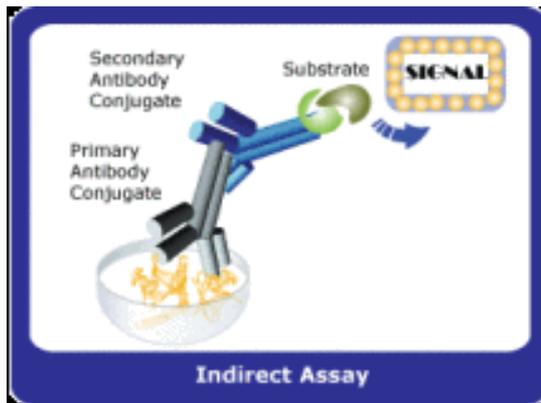


### • ELISA diretto

- Ag immobilizzato direttamente sul supporto
- Un anticorpo specifico coniugato ad un enzima viene utilizzato per rivelarlo e/o quantificarlo
- La procedura è semplice ed evita la cross-reattività dovuta ad anticorpi secondari
- Però richiede la marcatura di anticorpi primari che è una procedura costosa (non tutti gli Ab sono idonei per la marcatura)

## • ELISA indiretto

- L'antigene è immobilizzato direttamente sul supporto
- L'anticorpo primario non è marcato
- Ma c'è un secondo anticorpo (anticorpo secondario) che riconosce l'anticorpo primario che è marcato con l'enzima
- Può essere sfruttato per dosare un certo anticorpo (sarebbe l'Ab primario) in un antisiero



### Pro:

- Amplificazione del segnale: Ab 2° lega più siti dell'Ab 1°
- Ab 1° non marcato: non ha impedimenti per legarsi all'Ag, massima affinità

### Cons:

- Ab 2° può legarsi ad Ag legati sul pozzetto.  
per esempio devo usare Ab 2° anti-specie del primario pre assorbiti contro siero umano se il campione adeso sul pozzetto è umano (cross reattività con le Ig)

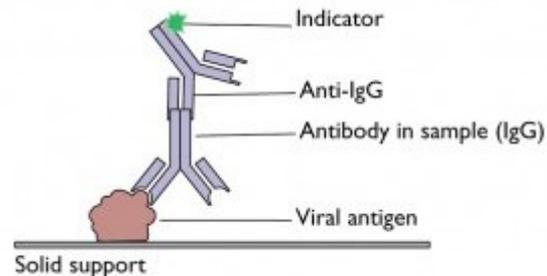


# Toxo-IgG EIA-Kit

Enzyme immunoassay  
for the determination of toxoplasma IgG antibodies

## PRINCIPLE

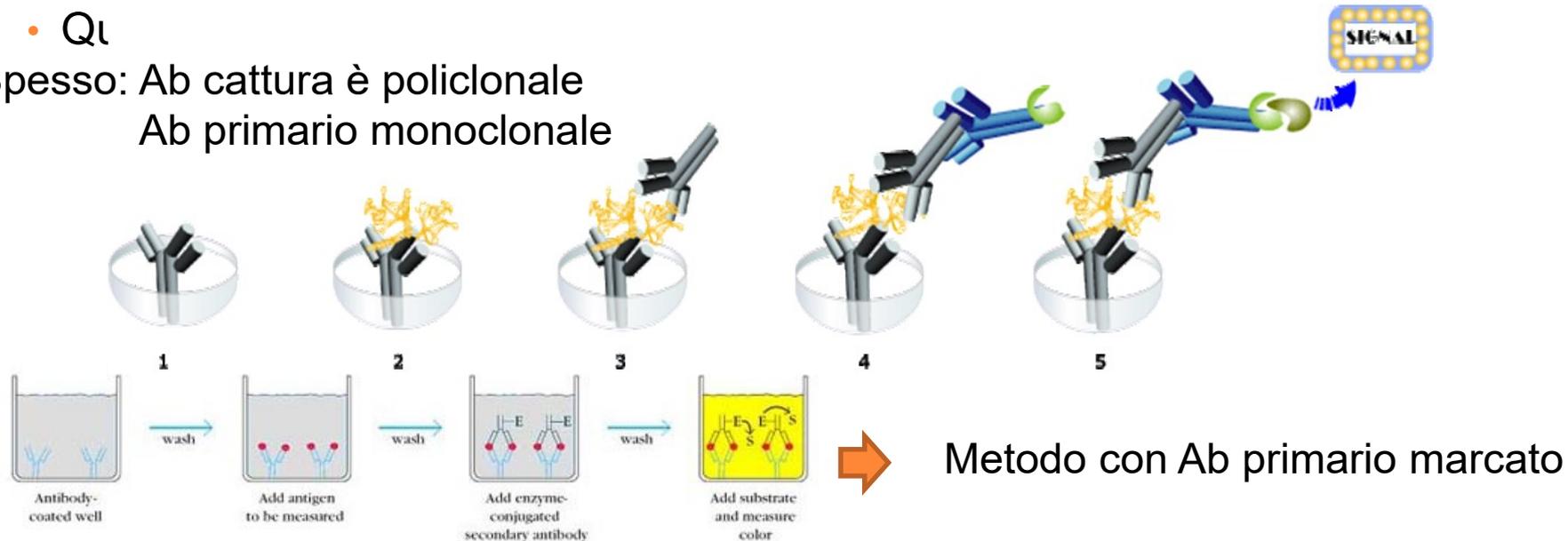
Specific antibodies in serum bind with the toxoplasma antigen coated onto a solid phase (strip); only IgG antibodies bind with the alkaline phosphatase labelled anti-IgG conjugate; the complex formed is revealed by hydrolysis of the enzyme substrate : p-nitrophenyl phosphate (PNPP). Automated reading at 405 nm.



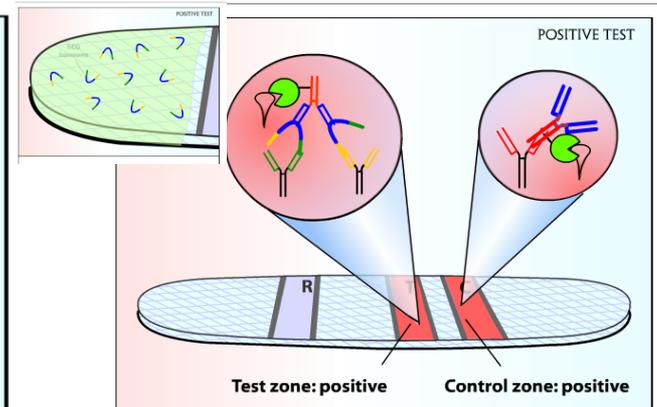
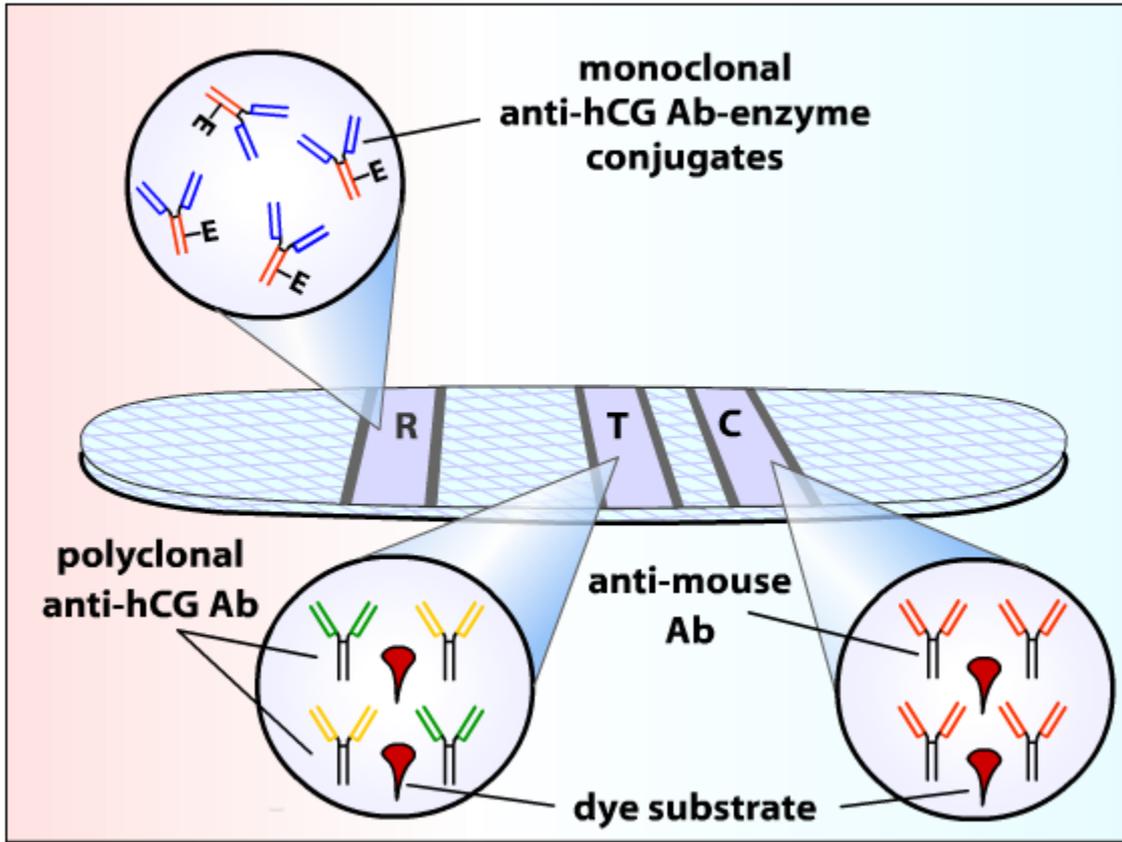
## • Sandwich ELISA

- Un anticorpo di cattura per l'Ag è immobilizzato sul supporto
- Un anticorpo primario non marcato riconosce l'antigene
- Un secondo anticorpo marcato con l'enzima (anticorpo secondario) che riconosce l'anticorpo primario
- Il vantaggio è che l'antigene non deve essere purificato prima di fare il saggio per evitare crossreattività, alta specificità
- Bisogna scegliere attentamente i due Ab (cattura e primario) perché non deve esserci competizione per gli stessi siti determinanti dell'Ag
- $Q_t$

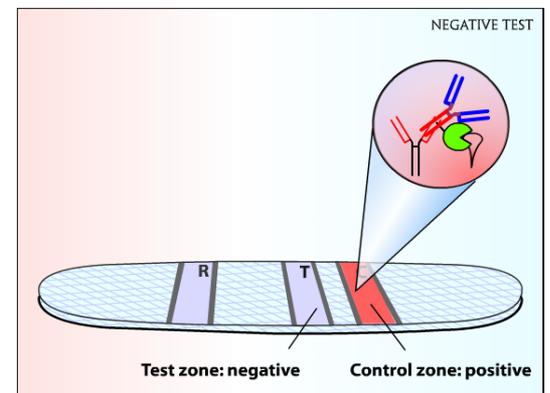
Spesso: Ab cattura è policlonale  
Ab primario monoclonale



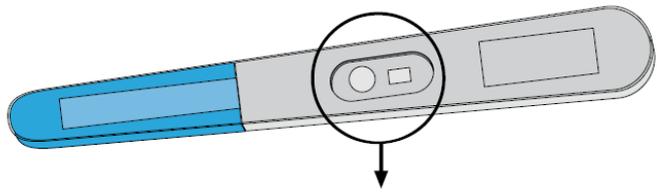
# TEST DI GRAVIDANZA: Presenza di gonadotropina corionica umana



ELISA pregnancy test result: hCG hormone detected in sample and test activity confirmed.



ELISA pregnancy test result: no hCG hormone detected in sample and test activity confirmed.



## Falsi negativi

- Test eseguito precocemente: la concentrazione di hCG è sotto il limite di rivelabilità del test
- Test eseguito senza seguire scrupolosamente le istruzioni
- Urine diluite (per assunzione di molta acqua o per l'utilizzo di diuretici)
- Test scaduto

## Falsi positivi: non sono comuni

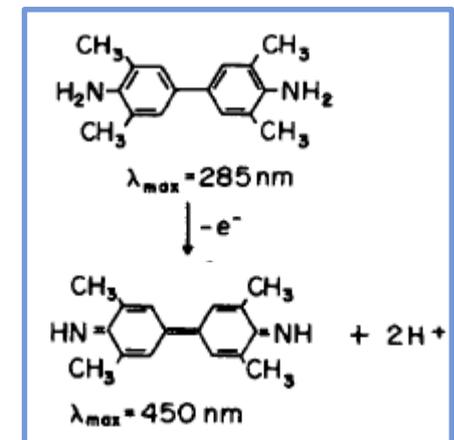
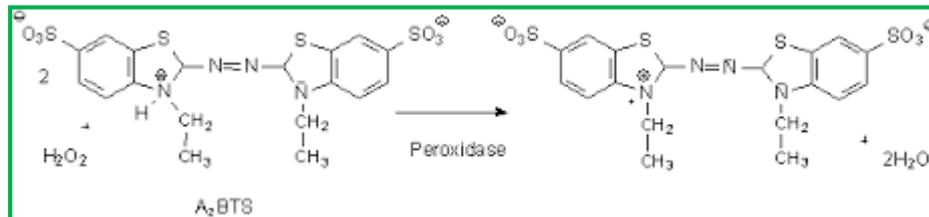
- Gravidanza ectopica e gravidanza molare
- Linee di evaporazione dell'urina
- Farmaci
- Condizioni mediche (certi tumori, cisti ovariche, problemi ai reni, menopausa)
- Precedenti aborti (indotti o spontanei, gravidanza chimica)
- Tempo di lettura (oltre il tempo consigliato)
- Test scaduto

# Test di conferma su plasma

Settimane di gravidanza	Valore beta hCG nel sangue
3-4	9-130 mIU/ml
4-5	75-2600 mIU/ml
5-6	850-20.800 mIU/ml
6-7	4.000-100.200 mIU/ml
7-12	11.500-289.000 mIU/ml
12-16	18.300-137.000 mIU/ml
16-29 (secondo trimestre)	1.400-53.000 mIU/ml
29-41 (terzo trimestre)	940-60.000 mIU/ml

## Enzimi e substrati per i saggi immunoenzimatici

- L'enzima deve avere un alto numero di turn-over. I più comuni sono la fosfatasi alcalina (AP) e la perossidasi di rafano (HRP)
- I substrati dovrebbero essere poco costosi, stabili e sicuri. Ma soprattutto devono essere convertiti in una sostanza colorata
  - AP: p-nitrofenilfosfato  $\rightarrow$  p-nitrofenolo (giallo)
  - HRP
    - ABTS, acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico)  $\rightarrow$  composto verde (410 nm)
    - TMB, tetrametilbenzidina  $\rightarrow$  composto blu



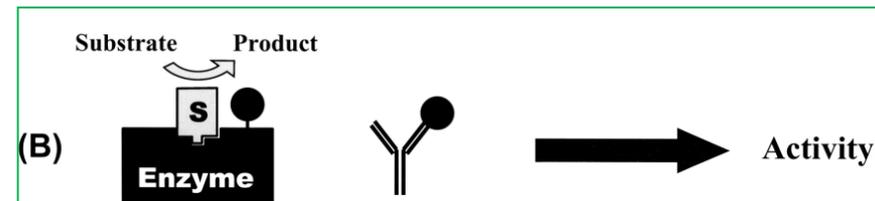
# EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)

- È una tecnica enzimo-immunochimica in fase omogenea (soluzione)
- I **componenti iniziali** del sistema sono:
  - Ab a concentrazione nota
  - Ag marcato con l'enzima a concentrazione nota

A. L'Ab riconosce l'Ag formando un complesso che impedisce all'enzima di svolgere la sua attività catalitica



B. Quando si aggiunge il campione che contiene l'analita di interesse (Ag non marcato), esso compete per l'Ab e libera l'Ag marcato con l'enzima che ora può catalizzare la reazione. Si aggiunge il substrato e si misura l'A.



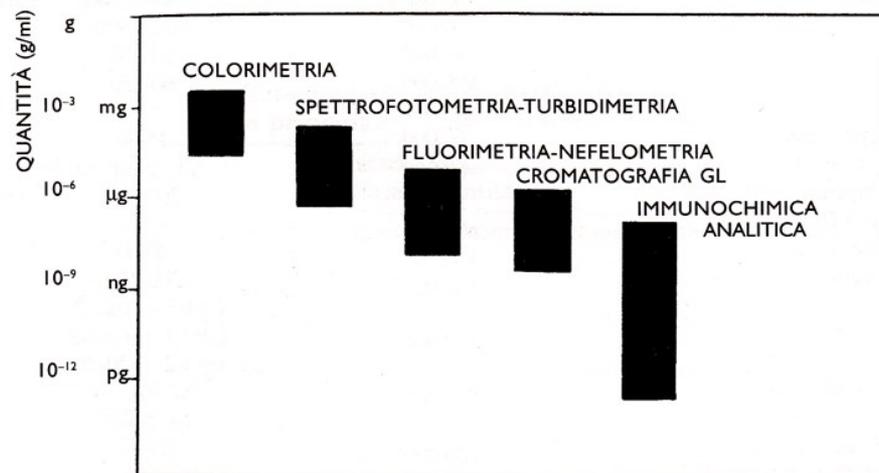
- La scelta dell'enzima viene fatta in base:
  - Attività al pH ideale di formazione del complesso Ag/Ab
  - Sensibilità del suo dosaggio
  - Costo e facilità di ottenerlo puro
  - Gruppi reattivi senza perdere di attività catalitica
  - Non deve essere inibito da sostanze presenti nei liquidi biologici
  - Non deve essere presente in quantità misurabile nei liquidi biologici analizzati
 Tali caratteristiche vengono rispettate per esempio da lisozima, G-6-PDH e MDH.
- Tecnica utilizzata soprattutto per **farmaci e droghe**

Sostanza	Urina	Siero	Enzima
Anfetamine	Y		Lisozima
Barbiturici	Y		Lisozima
Metadone	Y		Lisozima
Oppiacei	Y		Lisozima
Digossina		Y	G-6-PD
Fenitoina		Y	G-6-PD
Fenobarbital		Y	G-6-PD

# Applicazioni cliniche dei metodi immunochimici

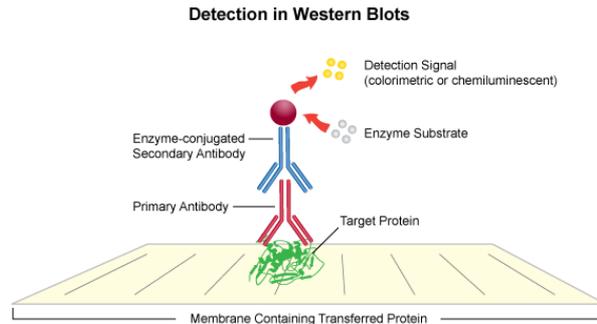
Larga applicazione sia per misure qualitative che quantitative di Ag, Ab e apteni:

- **Ormoni** del sangue, saliva, urine (ormoni ipotalamo ipofisari, della tiroide, corticosurrenali, della midollare del surrene, delle gonadi)
- **Immunoglobuline**
- **Farmaci** nel siero e nelle urine (es. antiepilettici, antidepressivi, cardioattivi, immunosoppressivi, antibiotici, citostatici)
- **Droghe** d'abuso nei fluidi biologici (oppiacei, allucinogeni, cannabinoidi, cocaina)
- **Proteine** marker di disfunzioni specifiche
- **Infezioni**: Helicobacter Pylori, Herpes, Rubella (rosolia), Brucella, Toxoplasma, Epatite



**Figura 18.10.** Livelli di sensibilità di alcune tecniche di misura comunemente impiegate in chimica-clinica; i metodi immunochimici (con vari marcatori) presentano i livelli di sensibilità nettamente più elevati.

# Western blot, applicazioni



- Ricerca degli anticorpi IgG e IgM contro spirochete come il *Treponema pallidum* (sifilide) e *Borrelia burgdorferi* (borreliosi di Lyme). RIBA= recombinant immuno
- HIV, HCV blot assay
- Ricerca degli anticorpi anti-LC1 (anti citosol epatico) e anti-SLA (anti-antigene epatico solubile) per la diagnosi di epatiti autoimmuni → immunoblot

## Sample preparation

Lysis of sample in appropriate lysis buffer



Protein assay to determine protein concentration  
Add loading buffer, heat at 100°C 10min.

## Loading the gel

Optimize loading amount according to the expression level of the protein

Prepare running buffer;  
Assemble the gel in the tank

## Running the gel

Successful separation of proteins through the gel due to different molecular sizes; the smaller the protein is, the faster it moves towards the anode.



## Transfer proteins from the gel to the membrane

Prepare transfer buffer;  
assemble transfer stack

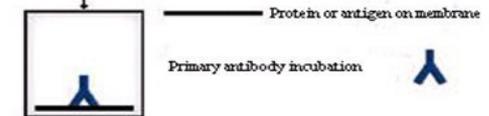


Check the transfer by ponceau red staining  
or coomassie staining of the gel

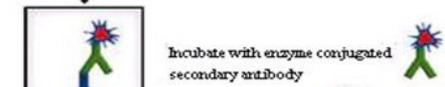
Incubate membrane in 5% non-fat milk or BSA;  
for phosphoproteins, BSA can only be used.

## Blocking

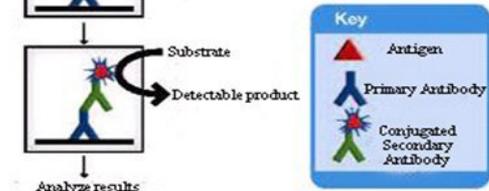
### Primary Antibody Incubation



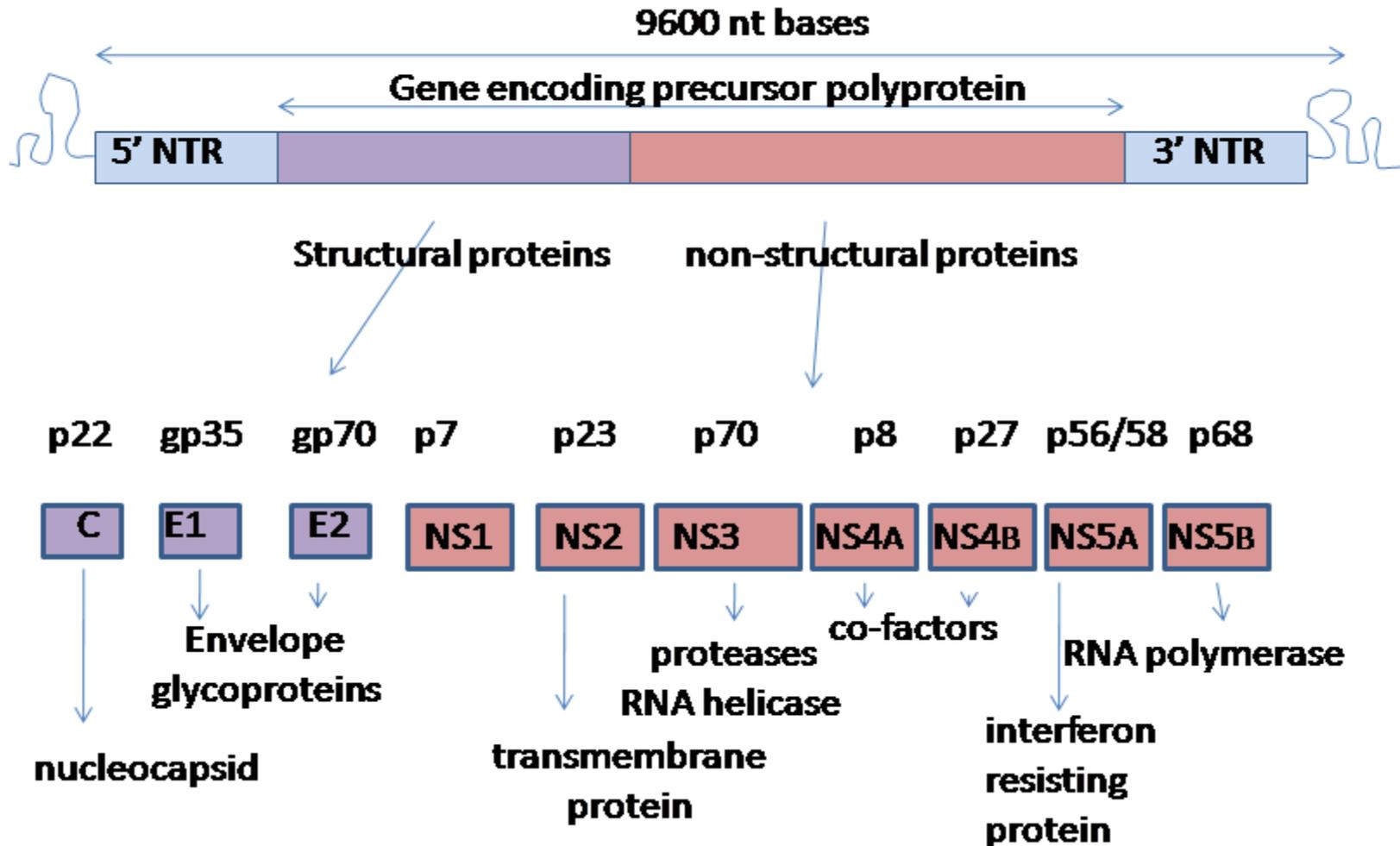
### Secondary Antibody Incubation

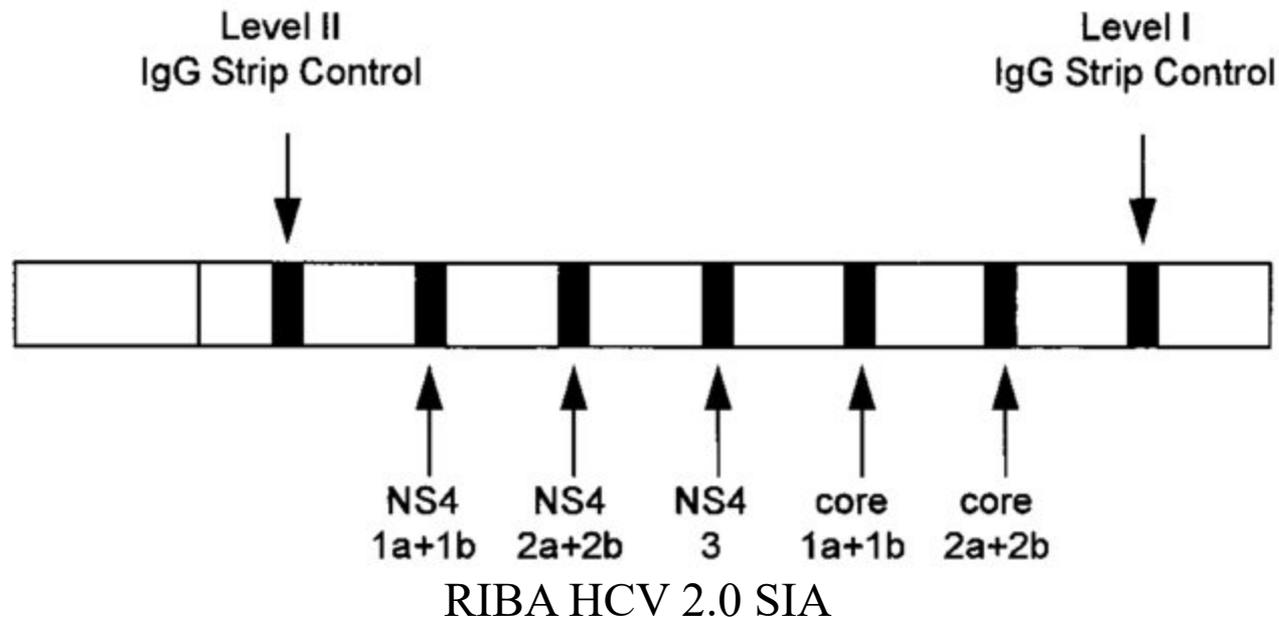


### Detection



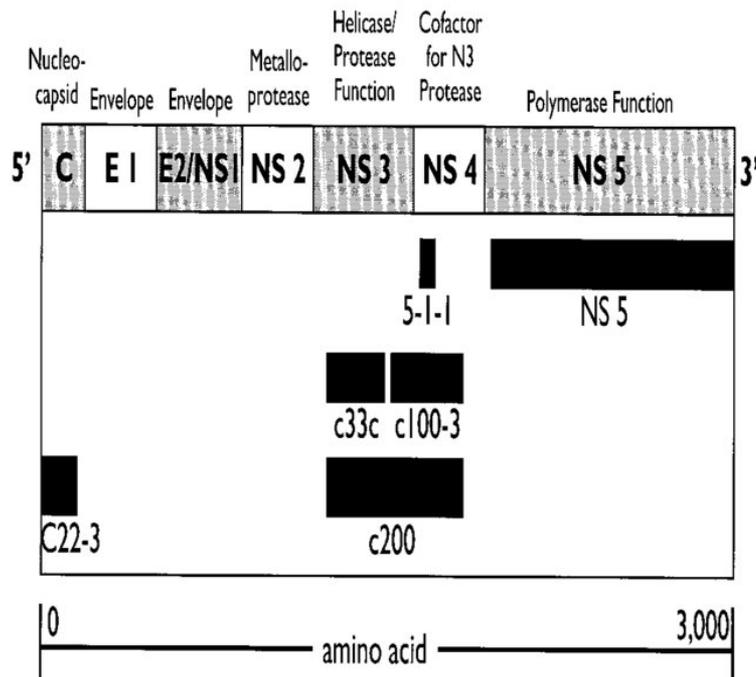
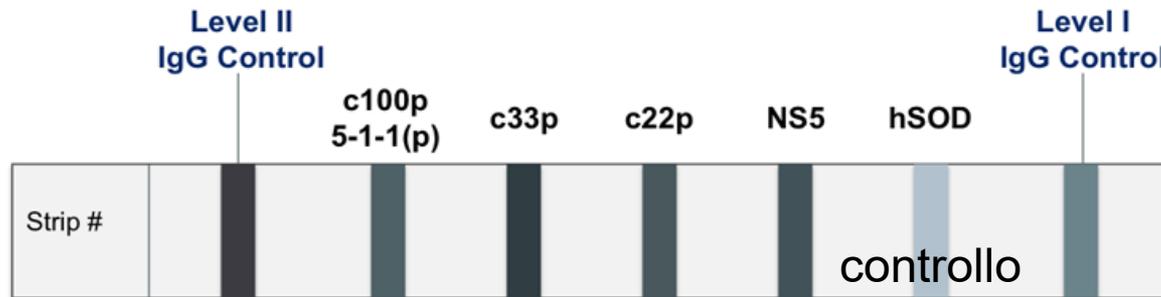
## Hepatitis C virus RNA





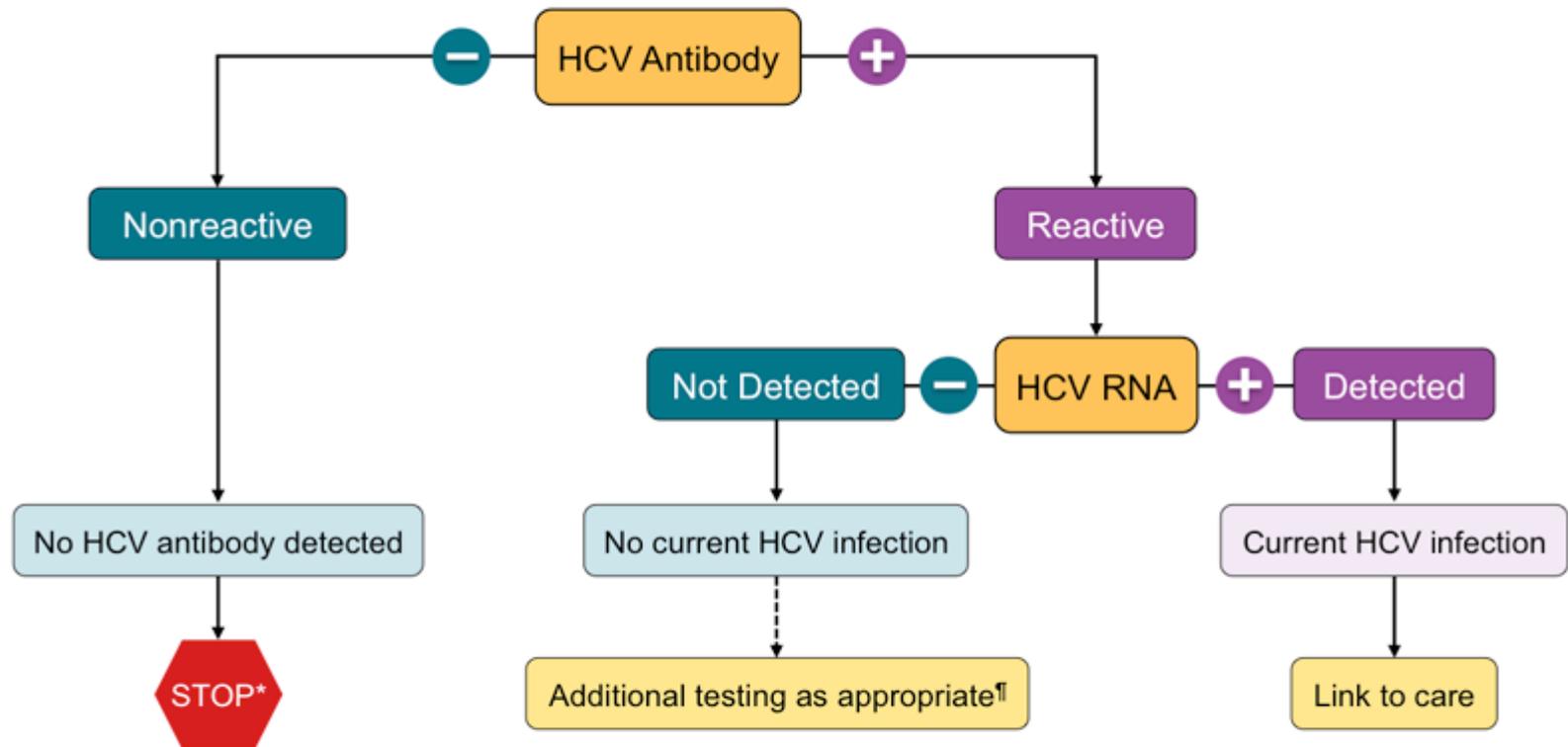
- eight synthetic HCV-encoded peptides immobilized as bands on the test strips
- six HCV genotypes have been distinguished
- HCV seropositivity is confirmed only when at least two bands show reactivities
- 1 positive is indeterminate

## HCV RIBA 3.0



- Substantial reduction in the number of patients' specimens classified as indeterminate.

## Recommended Testing Sequence for Identifying Current HCV Infection

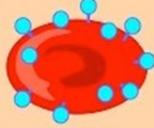
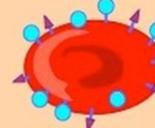
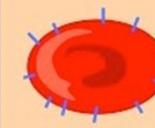
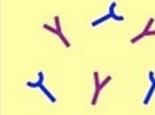


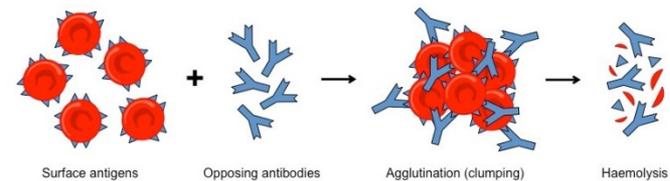
\* For persons who might have been exposed to HCV within the past 6 months, testing for HCV RNA or follow-up testing for HCV antibody is recommended. For persons who are immunocompromised, testing for HCV RNA can be considered.

†To differentiate past, resolved HCV infection from biologic false positivity for HCV antibody, testing with another HCV antibody assay can be considered. Repeat HCV RNA testing if the person tested is suspected to have had HCV exposure within the past 6 months or has clinical evidence of HCV disease, or if there is concern regarding the handling or storage of the test specimen.

# Agglutinazione

- Fenomeno per cui anticorpi specifici (agglutinine) provocano l'agglomeramento di cellule isolate (batteri, globuli rossi ecc.) presentanti l'Ag specifico e la loro precipitazione. **Ag corpuscolato**
- Utilizzata in ematologia per determinare il gruppo sanguigno

	Type A	Type B	Type AB	Type O
<b>Antigen</b> (on RBC)	Antigen A 	Antigen B 	Antigens A + B 	Neither A or B 
<b>Antibody</b> (in plasma)	Anti-B Antibody 	Anti-A Antibody 	Neither Antibody	Both Antibodies 
<b>Blood Donors</b>	Cannot have B or AB blood Can have A or O blood	Cannot have A or AB blood Can have B or O blood	Can have any type of blood Is the universal recipient	Can only have O blood Is the universal donor



Phenotype	Genotype
Blood Type A	$I^A I^A$ or $I^A i$
Blood Type B	$I^B I^B$ or $I^B i$
Blood Type AB	$I^A I^B$
Blood Type O	$ii$

- Esiste poi un ulteriore antigene che può essere o no presente sulla superficie dei globuli rossi e che può stimolare la produzione di agglutinine, il fattore Rh (soggetti Rh positivi e negativi)

Per determinare il gruppo sanguigno basterà mettere a contatto una goccia di antisiero (che contiene l'Ab) con una goccia di sangue (Ag) ed osservare in quale vetrino si osserva l'agglutinazione.

<b>anti-A</b>					
<b>anti-B</b>					
<b>anti-Rh</b>					
<b>gruppo</b>	<b>AB Rh+</b>	<b>A Rh-</b>	<b>B Rh-</b>	<b>O Rh+</b>	<b>O Rh-</b>

Altre applicazioni della reazione di agglutinazione sono la diagnosi di malattie infettive (tifo, brucellosi), di anemie emolitiche da anticorpi e nella ricerca del fattore reumatoide (Reuma Test).

# Tecniche analitiche

- Spettroscopia molecolare
  - assorbimento UV-VIS, luminescenza, riflettanza
- Spettrometria di massa
- Tecniche elettrochimiche
- Determinazione dell'attività enzimatica
- Tecniche immunologiche
- Tecniche per la diagnosi molecolare

# Diagnostica molecolare

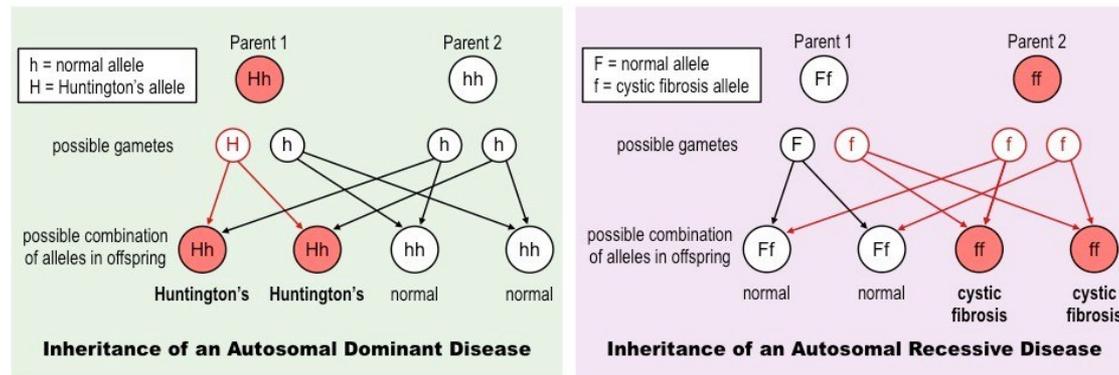
Processo di identificazione di una patologia mediante lo studio degli acidi nucleici (DNA ed RNA) nei tessuti o fluidi biologici.

# Applicazioni cliniche della diagnosi molecolare

Per malattie genetiche o tumorali si cerca il **GENE MALATTIA**

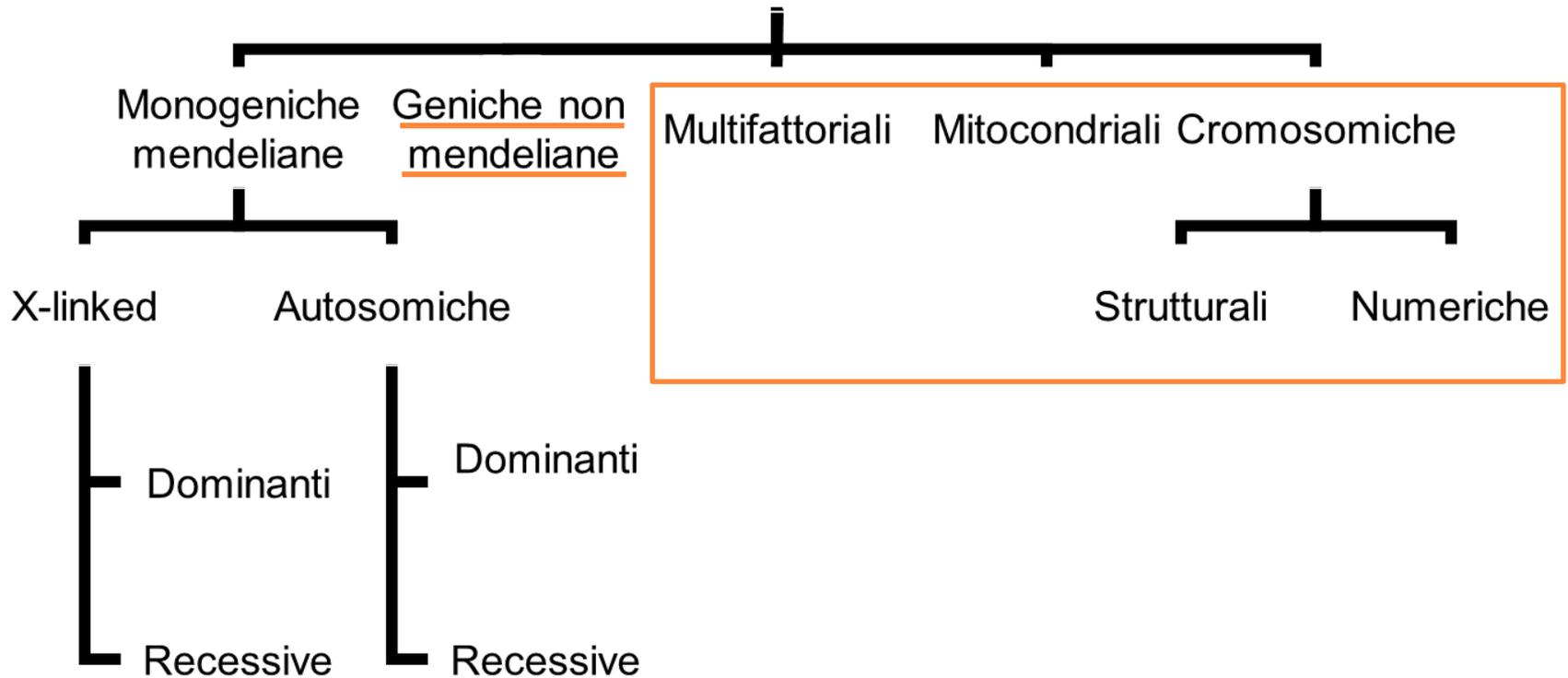
## Diagnosi molecolare di malattie genetiche

- Diverse centinaia di malattie nell'uomo hanno una origine in alterazioni genetiche; l'identificazione di tali mutazioni può essere utile per validare o formulare una diagnosi corretta ma anche per prevenzione.
- Le malattie genetiche si hanno quando una mutazione ad uno o più geni interferisce con la normale funzione cellulare, portando allo sviluppo del fenotipo della malattia.
- Esse possono essere causate da alleli recessivi, dominanti o co-dominanti.



- **Alleli co-dominanti** : basta una copia dell'allele malattia per avere il fenotipo. Un soggetto eterozigote però mostra sintomi più lievi perchè c'è anche l'effetto dell'allele normale (anemia falciforme)

# Malattie genetiche



# Applicazioni cliniche della diagnosi molecolare

Per malattie genetiche o tumorali si cerca il *GENE MALATTIA*

## Diagnosi molecolare delle neoplasie maligne

Ha permesso l'identificazione

- Oncogeni (es. fattori di crescita)
- Oncosoppressori
- Traslocazioni cromosomiche che determinano l'attivazione di oncogeni

il cui ruolo nelle malattie neoplastiche è ormai noto.

Si può trattare di mutazioni germinali o somatiche.

Ha permesso di definire nuovi parametri sia per la diagnosi che per la prognosi.

# Applicazioni cliniche della diagnosi molecolare

## Diagnosi di malattie infettive

In generale si può basare su:

- Identificazione morfologica e/o fisiologica del patogeno isolato dall'organismo malato
- Identificazione dei prodotti del patogeno nell'organismo malato
- Identificazione dei prodotti di reazione dell'organismo malato nei confronti del patogeno (Ab → metodi immunologici)
- Identificazione del materiale genetico del patogeno nell'organismo malato → **DIAGNOSI MOLECOLARE**



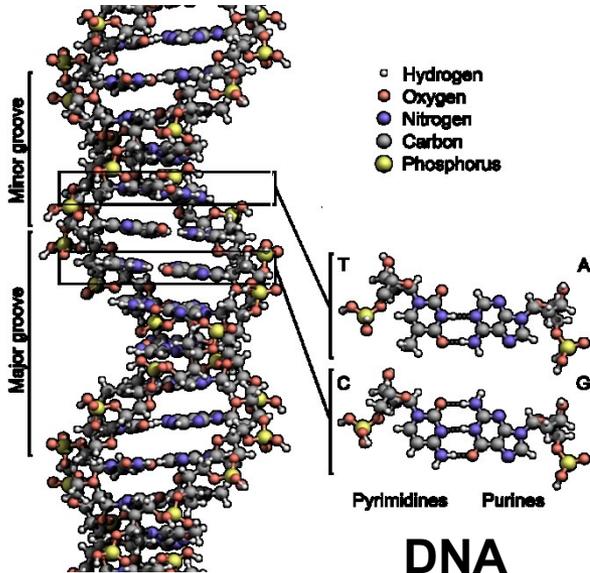
Complementare o in sostituzione all'approccio immunologico o colturale

Per malattie infettive si possono cercare geni che forniscono funzioni essenziali al microrganismo o geni peculiari della specie patogena (discriminanti) o geni di virulenza per i virus

# Tecniche di diagnosi molecolare

- PCR
- Ibridazione molecolare
- Reverse Dot Blot
- RT-PCR

# Acidi nucleici

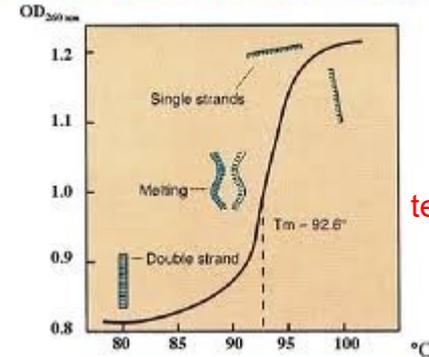


Denaturazione con l'aumento della T

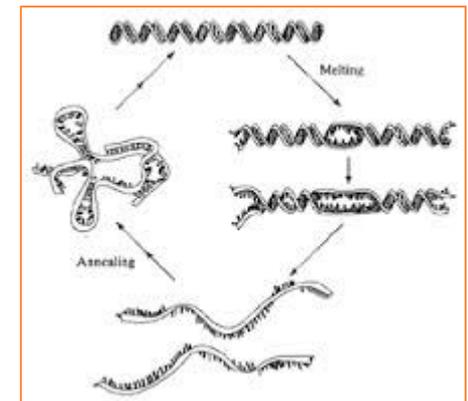


Rinaturazione con l'abbassamento della T  
 Serve una nucleazione (accoppiamento di 3 basi) poi il processo procede in modo automatico

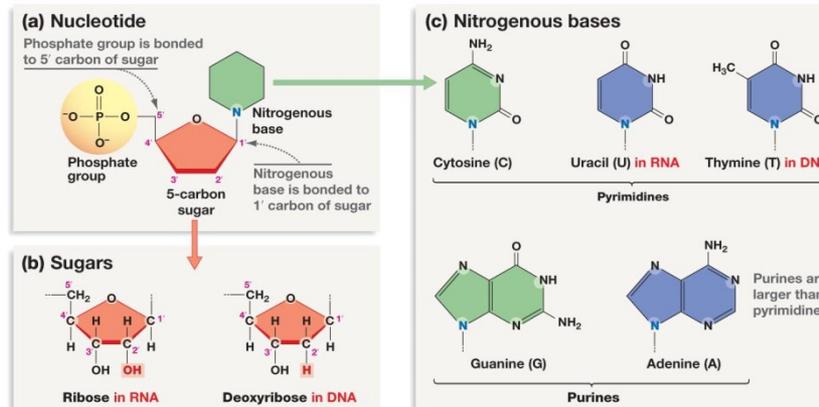
La denaturazione termica del DNA e l'“effettoiperomero”



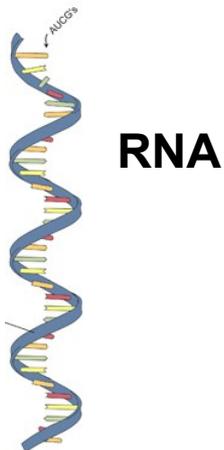
Melting temperature



## DNA



## Nucleotidi



# PCR, *polymerase chain reaction*

Kary Mullis

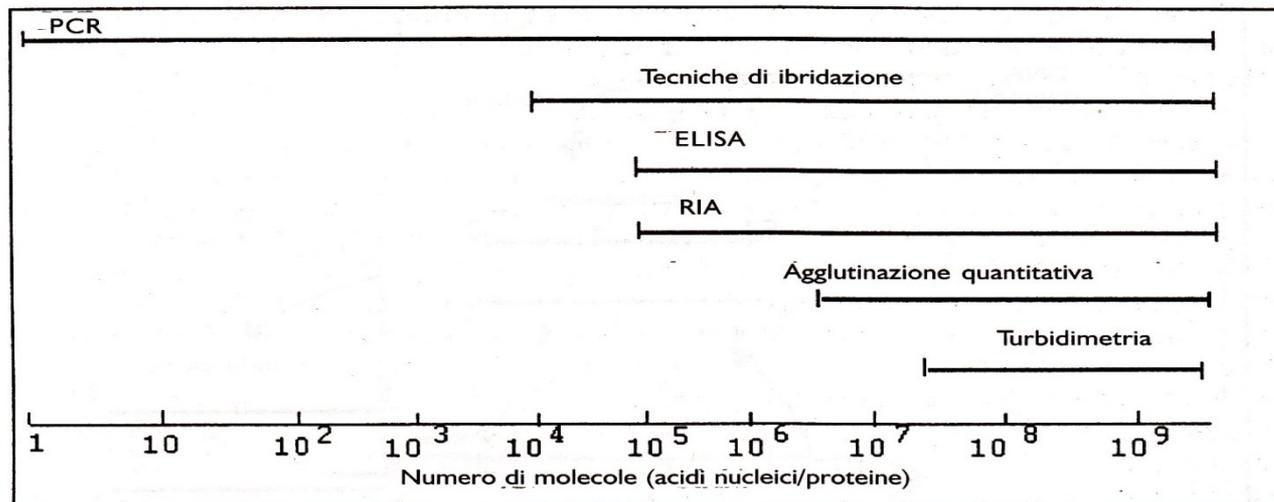
Nobel per chimica 1993



La PCR è una tecnica che amplifica in modo esponenziale la sequenza nucleotidica bersaglio del campione biologico permettendo di raggiungere una sensibilità notevolmente superiore che con i metodi di ibridazione tradizionali

Nuove acquisizioni  
fisiopatologiche

Nuove applicazioni  
diagnostiche



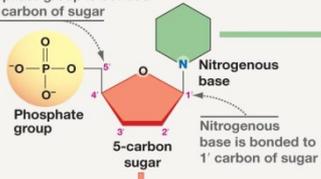
è possibile amplificare:

- dsDNA
- ssDNA
- previa retrotrascrizione dell'RNA in cDNA anche RNA

**Figura 19.5.** Limiti di sensibilità dei principali metodi diagnostici per la determinazione di proteine o acidi nucleici in un campione biologico.

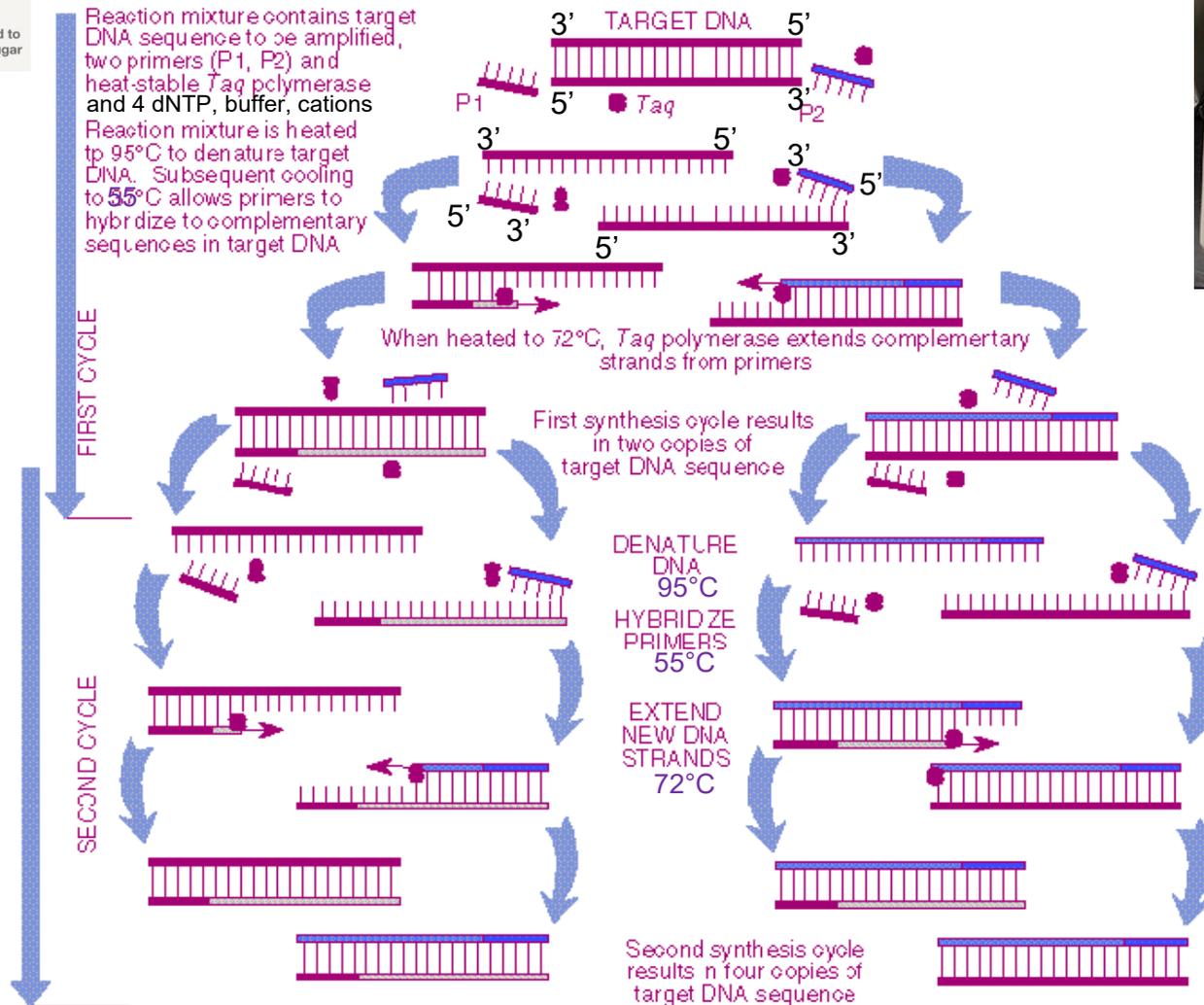
**(a) Nucleotide**

Phosphate group is bonded to 5' carbon of sugar

**DNA Amplification Using Polymerase Chain Reaction**

Reaction mixture contains target DNA sequence to be amplified, two primers (P1, P2) and heat-stable *Taq* polymerase and 4 dNTP, buffer, cations

Reaction mixture is heated to 95°C to denature target DNA. Subsequent cooling to 55°C allows primers to hybridize to complementary sequences in target DNA

Source: *DNA Science*, see Fig. 13.n cicli  $\rightarrow$   $2^n$  copie

Generalmente si effettuano  
30-40 cicli



- Basta una quantità piccola di campione quindi il campionamento è spesso meno invasivo:
  - Uretrite infettiva → sedimento delle urine invece che tampone uretrale
  - Linfomi/leucemie → cellule mononucleate del sangue periferico invece che prelievo di midollo
  - Helicobacter pylori → pochi  $\mu\text{L}$  di saliva

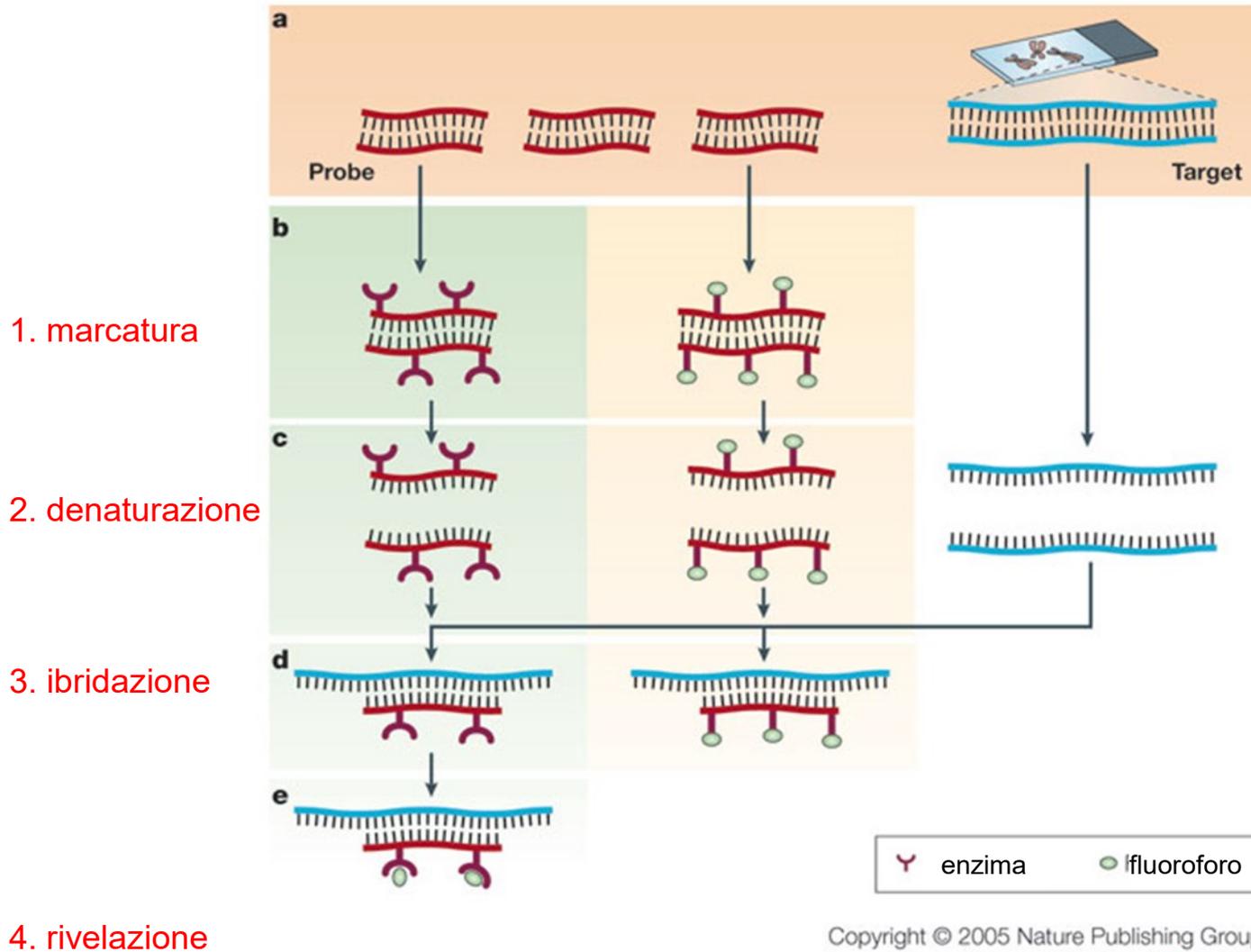
# Rivelazione del prodotto amplificato

- È sufficiente una semplice gel elettroforesi per visualizzare il DNA amplificato, colorazione con l'intercalante etidio bromuro e visualizzazione all'UV (302 nm è la  $\lambda_{\max}$  dell'etidio bromuro intercalato)
- Per verificare la **specificità** del prodotto ottenuto è necessario utilizzare la tecnica dell'**ibridazione molecolare**.
- Real time PCR

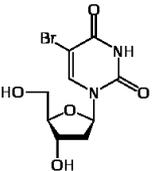
# Reazioni di ibridazione

- Sono reazioni tra una molecola di acido nucleico bersaglio (*target*) e una molecola di acido nucleico sonda marcata (*probe*) che formano una doppia catena grazie alla complementarità di sequenza
- La formazione di ibridi fornisce informazioni sulla presenza e le caratteristiche delle molecole di acidi nucleici target

# Fasi dell'ibridazione



## Caratteristiche dell'ibridazione

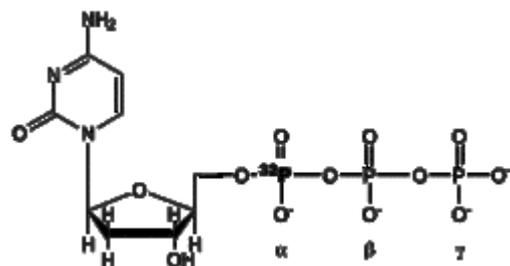
- Alta sensibilità (la costante di associazione tra sonda e target è maggiore che tra Ag e Ab)
- Alta specificità (è necessaria la complementarità di sequenza tra sonda e bersaglio)
- Per poter evidenziare l'ibridazione la **sonda** deve essere **marcata** inserendo nucleotidi marcati nella sequenza:
  - Radioisotopi (sonda calda): alta sensibilità ( $^{32}\text{P} \rightarrow < \text{pg}$ )
  - Biotina (riconosciuta da avidina marcata con enzimi o fluorocromi)
  - Bromo deossiuridinatrifosfato (BrdUTP, )  (riconosciuta da Ab specifici)
  - Digossigenina (riconosciuta da Ab specifici)
  - Enzimi (ALP, HRP,  $\beta$ -galattosidasi)
  - Sostanze fluorescenti o chemiluminescenti (marcatura diretta)

Il metodo di rivelazione dipenderà dal tipo di marcatura utilizzata:

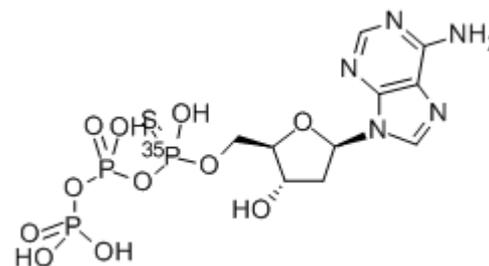
- Contatore a scintillazione
- Fluorimetro
- Spettrofotometro UV-VIS
- Ecc.

## Sonde calde

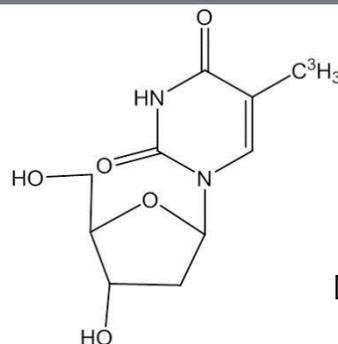
- Emissione rivelata mediante:
  - Conteggio al scintillatore → ibridazione in soluzione
  - Autoradiografia → ibridazione su filtro
- Tutti e quattro i trifosfonucleotidi sono disponibili in forma  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -nucleotide ma esistono anche derivati  $^3\text{H}$  e  $^{35}\text{S}$



$^{32}\text{P}$  alpha-deossicitidina trifosfato  
 $\alpha\text{P}^{32}$  dCTP $\alpha\text{P}$



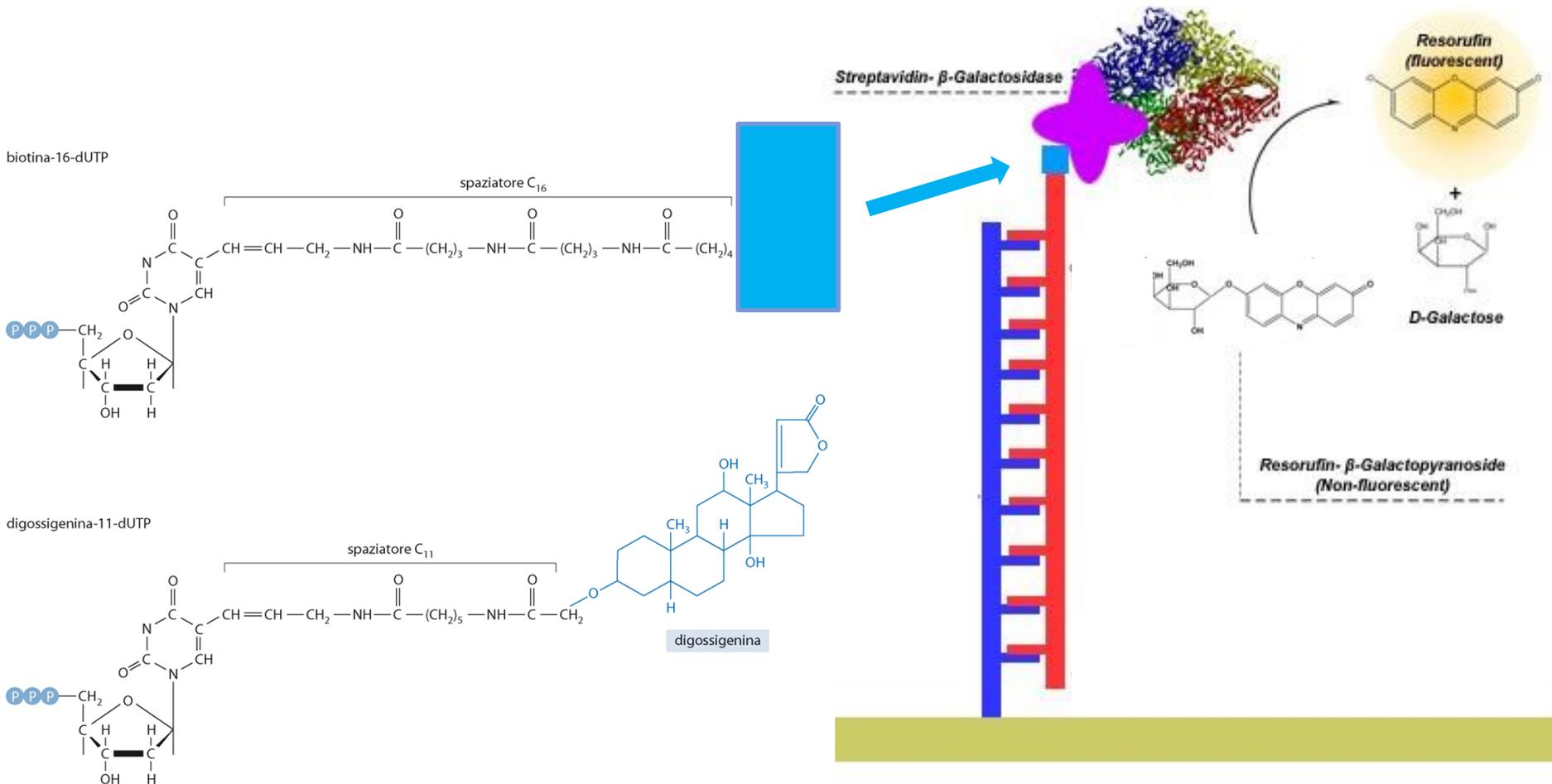
$^{35}\text{S}$  alpha-tiodeossiadenosina trifosfato  
dATP $\alpha\text{S}$



$^3\text{H}$  methyl deossitimidina trifosfato  
Methyl  $^3\text{H}$  dTTP

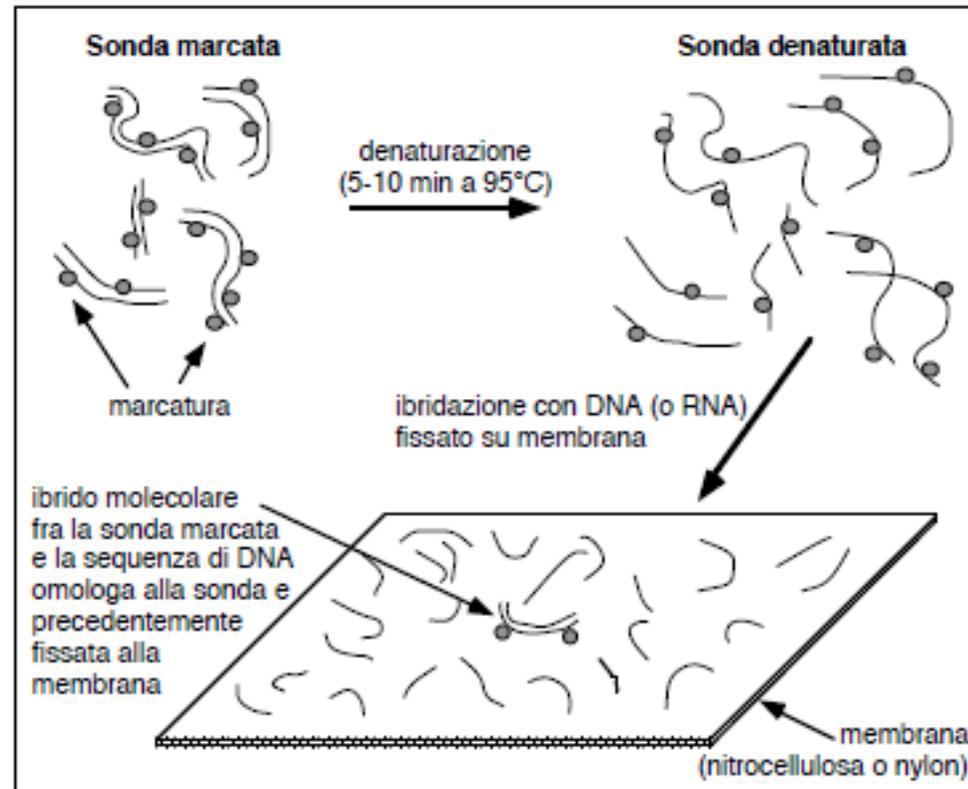
Singola marcatura in quanto manca l'OH in 3' per la polimerizzazione

# Esempi di marcature non radioattive



## Ibridazione su filtro

- Acido nucleico bersaglio immobilizzato su supporto solido (filtro) e sonda in soluzione
- Filtri: nitrocellulosa o nylon
- Il trasferimento dell'acido nucleico su filtro può avvenire:
  - In maniera diretta senza previa separazione elettroforetica (dot blot)

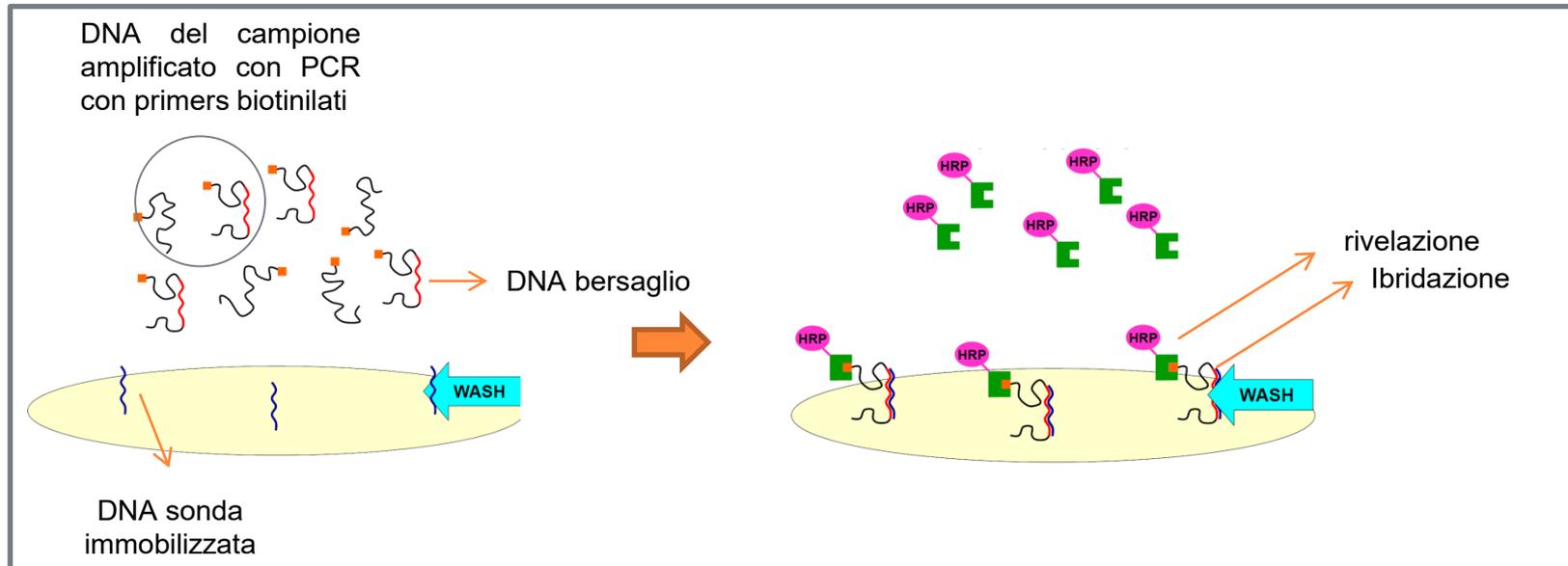


- Dopo gel-elettroforesi si effettua la denaturazione e poi il trasferimento su membrane (gel-blot)

### Southern blotting

- L'immobilizzazione su filtro (raggi UV nei filtri di nylon e calore nei filtri in nitrocellulosa)
- Seguono l'incubazione del filtro in una miscela di ibridazione contenente la sonda marcata

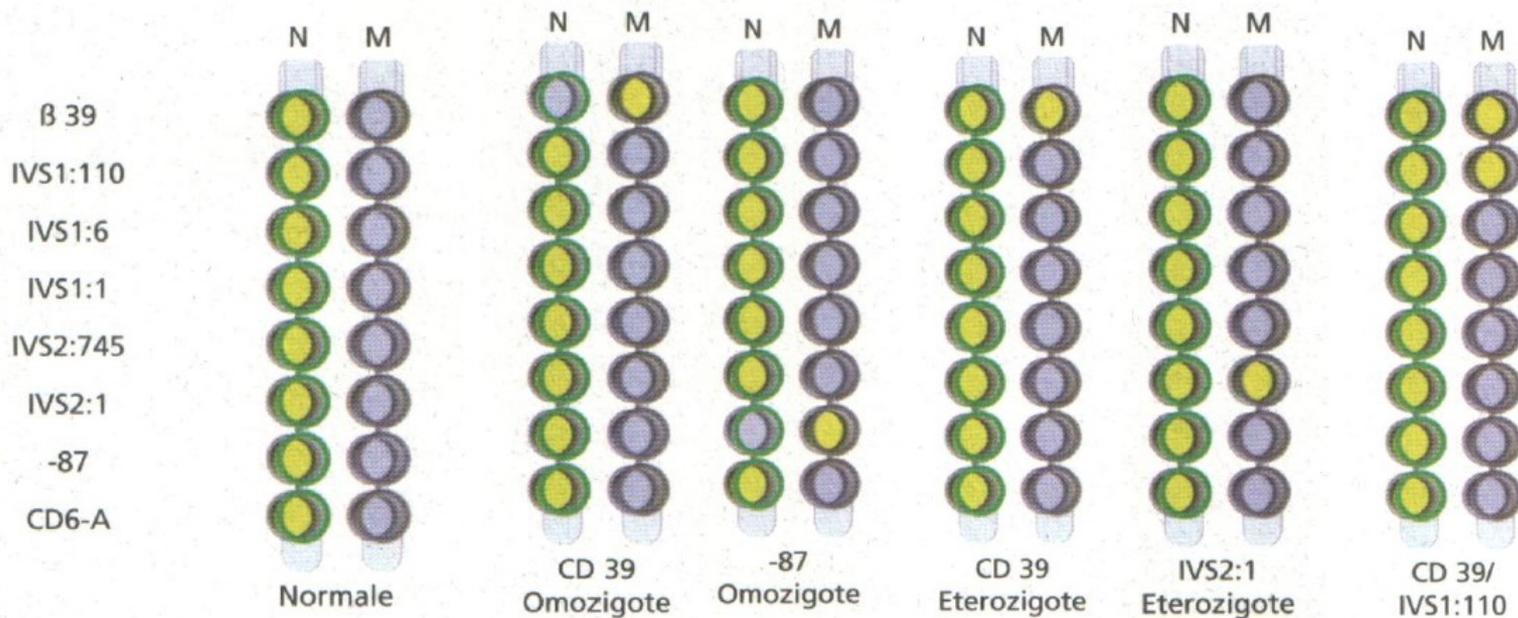
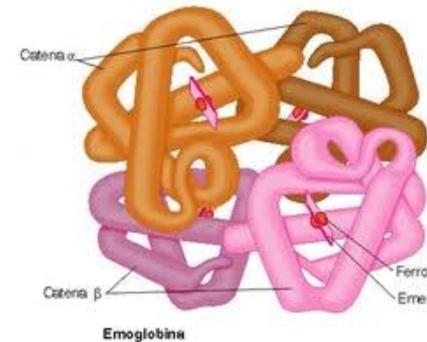
# Tecniche di ibridazione molecolare mediante *reverse dot blot, RDB*



Consente la ricerca rapida e simultanea di più mutazioni note

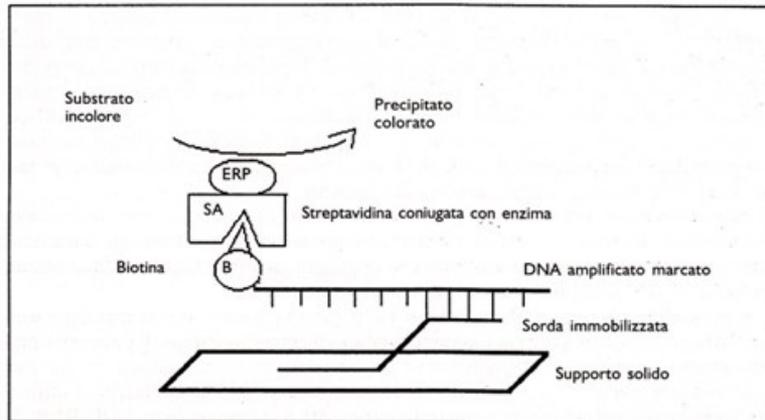
## Esempio di applicazione della RDB

La talassemia è una malattia ereditaria che comporta anemia, cioè una diminuzione della presenza di emoglobina deputata al trasporto dell'ossigeno nel sangue (emoglobinopatie). Nella beta-talassemia ci sono mutazioni nel gene per la catena beta della Hb.

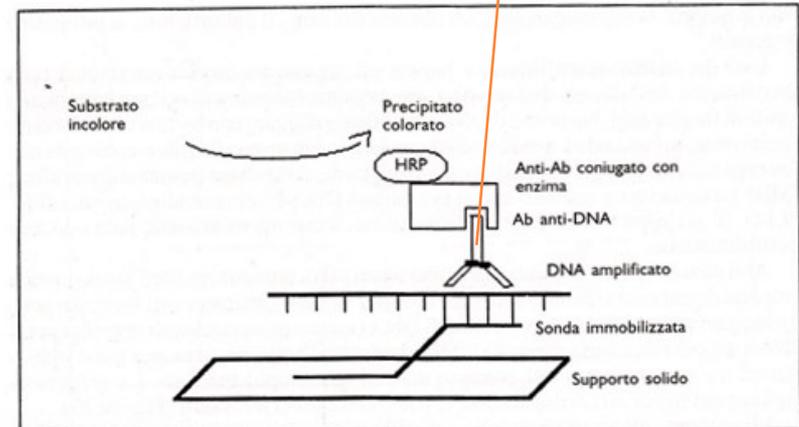


Colore giallo: ibridazione avvenuta  
 N=pozzetti con sonde di DNA normale  
 M=pozzetti con sonde di DNA mutato

Ab monoclonali che riconoscono la doppia elica di DNA



**Figura 19.12.** Esempio di metodo indiretto per la rivelazione del prodotto dell'ibridazione tra il DNA amplificato e la sonda specifica.



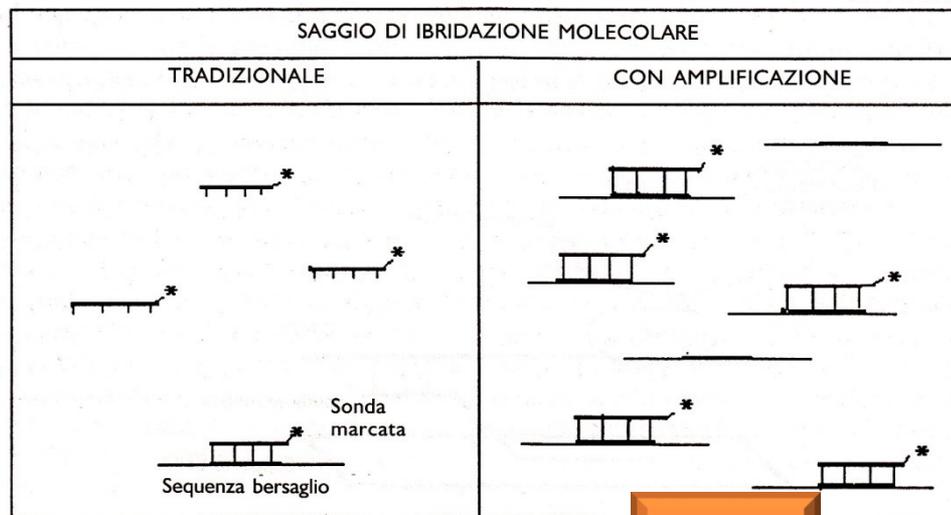
**Figura 19.13.** Esempio di metodo indiretto per la rivelazione del prodotto dell'ibridazione tra DNA amplificato e la sonda specifica.

Colore giallo: ibridazione avvenuta  
 N=pozzetti con sonde di DNA normale  
 M=pozzetti con sonde di DNA mutato

La sensibilità delle tecniche basate sull'impiego delle sonde molecolari è direttamente proporzionale al numero di copie di DNA bersaglio da identificare



Se la quantità di acido nucleico bersaglio è scarsa non c'è rivelazione dell'ibrido



PCR

# RT-PCR *Reverse transcriptase-PCR*

**Purpose:** Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) is similar to the PCR except its allows amplification of small amounts of ribonucleic acid (RNA). RT-PCR is used to detect viruses with an RNA genome and to detect RNA transcripts.



FIG. 1. RNA template. Prior to initiating reverse transcription the template RNA must be isolated from the sample to be tested. This figure shows a polyadenylated mRNA.

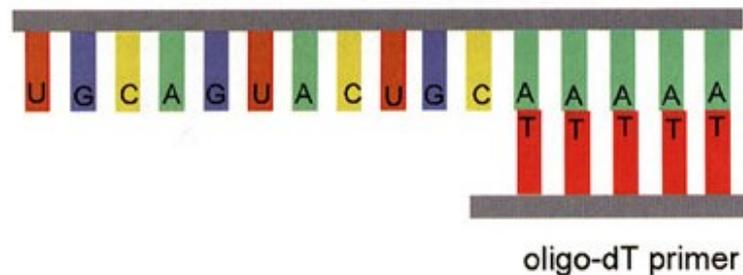


FIG. 2. Priming for reverse transcription. To generate cDNA using the enzyme reverse transcriptase (RT), a primer is annealed to the template RNA. The primer can be gene specific primers, random primers or oligo-dT primers for mRNA. In this example, oligo-dT primers are used to initiate cDNA synthesis from mRNA.

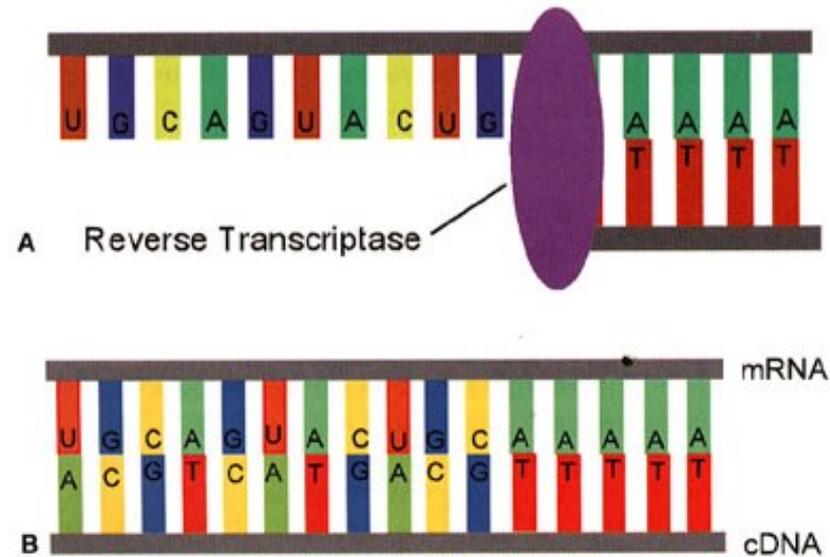


FIG. 3. First strand synthesis. The first strand of cDNA is synthesized using RT. Beginning at the primer annealing site (A), RT adds complementary nucleotide bases to the mRNA strand creating a strand of cDNA (B).



FIG. 4. Removal of RNA. The template strand of RNA is removed by treatment with RNase H. The cDNA can now be used for amplification by PCR.

# Real time PCR (qPCR)

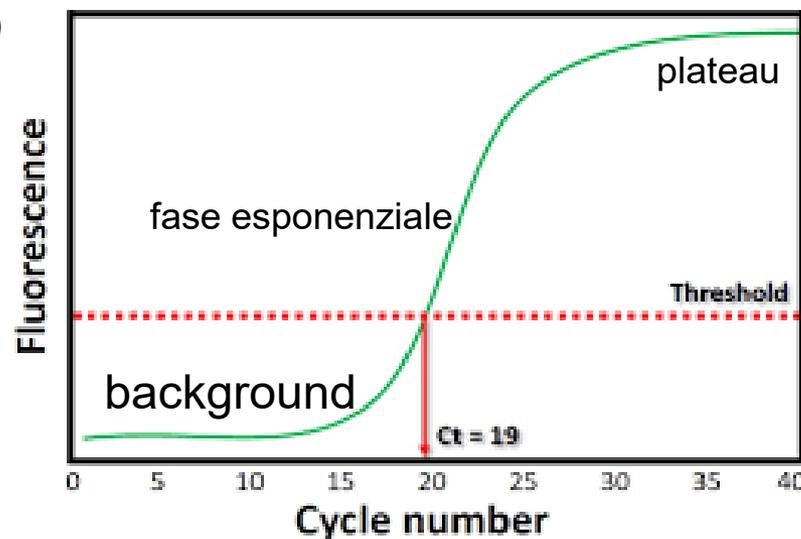
Il prodotto amplificato viene quantificato ad ogni ciclo

La quantificazione avviene grazie all'aggiunta di una sostanza fluorescente:

- un colorante che si intercala nel DNA

- un probe o primer marcato con un fluorescente

$C_T$  (cycle threshold) è il numero di cicli in cui la fluorescenza diventa rilevabile rispetto al rumore di fondo:  
dipende dal numero di copie di acido nucleico presenti nel campione iniziale



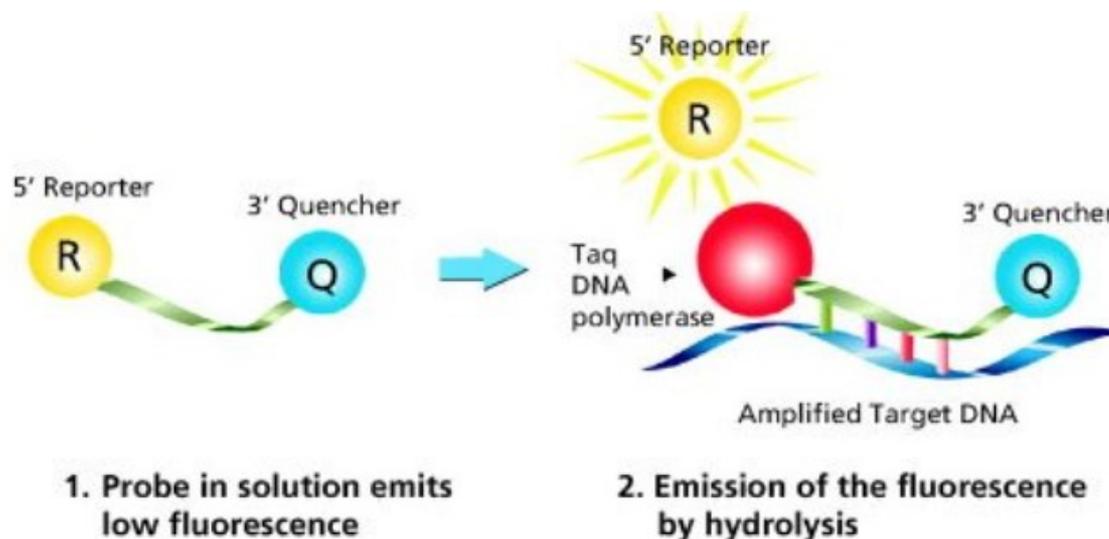
# Real time PCR (qPCR)

Il prodotto amplificato viene quantificato ad ogni ciclo

La quantificazione avviene grazie all'aggiunta di una sostanza fluorescente:

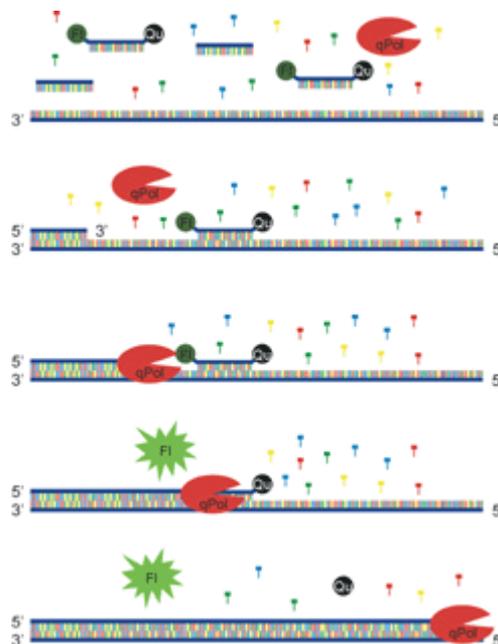
un colorante che si intercala nel DNA

un probe o primer marcato con un fluorescente



# Dual labeled fluorescent probes

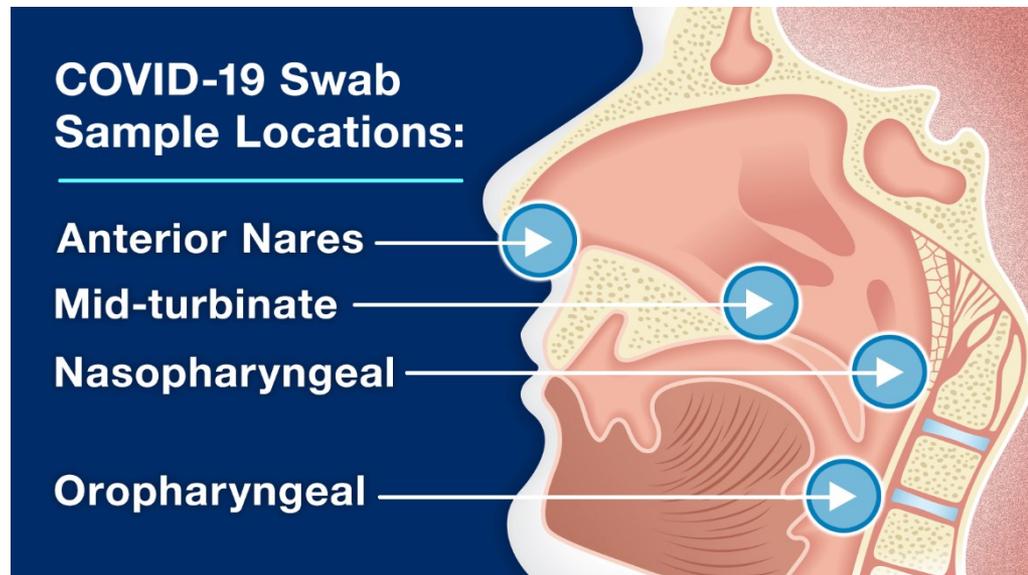
Dual Labeled Fluorescent Probes are DNA oligonucleotides of 20-30 bp carrying a fluorophore (5'-end) and a quencher (3'-end). The labeled probe hybridizes sequence-specifically to its complementary section of the amplicon. During DNA extension of each PCR cycle, the fluorophore reporter is being cleaved and released. The resulting, detectable fluorescence signal is proportional to the amount of accumulated PCR product.



# TEST per COVID 19

	Molecolare	Antigenico	Sierologico
Cosa cerca	RNA	proteine	Ab (IgA, IgG, IgM)
Campione	Tampone orofaringeo, nasofaringeo o nasale	Tampone nasofaringeo o nasale, saliva	Sangue
Tempi analisi	ore	test rapido (15 minuti)	ore Possibile anche solo qualitativo rapido (15 minuti)
Informazione se +	Infezione attiva	Infezione attiva	Infezione avvenuta
Accuratezza	Elevata	Accurata per + ma alta percentuale di FN. Negativi da confermare con test molecolare.	Può necessitare di un secondo test

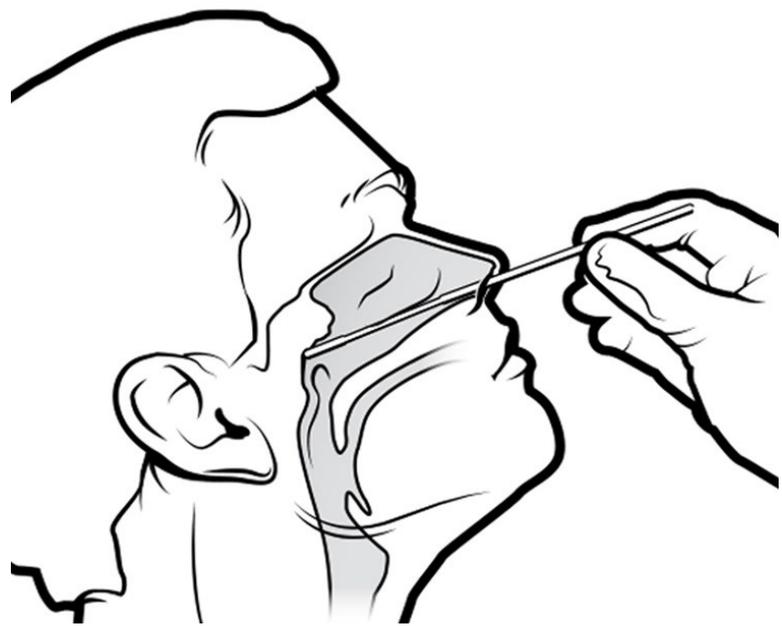
# TEST per COVID 19



## Tipi di tampone

- Anterior Nares (Nasal) – takes a sample from just inside the nostrils
- Mid-turbinate – takes a sample from further up inside the nose
- Nasopharyngeal – takes a sample from deep inside the nose, reaching the back of the throat
- Oropharyngeal – takes a sample from the middle part of the throat (pharynx) just beyond the mouth

**Saliva samples** are collected by spitting into a tube rather than using a nose or throat swab.



# TEST per COVID 19

The presence of SARS-CoV-2 in saliva may be related to different sources such as

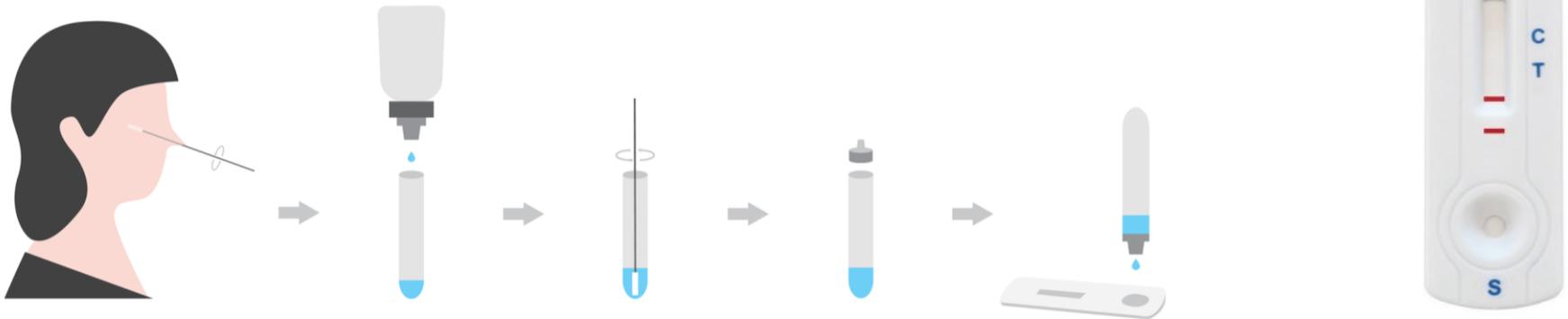
- i) virus entry to the oral cavity from lower/upper respiratory tract
- ii) access to the mouth via oral cavity-specific crevicular fluid
- iii) release of viral particles in the oral cavity via salivary ducts from the infected salivary glands

The latter observation may explain how COVID-19 transmission can occur through asymptomatic cases with no obvious infection in the respiratory tracts.

# TEST per COVID 19

## Test antigenico rapido:

- ricerca proteine presenti sulla superficie virale di SARS-CoV-2 (Ag): specifici peptidi (porzioni proteiche) della proteina S (Spike) o N (nucleocapside) del virus
- Utilizza Ab policlonali o monoclonali
- I test antigenici sono di tipo qualitativo (sì/no)



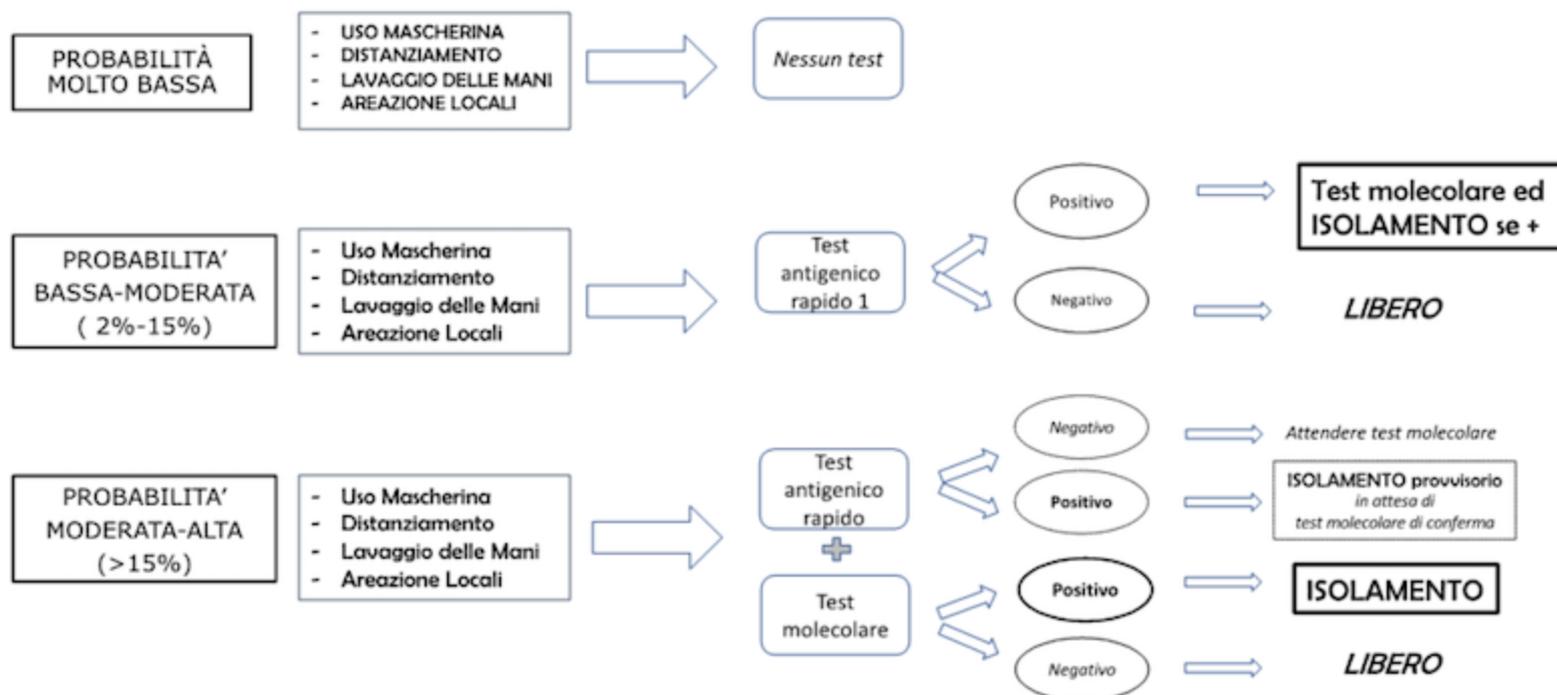
Una volta raccolto un campione, il tampone viene inserito in una provetta con un liquido per estrarre la molecola target.

$$Sp = VN/(VN+FP) = 99,22\%$$

$$Se = VP/(VP+FN) = 96,72\%$$

Forte dipendenza dalla prevalenza

## Probabilità di infezione e indicazioni per il test



# TEST per COVID 19

- Test sierologico rapido: ricerca IgG e/o IgM antiCOVID-19

