

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

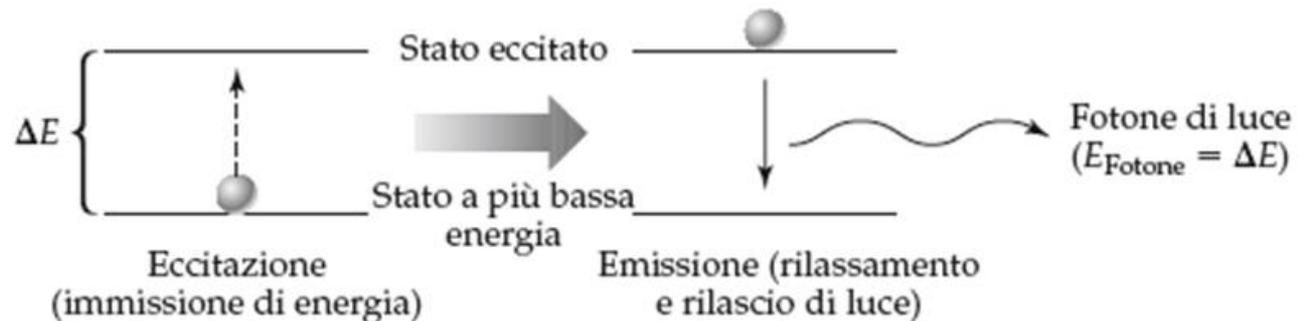


FIGURA 17.8 Fenomeni coinvolti nell'emissione di luce dalla materia. Il valore di ΔE rappresenta la differenza di energia tra lo stato eccitato e uno stato a più bassa energia. Il valore di E_{Fotone} rappresenta la quantità di energia trasportata da un fotone di luce emessa.

Assorbimento

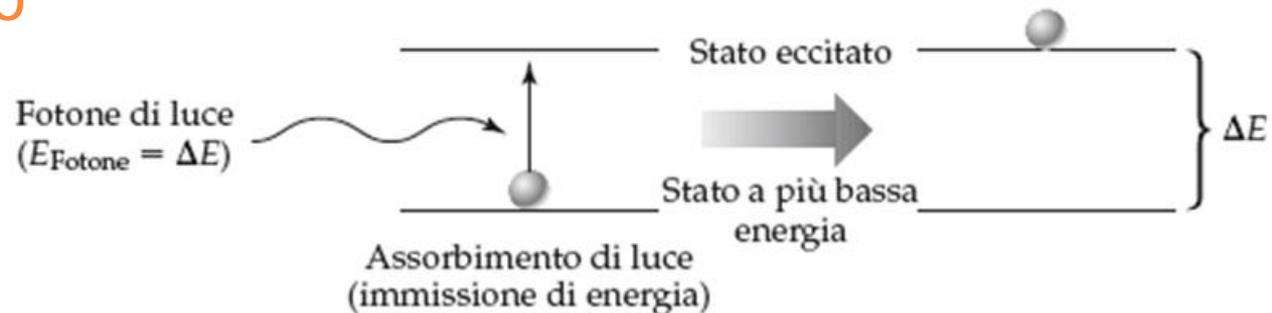
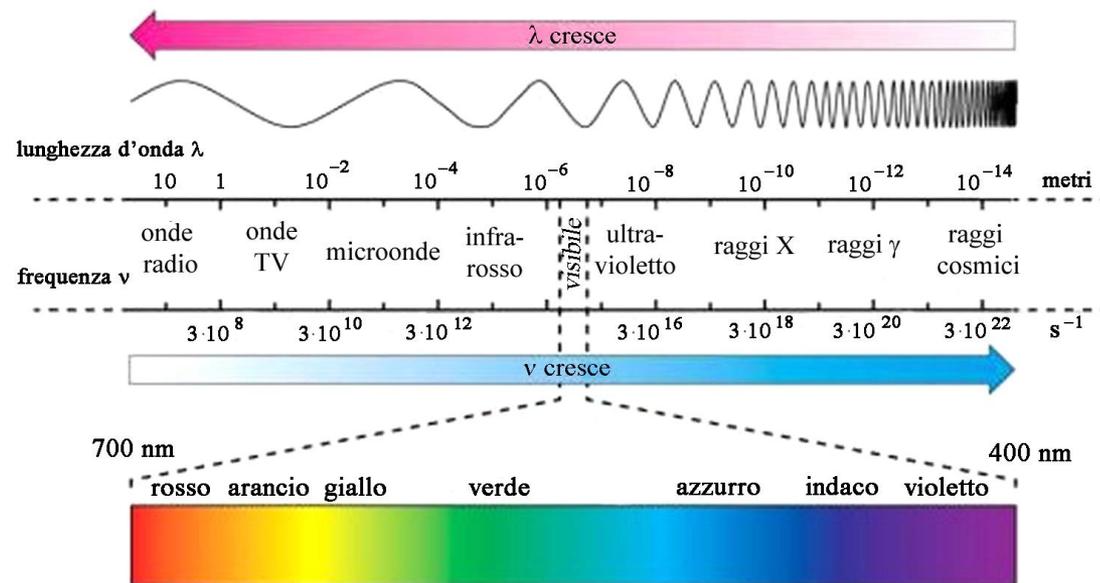


FIGURA 17.9 Fenomeni coinvolti nell'assorbimento di luce dalla materia. Il valore di ΔE rappresenta la differenza di energia tra lo stato eccitato e uno stato a più bassa energia. Il valore di E_{Fotone} rappresenta la quantità di energia trasportata da un fotone di luce assorbita.

Spettroscopia di assorbimento UV-VIS



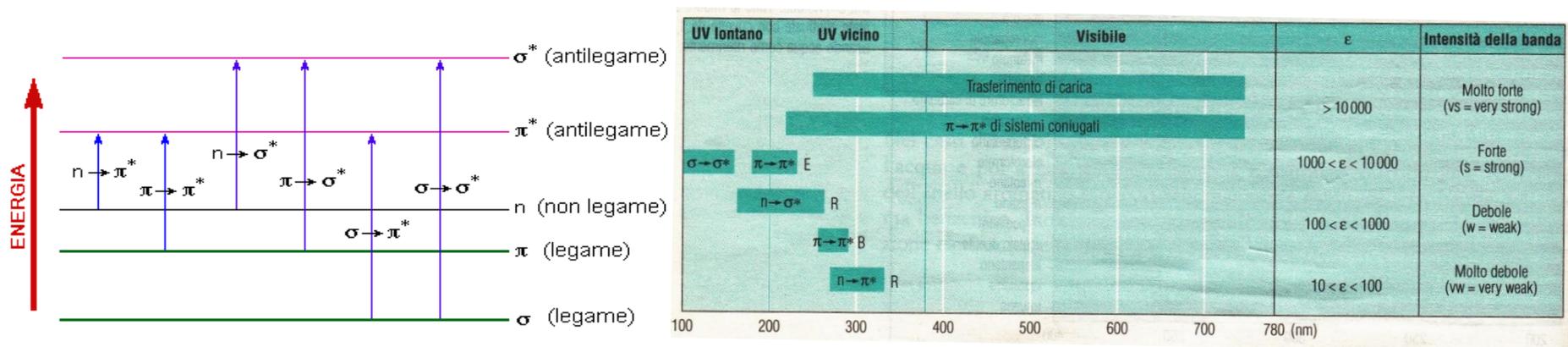
$$E = h\nu$$

λ 200-800 nm
 200-400 nm UV
 400-800 nm VIS

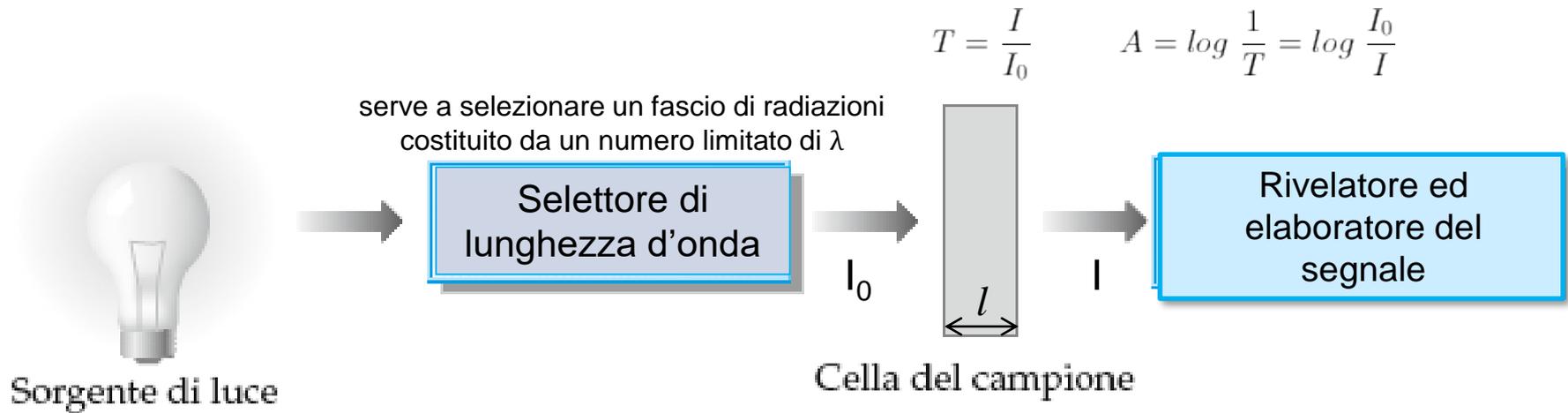
- Tali radiazioni permettono transizioni degli elettroni più esterni delle molecole dallo stato fondamentale a stati eccitati a più alta energia
- Nelle molecole organiche questi elettroni sono gli elettroni di legame, per cui:

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)

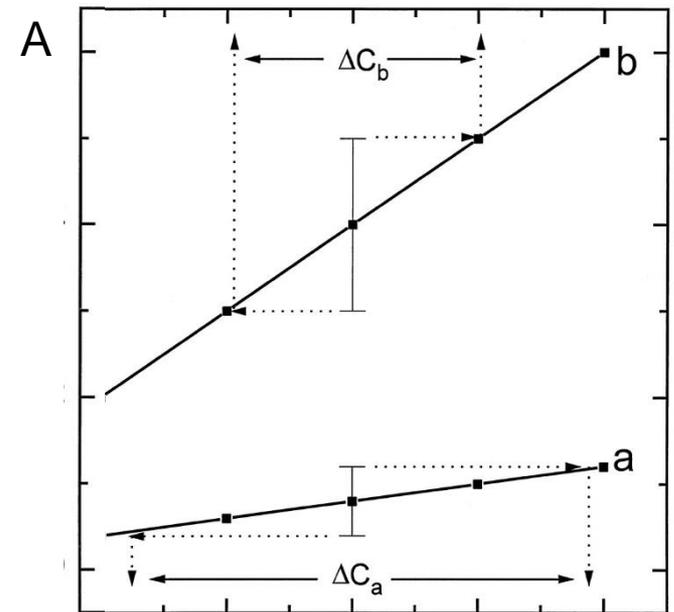
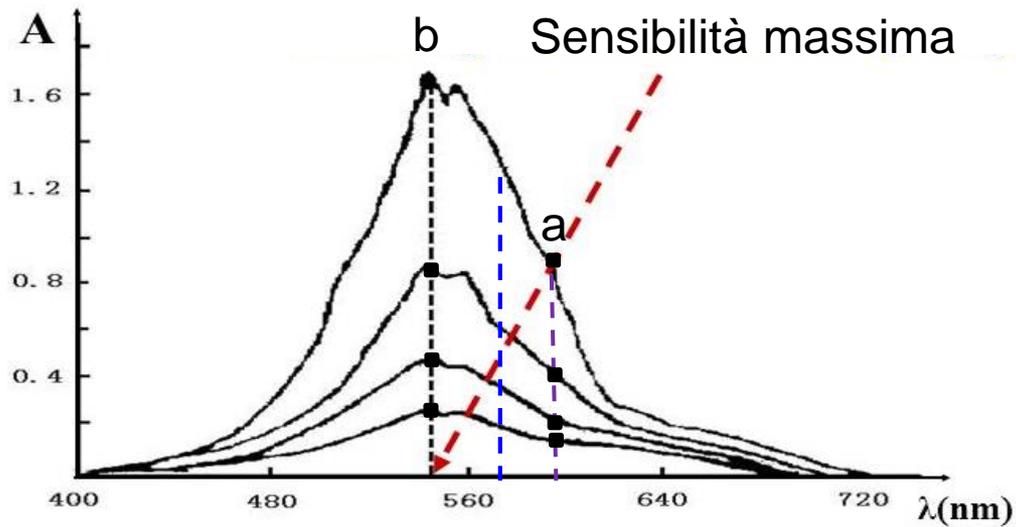
→ Ottimale
10⁻³-10⁻⁶M

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 λ del massimo di assorbimento



C

Si assume che la luce utilizzata sia monocromatica

Misura di A alla λ del massimo di assorbimento

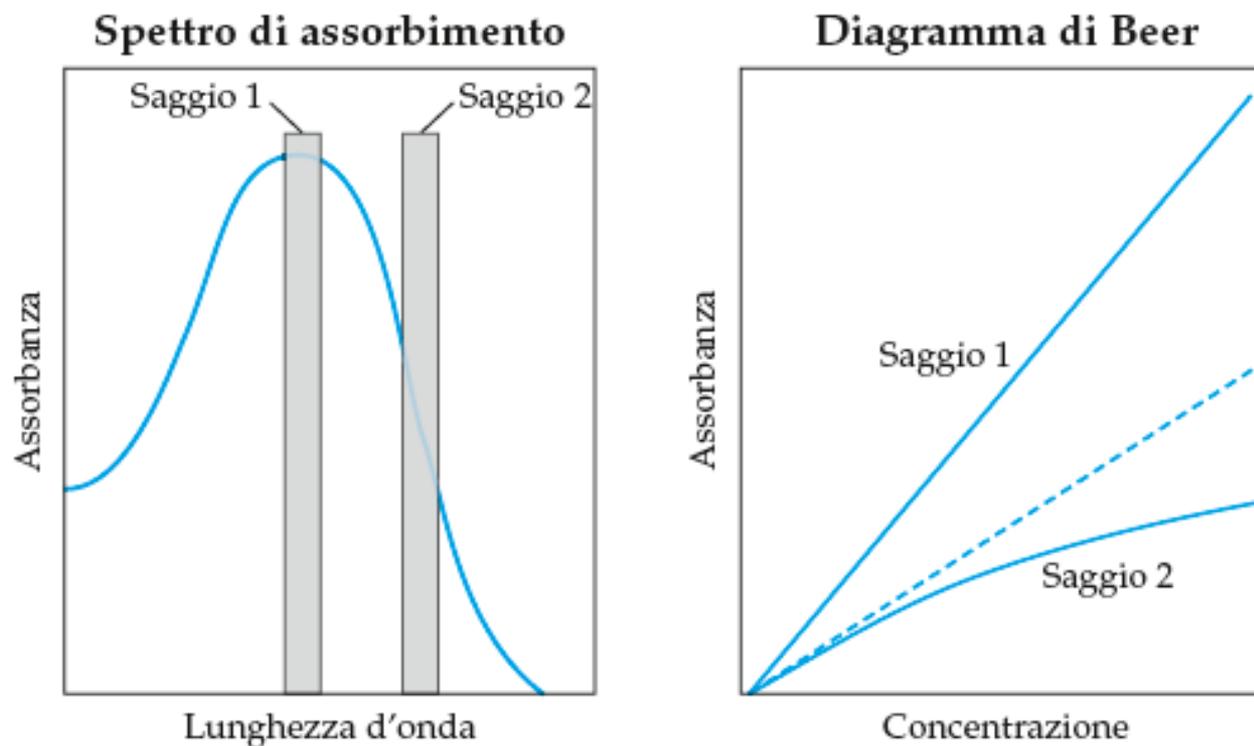


FIGURA 17.20 Effetti della luce policromatica sui grafici ottenuti secondo la legge di Beer.

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



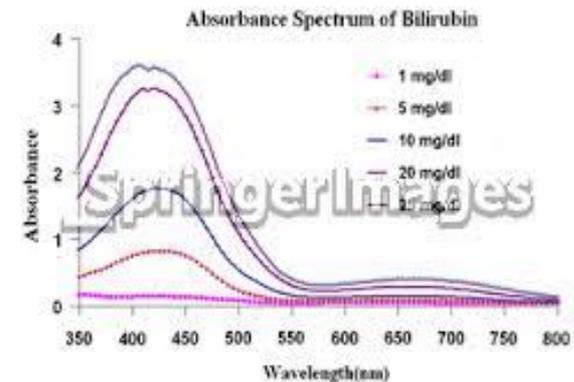
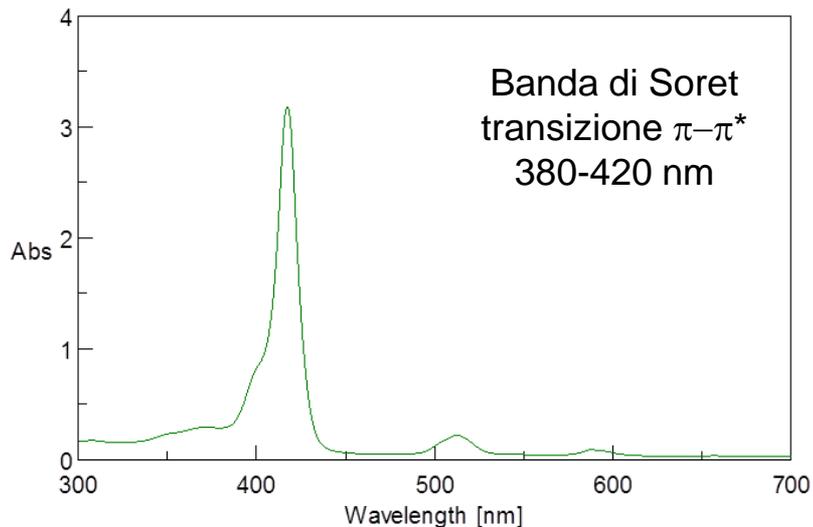
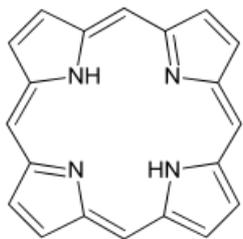
Soluzione omogenea

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)



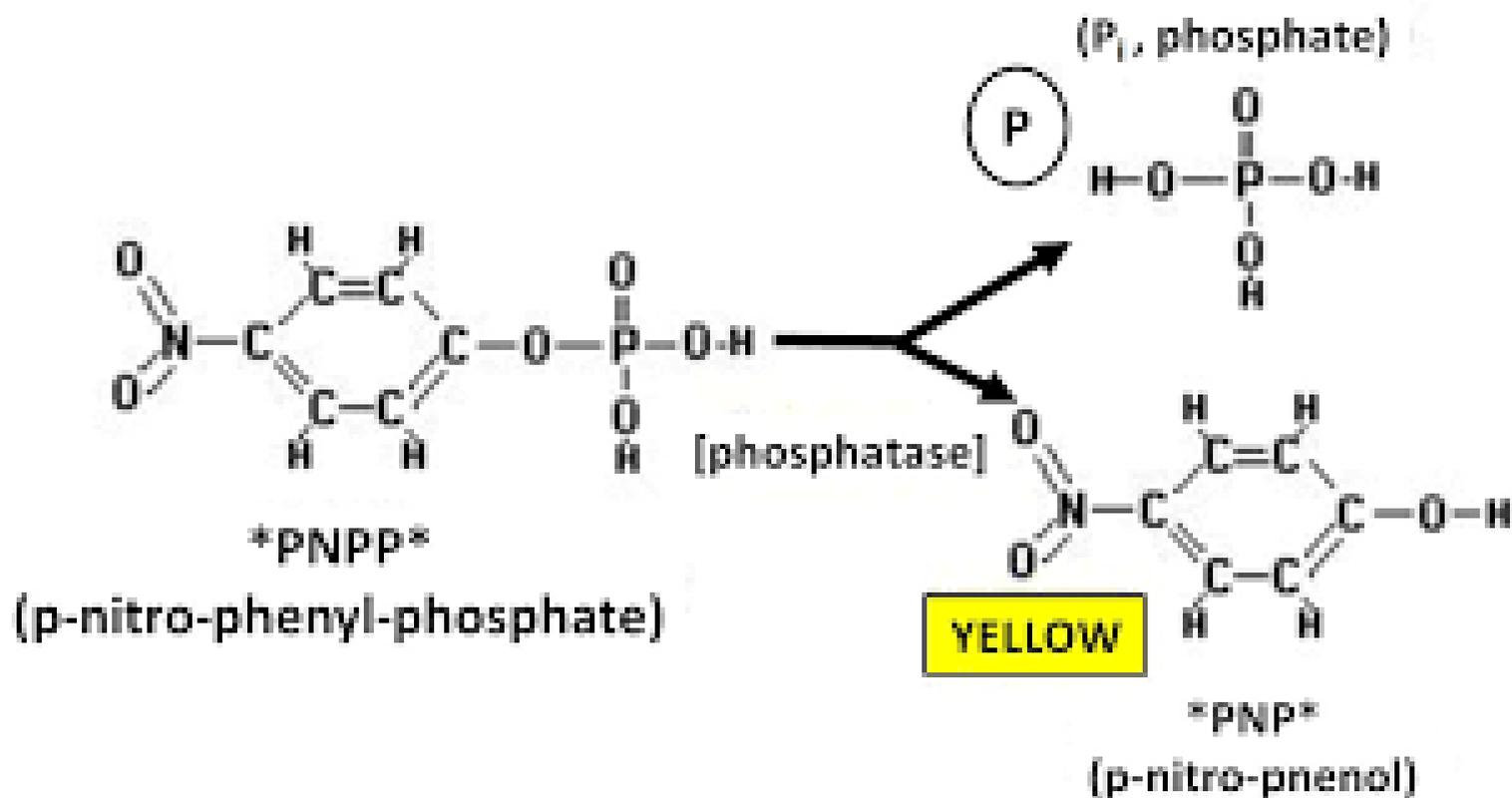
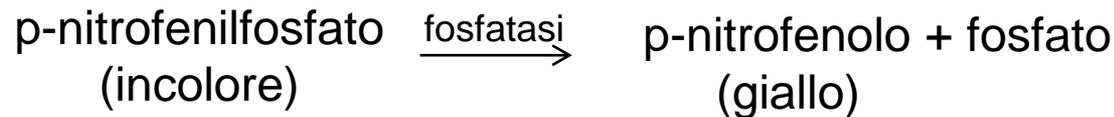
Procedura di analisi quantitativa

- **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:

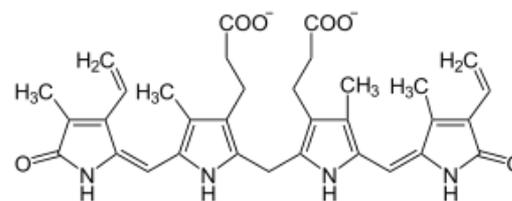
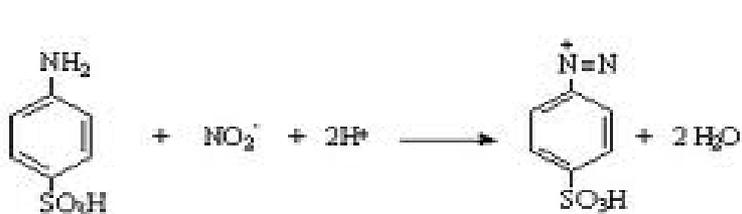
- Formazione di eterocicli condensati colorati
- Idrolisi con formazione di colore
- Ox-Red
- Reazioni di gruppo
- Reazioni di copulazione
- Reazioni di complessazione
- Reazioni di degradazione e rimaneggiamento molecolare
- Reazioni di spostamento

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



H^+

AZOBILIRUBINA
(ROSSA) 540 nm

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 ε : $C = A/\varepsilon b$
- 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

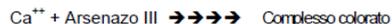
Determinazione quantitativa del calcio

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.

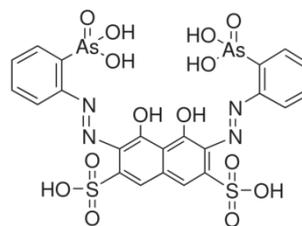
CAMPIONI

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 γ GT ecc. | Test ottico semplice per deidrogenasi; test ottico accoppiato per AST; ALT-CPK ecc., impiego di substrati sintetici per fosfatasi, colinesterasi, leucinamino peptidasi γ GT ecc. |
| 5) <i>Emoglobina e metaboliti</i> Emoglobina Carbossiemoglobina Bilirubina Porfobilinogeno Acido δ -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- <u>NADH</u>); acido cromotropico Ioni Cu^{++} - dietilditiocarbammato Idrossilamina - 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) H_2SO_4 80% Reazione Kober (p-idrochinone- H_2SO_4) Reazione cerico-arseniosa (catalizzata dagli ioni I^-) Reazione α -nitroso- β -naftolo + 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 ⁺⁺⁺ |
| 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

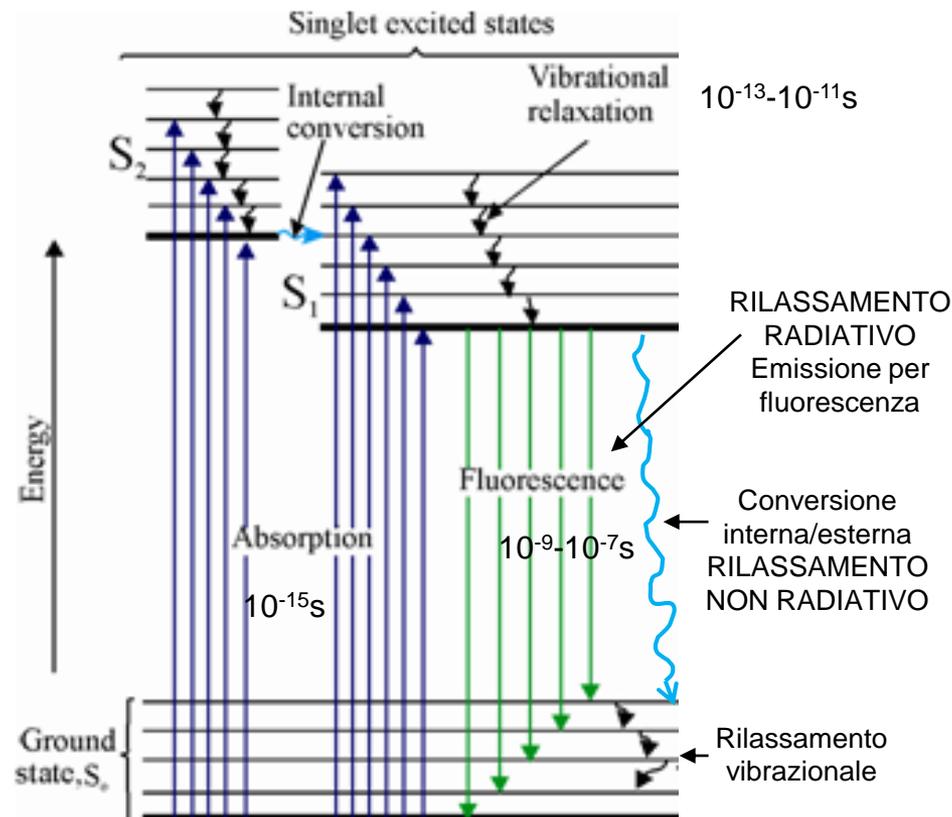
Luminescenza

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 λ : **legge di Stokes**
- La differenza di λ è detta **Stokes shift**
- **Resa quantica di fluorescenza** è la frazione di molecole eccitate che emettono radiazioni (quindi va da 0 a 1), ϕ

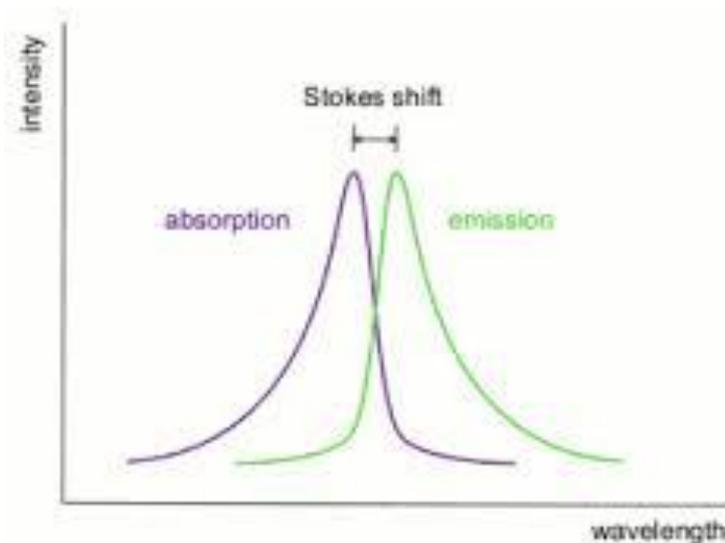
- $\lambda_{\text{ex}} < 250 \text{ nm}$ non danno fluorescenza
- Si osserva fluorescenza per transizioni

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

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

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

- Intensità di fluorescenza direttamente proporzionale a concentrazione dell'analita e ϕ



Spettrofluorimetro

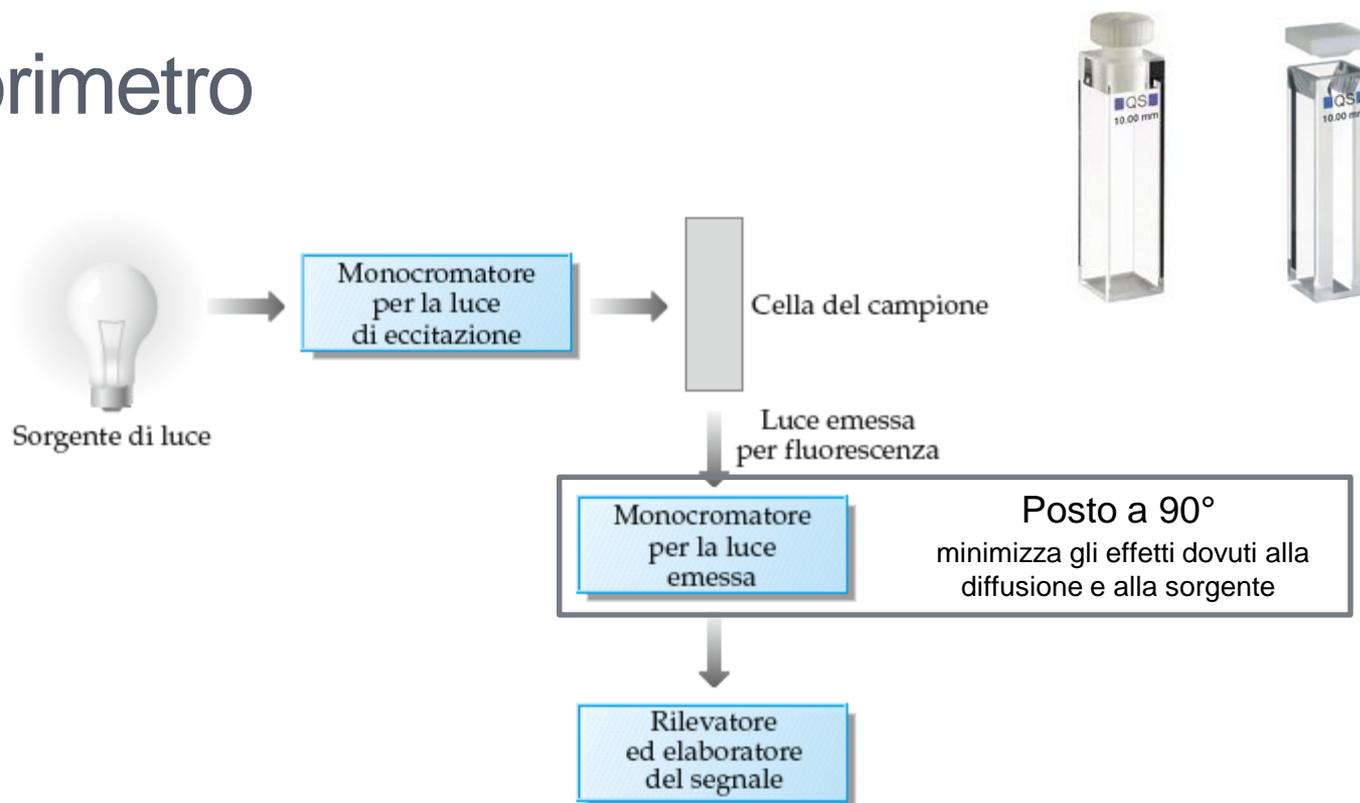
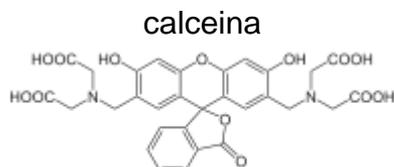


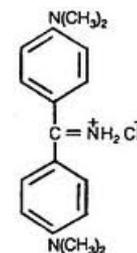
FIGURA 18.21 Schema generale di uno spettrofluorimetro. In questo strumento sono presenti due monocromatori. Il primo seleziona la lunghezza d'onda della luce proveniente dalla sorgente utilizzata per l'eccitazione del campione. Il secondo seleziona le lunghezze d'onda della luce emessa dal campione 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

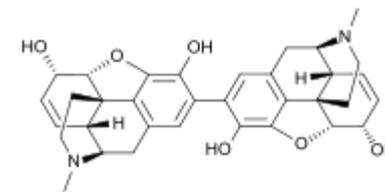
| Sostanza | Reazione per la fluorescenza | Sostanza | Reazione per la fluorescenza |
|---|---|-------------------------|---|
| <i>Aminoacidi</i> | | <i>Porfirine</i> | |
| Fenil-alanina | Ninidrina + leucilalanina | Uroporfirina | Fluorescenza naturale |
| Tirosina | 1) fluorescenza naturale 2) 1 - 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 ₂ SO ₄ | <i>Farmaci e droghe</i> | |
| Estrogeni | Reazione di Kober in H ₂ SO ₄ | Barbiturici | Fluorescenza naturale |
| Catecolamine | Ossidazione - adrenocromo | Salicilati | Fluorescenza naturale |
| <i>Lipidi</i> | | Chinidina | Fluorescenza naturale |
| Trigliceridi | Glicerina - formolo + acetilacetone + NH ₄ - 3,5 diacetil - 1,4 diidrolutidina | LSD | Fluorescenza naturale |
| Colesterolo | Riarrangiamento chimico in H ₂ SO ₄ | 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 | | Urea | Diacetilmonossina |
| Colinesterasi - glicosidasi | Substrati sintetici | Acido urico | Uricasi-perossidasi + acido omovanillico |
| Carbossipeptidasi ecc. | | Bilirubina | H ₃ PO ₄ 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:

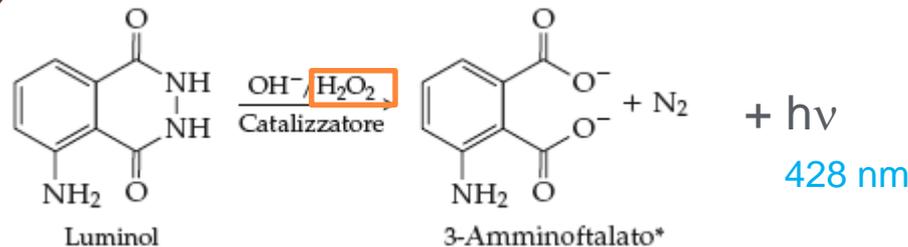
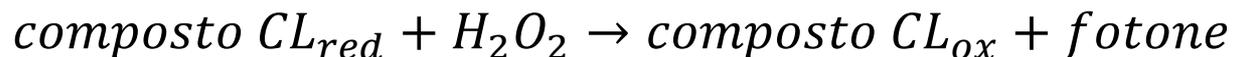
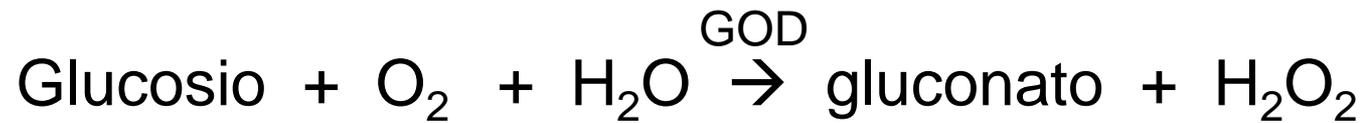


FIGURA 18.20 Reazioni di chemiluminescenza del luminol. Il luminol inizialmente reagisce con l'agente ossidante H_2O_2 in presenza di un catalizzatore e in condizioni basiche. Questa prima reazione porta alla formazione di una molecola di 3-amminoftalato ad uno stato eccitato. Una parte di questo prodotto eccitato cede poi l'energia assorbita in forma di luce.

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

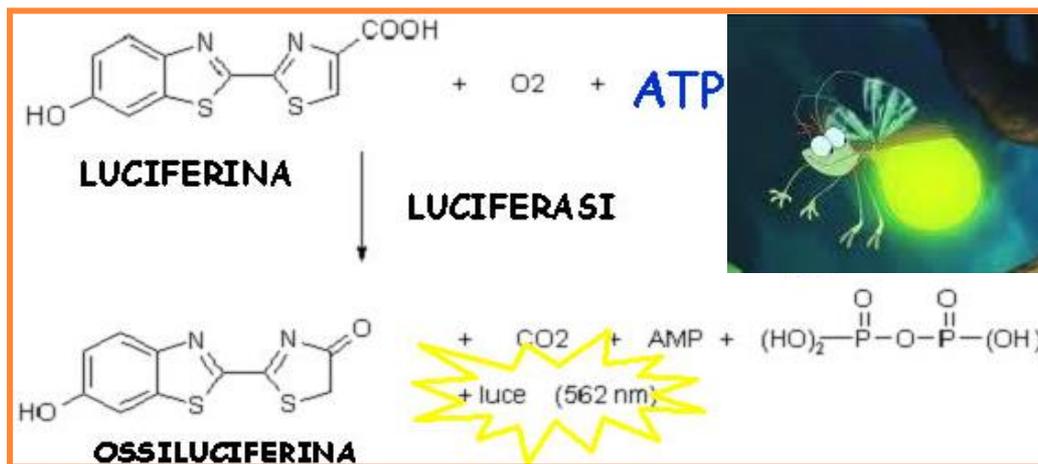
- Determinazione quantitativa di differenti ossidasi
- Determinazione di substrati (Glu, Ipoxantina, Acido urico, Colesterolo, ecc.)





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)

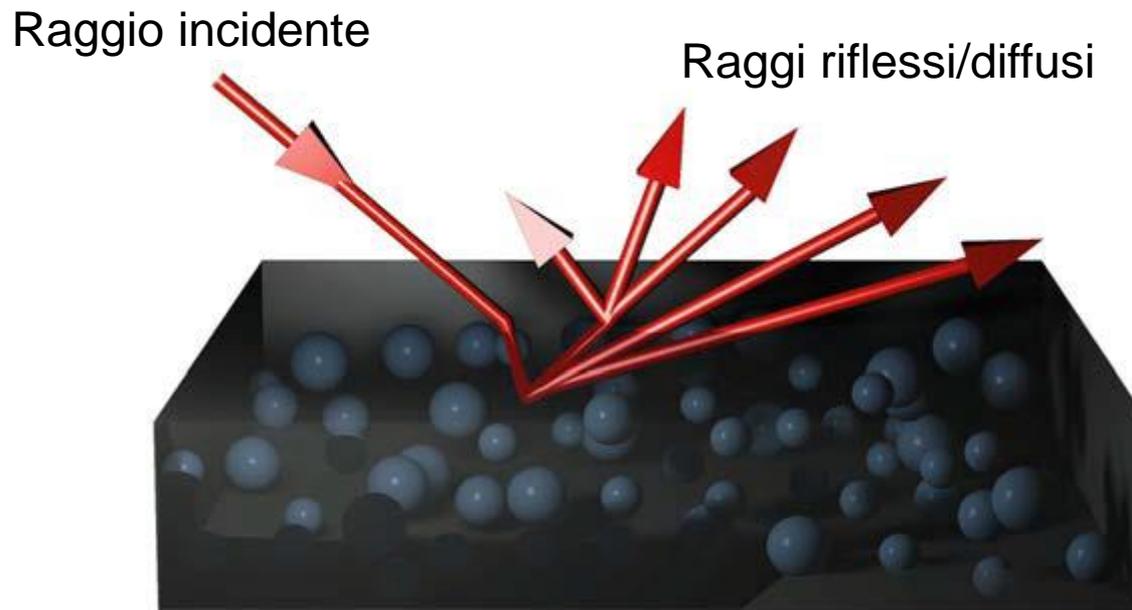
Sensibilità $10^{-14}M$, linearità in 2-3 ordini di concentrazione

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



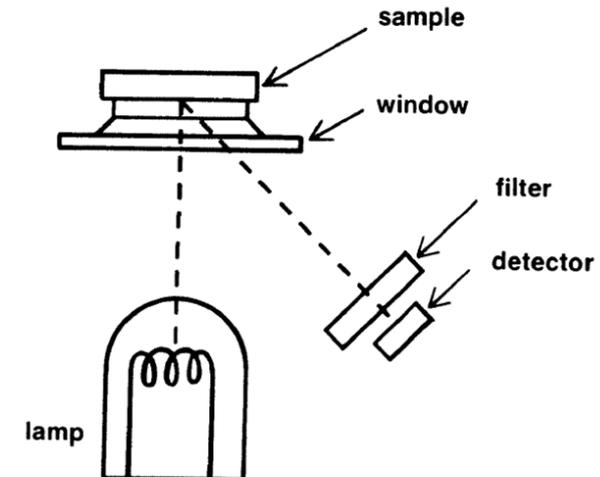
ANALITA
nel fluido biologico

Intensità della colorazione in funzione
della concentrazione dell'analita

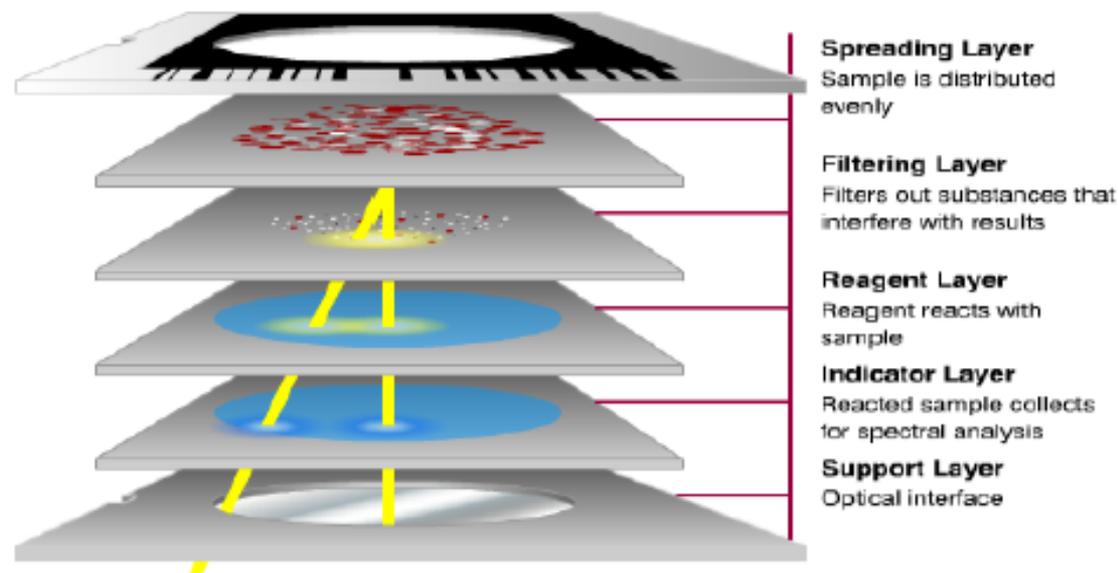


Misura della luce
riflessa

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)

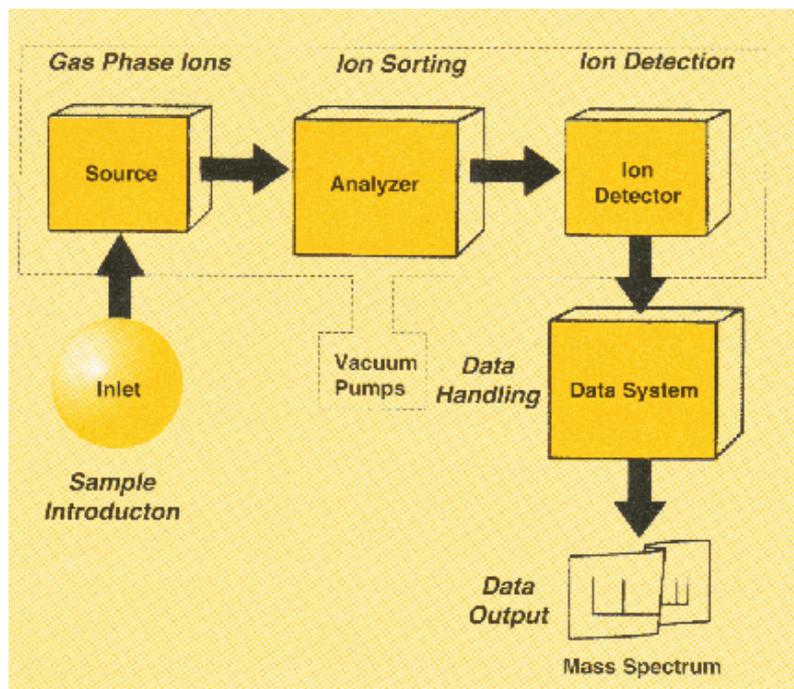


Tecniche analitiche

- 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)

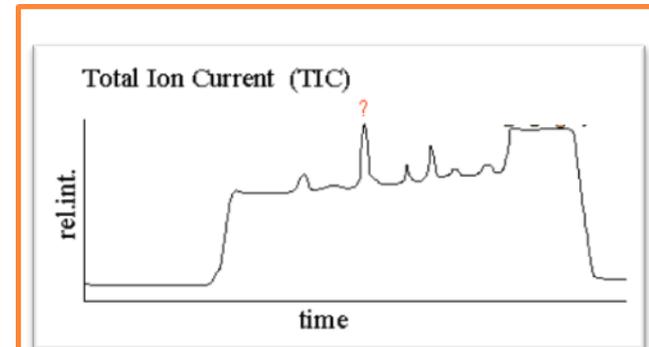
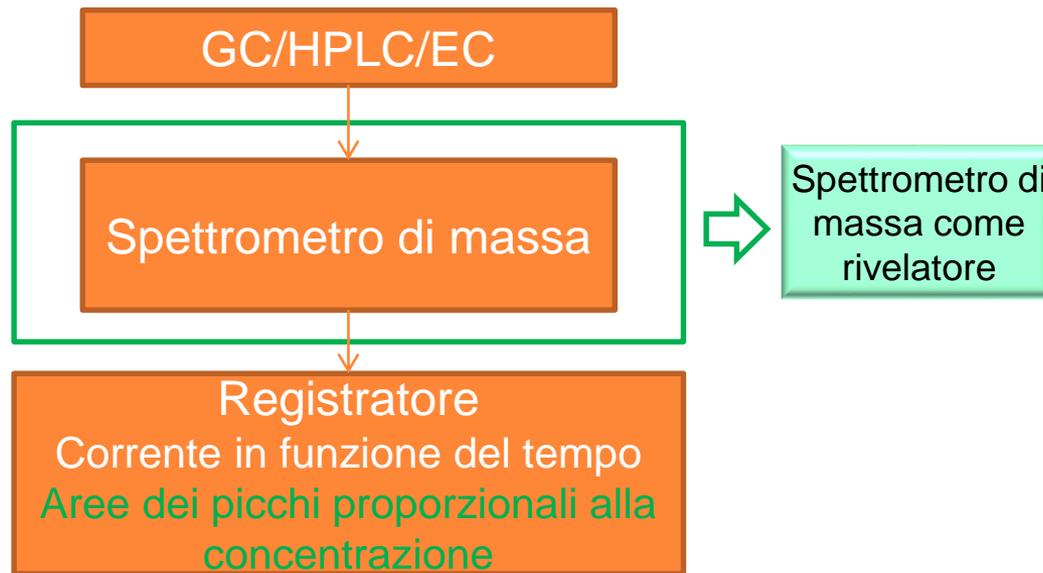


Le molecole di analita vengono inserite nella sorgente di ionizzazione dove vengono ionizzate acquistando una carica positiva o negativa.

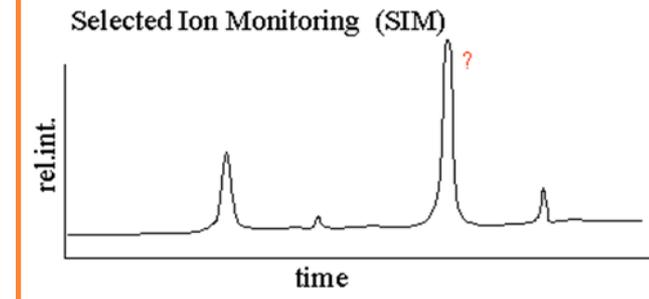
Gli ioni poi viaggiano all'interno dell'analizzatore dove vengono separati secondo il loro rapporto m/z e poi a contatto con il rivelatore si genera un segnale che va a formare uno spettro di massa.

Analisi quantitativa in spettrometria di massa

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

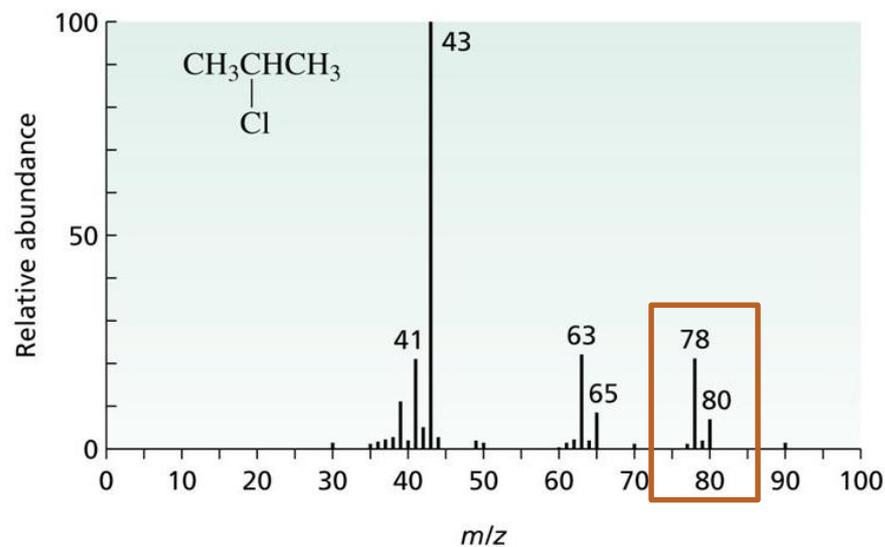
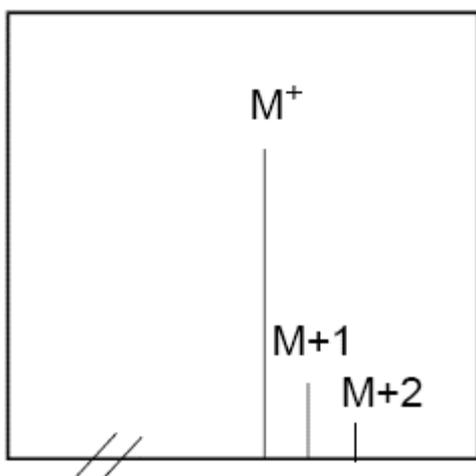


Massa come rivelatore in cromatografia



Picchi isotopici, dipendono da:

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

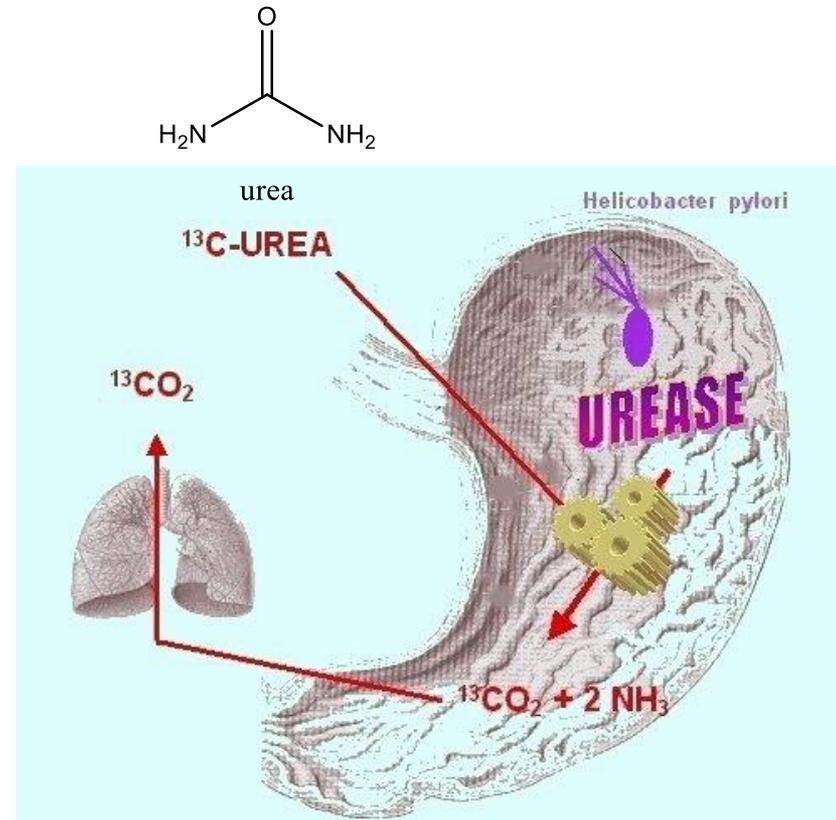


Abbondanza isotopica Cl

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

^{13}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}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}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

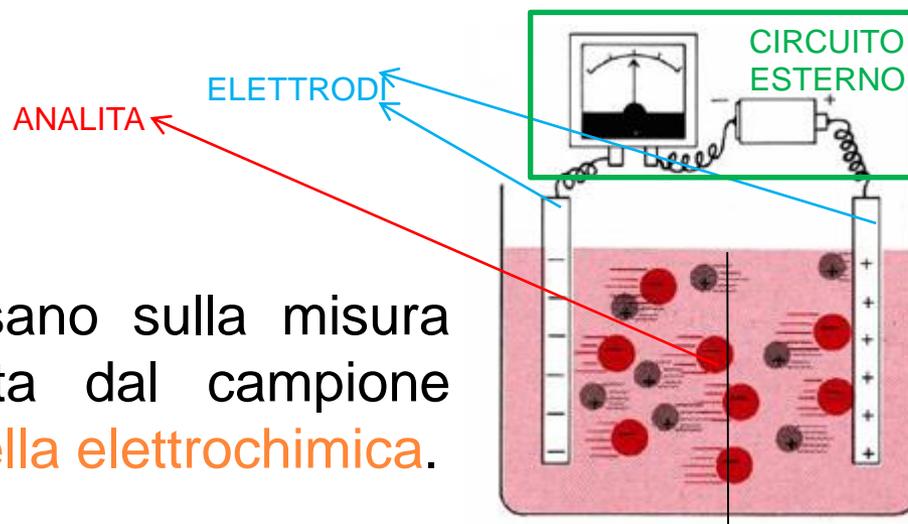


Tecniche analitiche

- 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⁺, siero
- K⁺, siero
- Ca²⁺, siero
- Cl⁻, fibrosi cistica
- ~~NO₃⁻, crescita microbica~~

Misura di gas in soluzione

- pCO₂
 - Ammoniaca
- } Si basa sempre sulla misurazione del pH

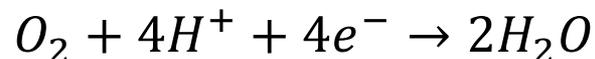
Sfruttano elettrodi a membrana

Applicazione del metodo amperometrico: Misura della pO_2 nel sangue

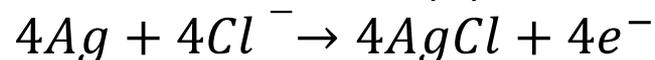
Sensore di Clark

- 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 (-)



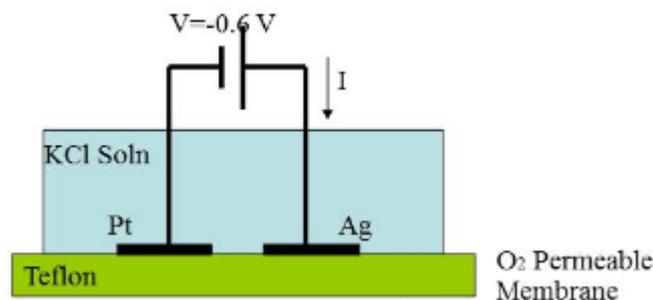
All'anodo (+)



Catodo: elettrodo sul quale avviene una semireazione di riduzione

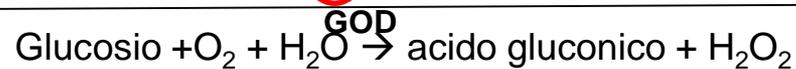
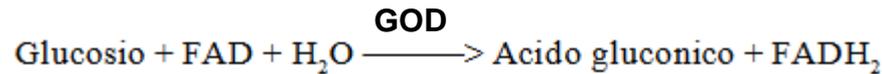
Anodo: elettrodo sul quale avviene una semireazione di ossidazione

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



Misura del glucosio nel sangue

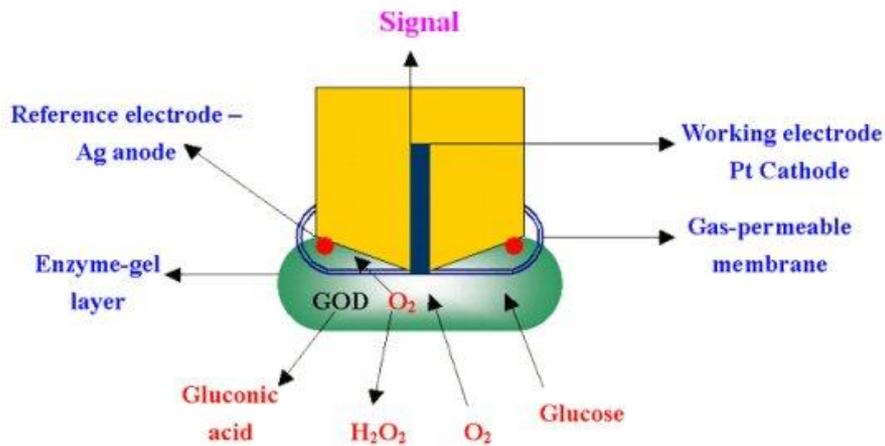
Elettrodi di prima generazione



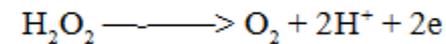
Misurare la $\downarrow \text{O}_2$



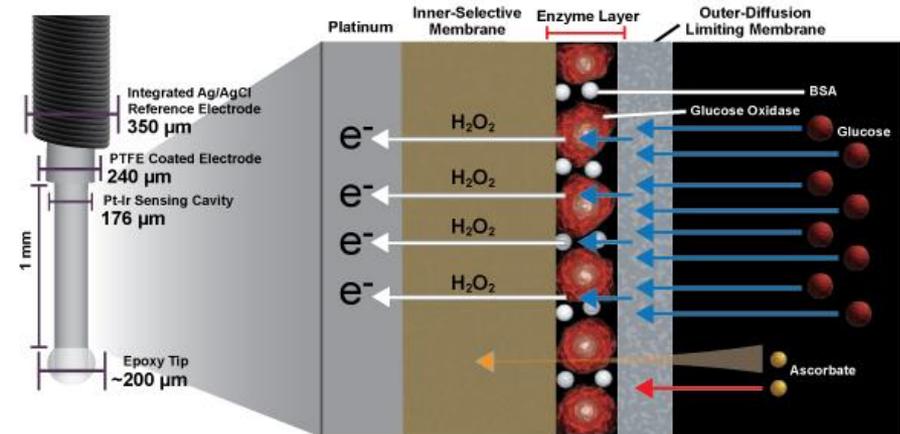
Sensore di Clark



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

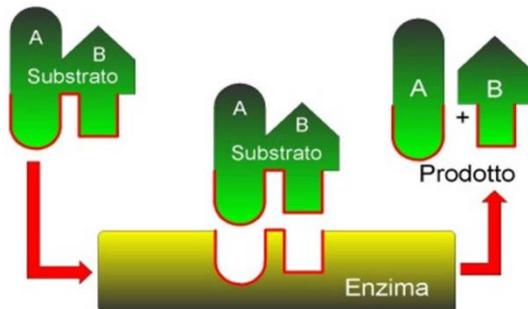
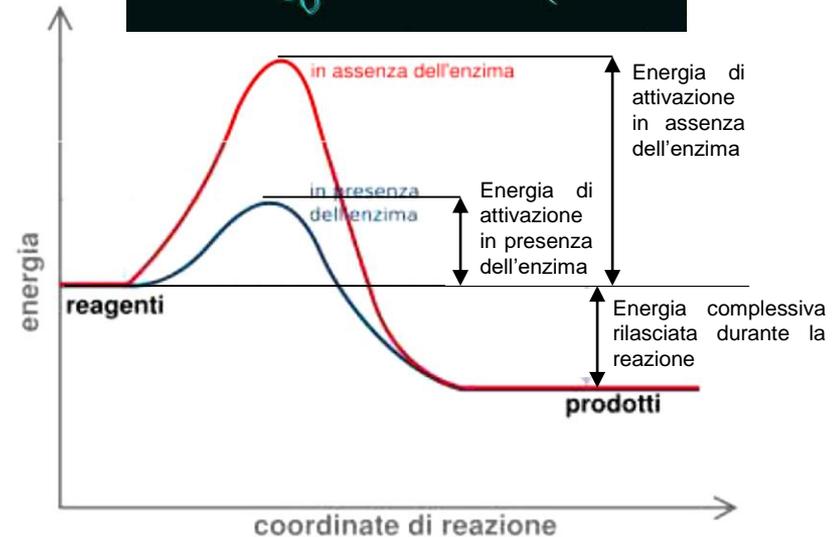
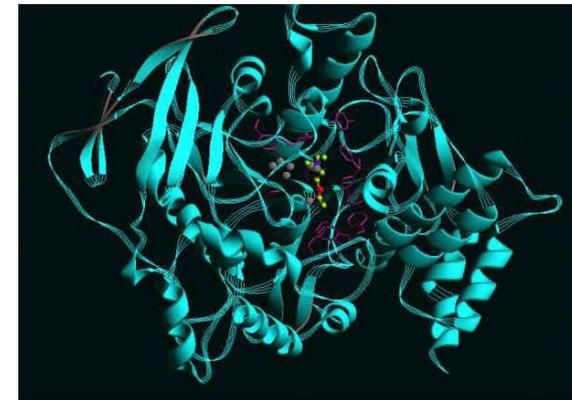
Proteine dotate di attività catalitica

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



Regolano le varie vie metaboliche.

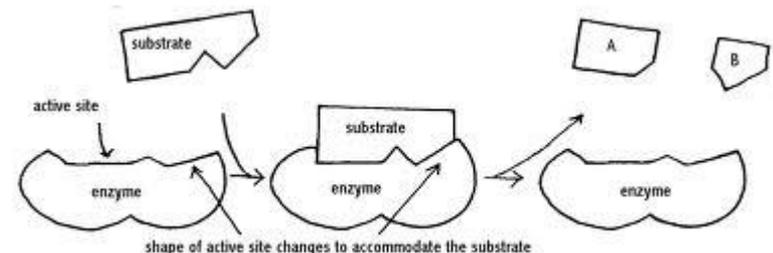
Essendo proteine subiscono un continuo turn-over (biosintesi, degradazione) e la loro sintesi è controllata a livello genico.



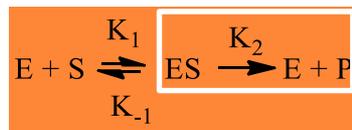
Alta specificità per il substrato

Modello chiave-serratura

Modello dell'adattamento indotto

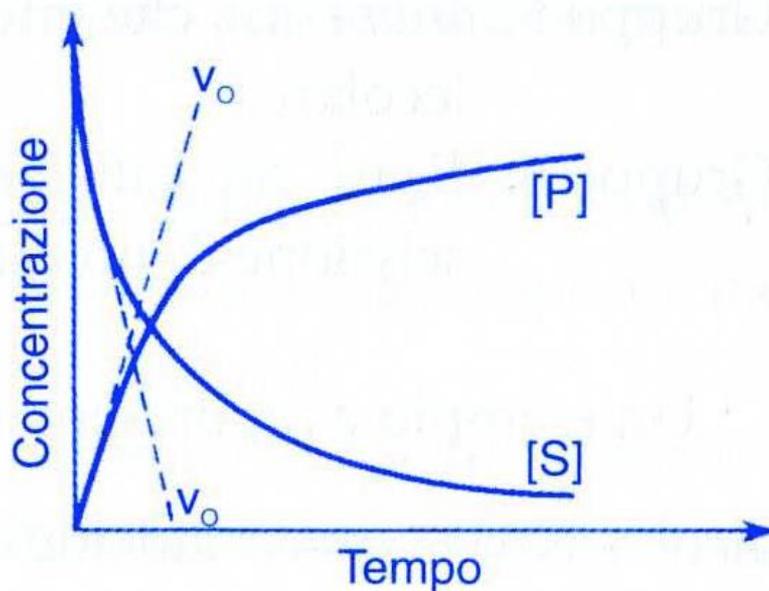


Cinetica enzimatica

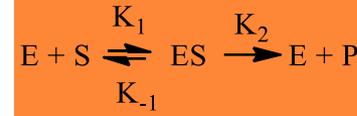


La quantità di enzima presente in un campione può essere valutato misurando la velocità di comparsa del prodotto o di consumo del substrato

EFFETTO DEL TEMPO SULLA VELOCITÀ DI REAZIONE ENZIMATICA

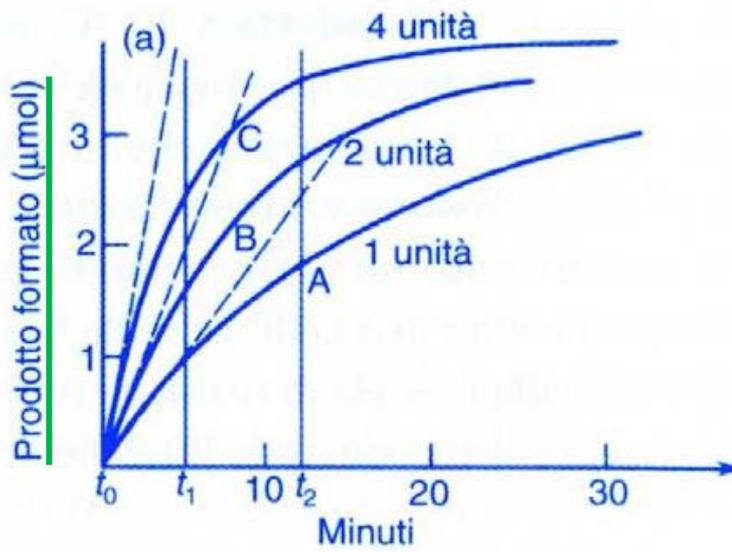


Cinetica enzimatica

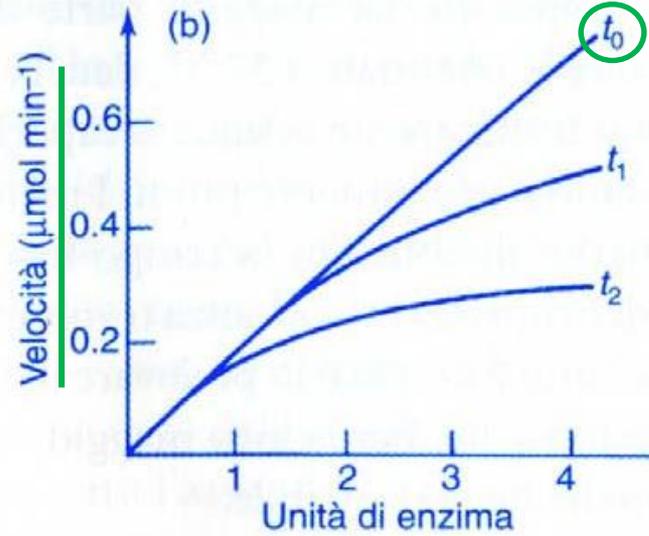


EFFETTO DEL TEMPO SULLA VELOCITÀ DI REAZIONE ENZIMATICA

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

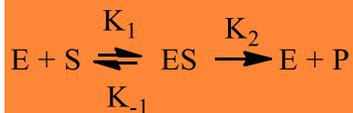


Variazione della velocità di reazione in funzione della concentrazione di enzima usando la velocità iniziale (calcolata a t_0) o la velocità determinata a t_1 e t_2

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



Dato quantitativo per gli enzimi



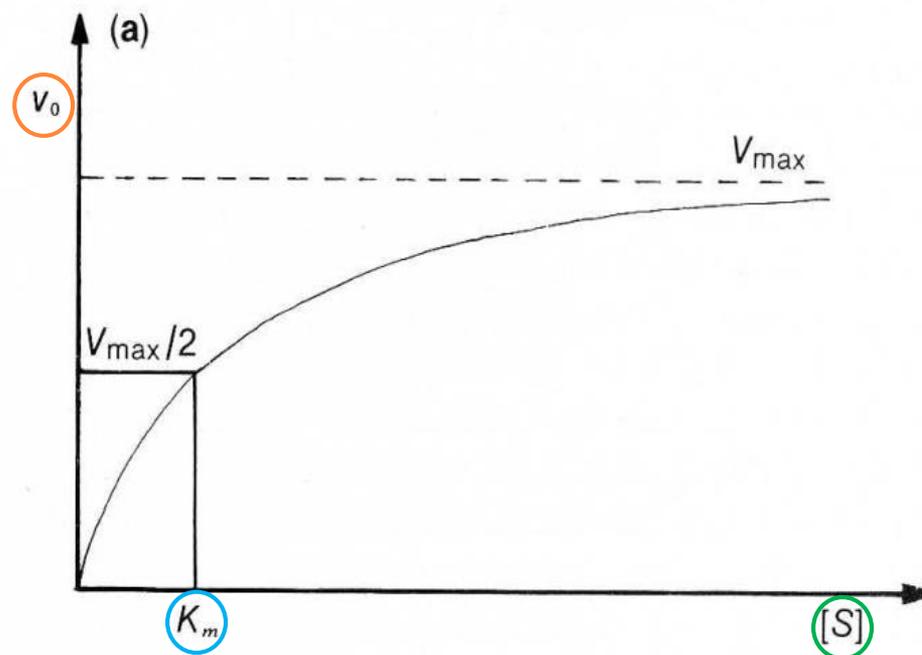
$$V_0 = \frac{K_2[E]_0[S]}{[S] + \frac{K_{-1} + K_2}{K_1}}$$

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

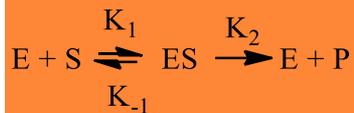
EQUAZIONE DI
MICHAELIS MENTEN

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.

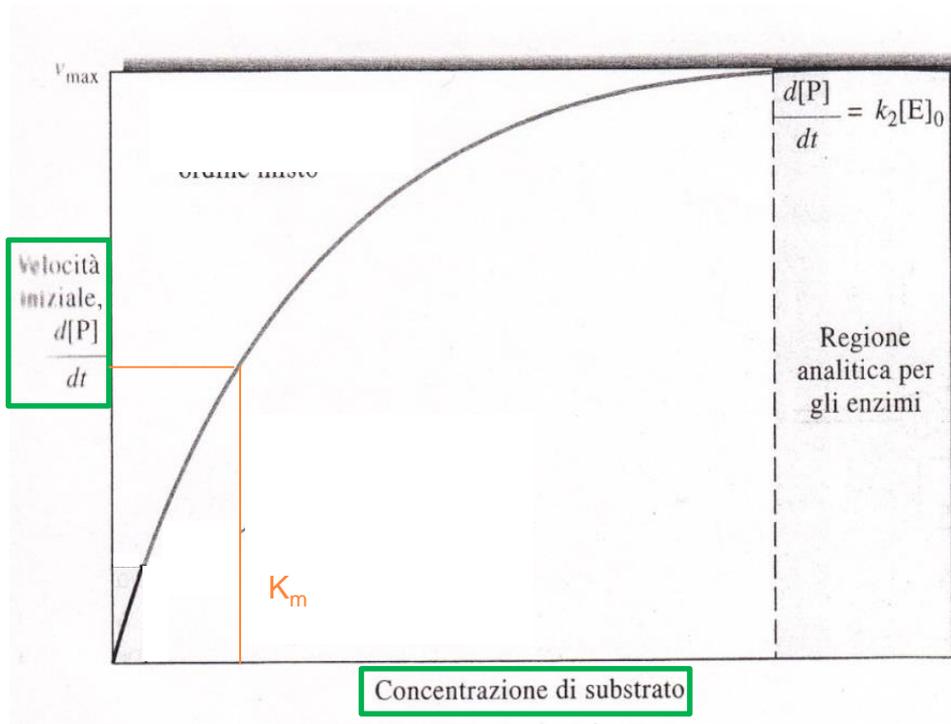


La concentrazione per cui la velocità di reazione iniziale è metà di quella massima coincide numericamente con la K_m .



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

EQUAZIONE DI MICHAELIS MENTEN



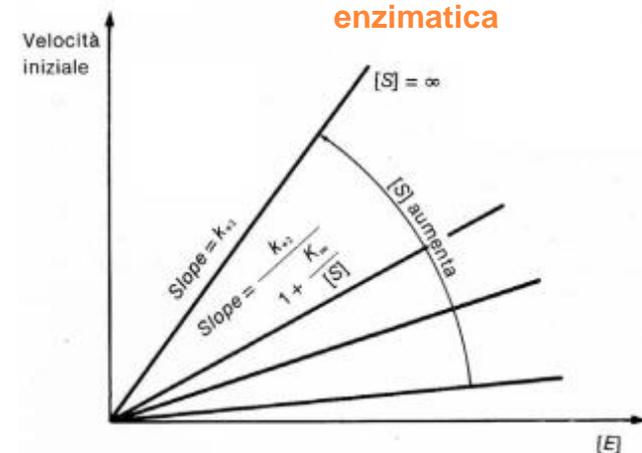
Se $[S] \gg K_m$

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

$V_0 = K_2[E]_0$ ed è **v_{max}**

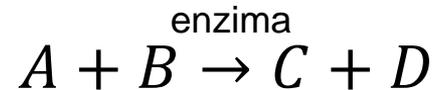


Misura dell'attività enzimatica



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

Determinazione dell'attività enzimatica

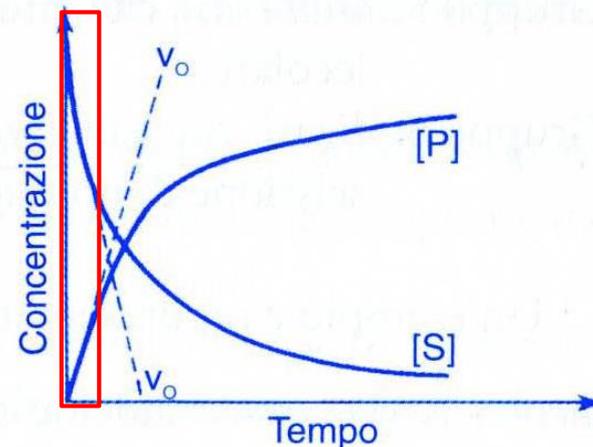
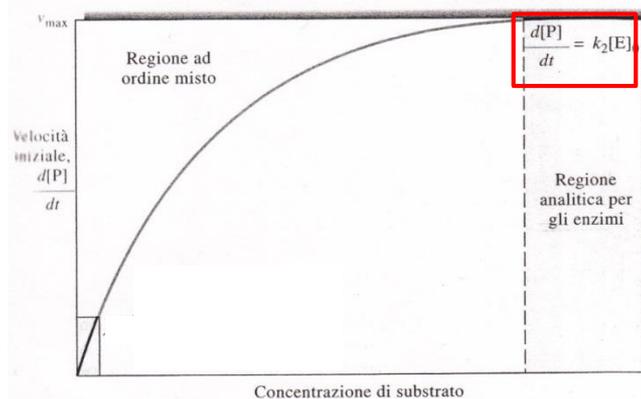


Ci si deve assicurare di essere in condizioni saturanti di substrato.

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.

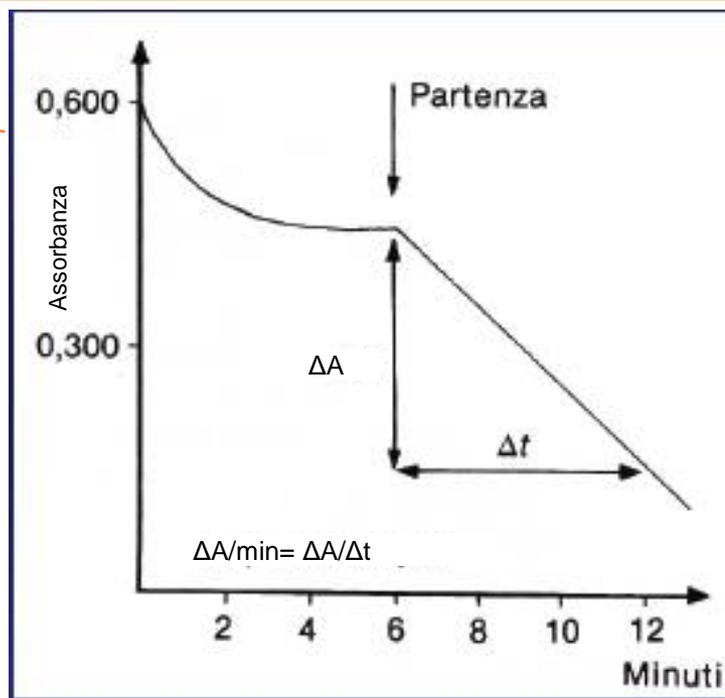


Metodo spettrofotometrico (S o P assorbono nell'UV-VIS)

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

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

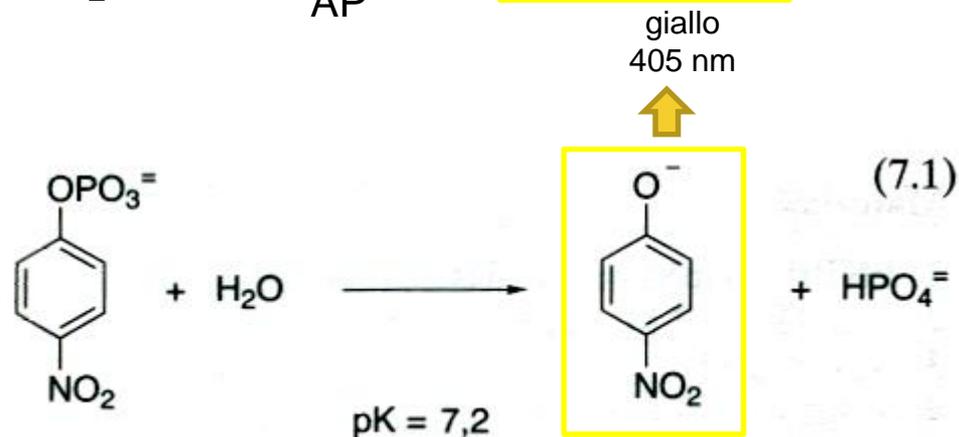
Tenendo conto del volume di campione (v), del volume totale di reazione (V):

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

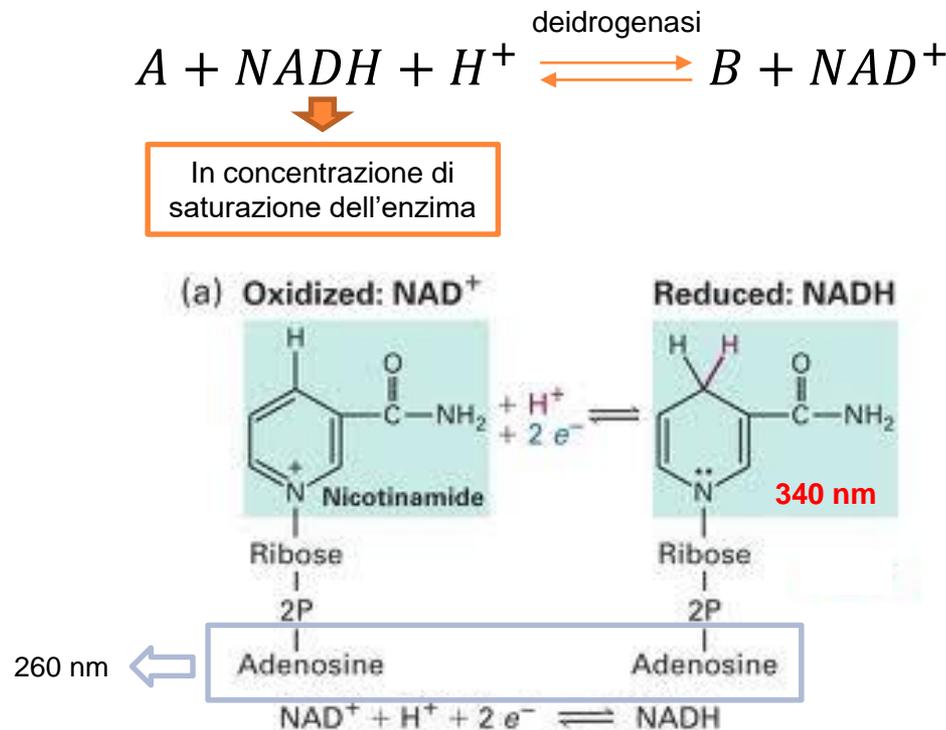


- γ -glutamil- p -nitroanilide + glicina $\xrightarrow{\text{GGT}}$ **p -nitroanilina** + γ -glutamilglicina
- giallo
405 nm

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

Test ottico semplice (test di Warburg)

Metodo fotometrico per la determinazione degli enzimi trasportatori di idrogeno (deidrogenasi) $NAD^+/NADH$ e $NADP^+/NADPH$ dipendenti



Si può misurare l'attività enzimatica determinando la diminuzione o l'aumento della concentrazione di $NADH$ invece che di A o B .

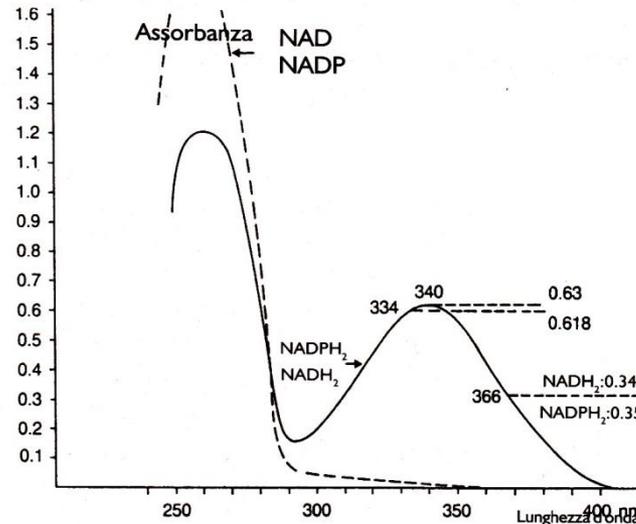
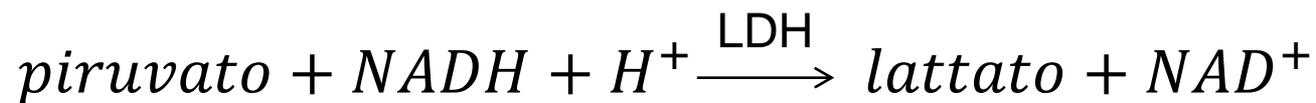


Figura 6.2 – Spettro di assorbimento di soluzioni 0,1 nmol/l rispettivamente di NAD, NADP (linea tratteggiata) e NADH₂, NADPH₂ (linea continua). Nota: sono riportati i valori di assorbimento dei coenzimi ridotti a 340 nm (massimo di assorbimento nel vicino u.v.) e a 334 e 366 nm: queste ultime due lunghezze 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.



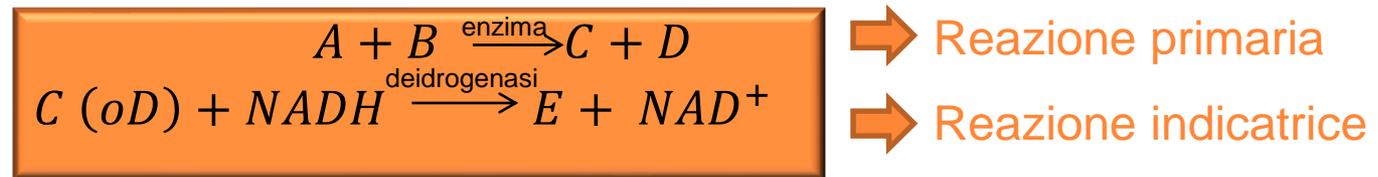
si misura il decremento di NADH

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⁺ $\xrightarrow{\text{LDH}}$ *lattato + NAD⁺*

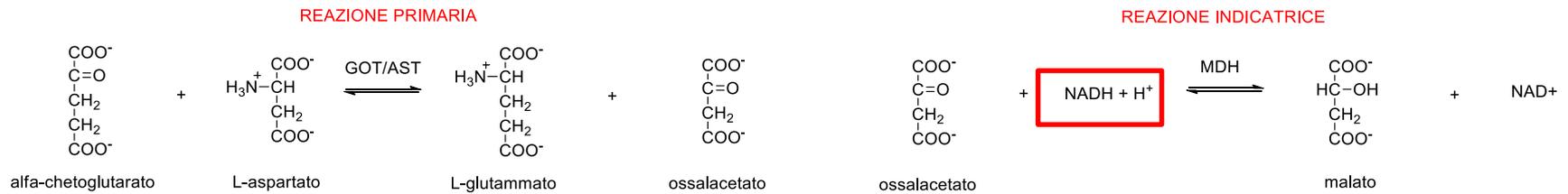
AST (o GOT), aspartato aminotrasferasi: è un enzima legato ai mitocondri. Presente nel fegato, miocardio, muscolatura scheletrica, tessuto renale e cerebrale.

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

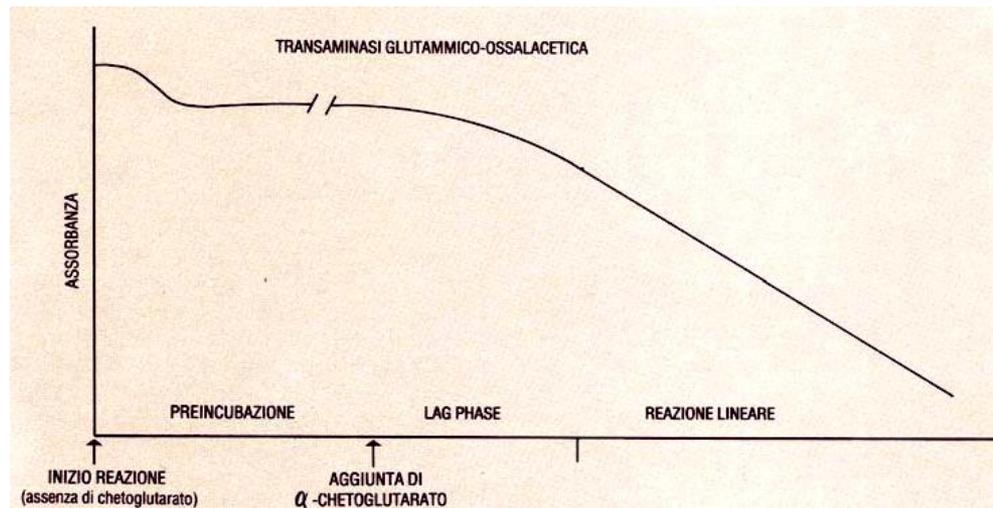
Sono intracellulari e le membrane cellulari sono impermeabili ad essi. Il rapporto tra il comparto extra ed intracellulare è 1:10000 per ALT e 1:100000 per AST.

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

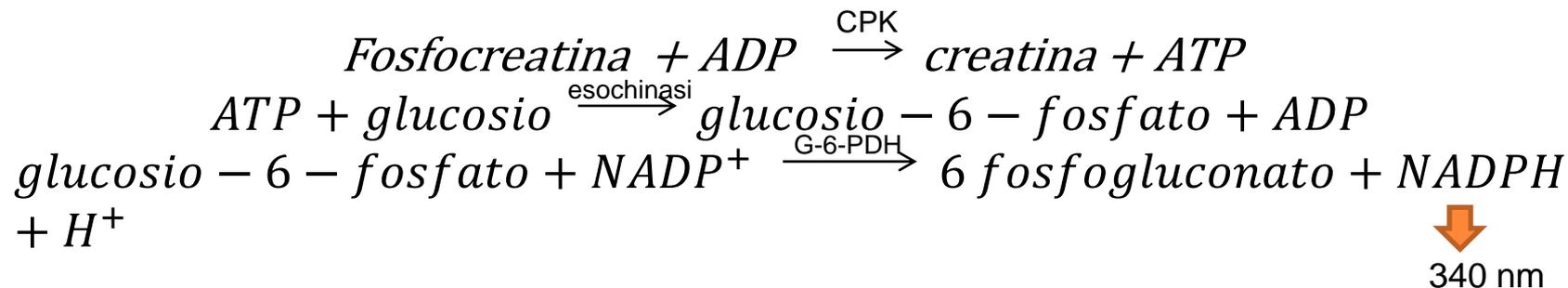
Per poter misurare la velocità della reazione primaria il prodotto deve essere rapidamente consumato dalla reazione indicatrice, essa non deve costituire il fattore limitante (enzima indicatore con attività 100 volte superiore all'enzima da misurare, e substrati (coenzimi piridinici) in concentrazioni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



decremento di A a 340 nm



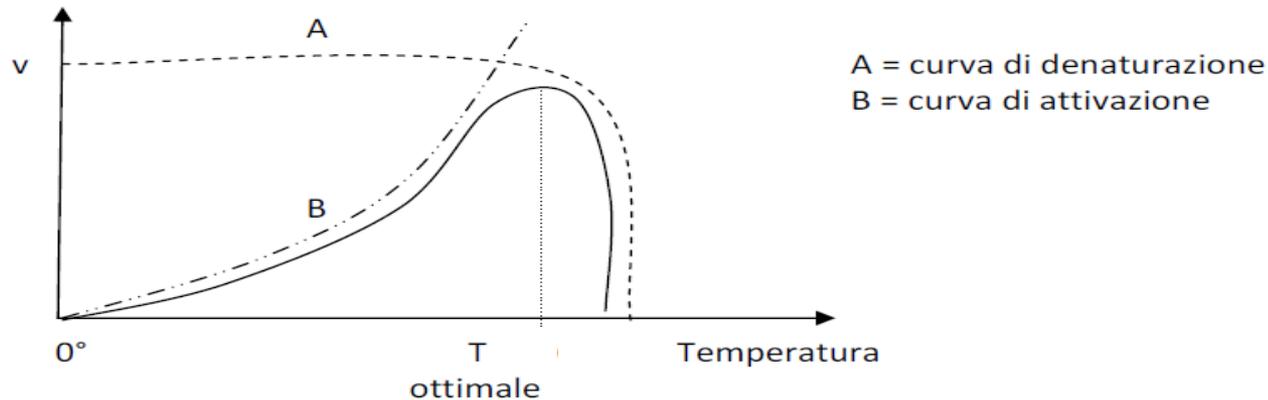
- In qualche caso sono necessarie ben tre reazioni enzimatiche accoppiate:
 - Reazione primaria
 - Reazione ausiliaria
 - Reazione indicatrice che utilizzi uno dei prodotti della reazione ausiliaria
- Un esempio è la determinazione dell'attività della creatinfosfochinasi (CPK):



CPK, creatinfosfochinasi: diagnosi di infarto del miocardio.

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

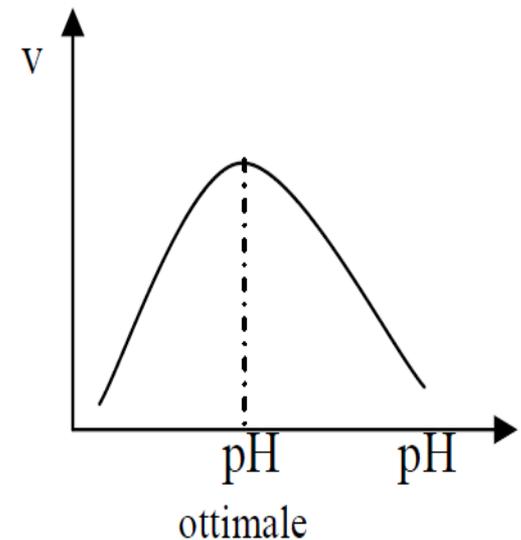
Effetto della T sulla velocità di reazione



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

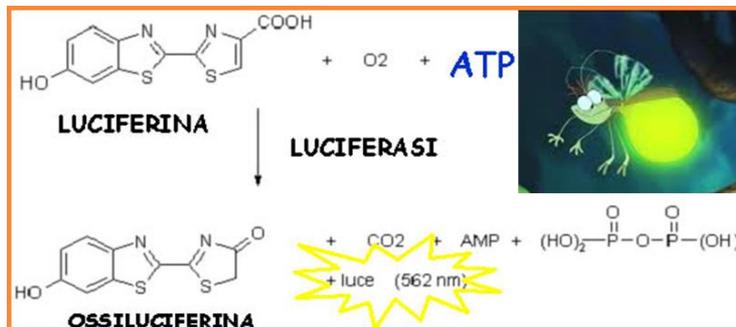
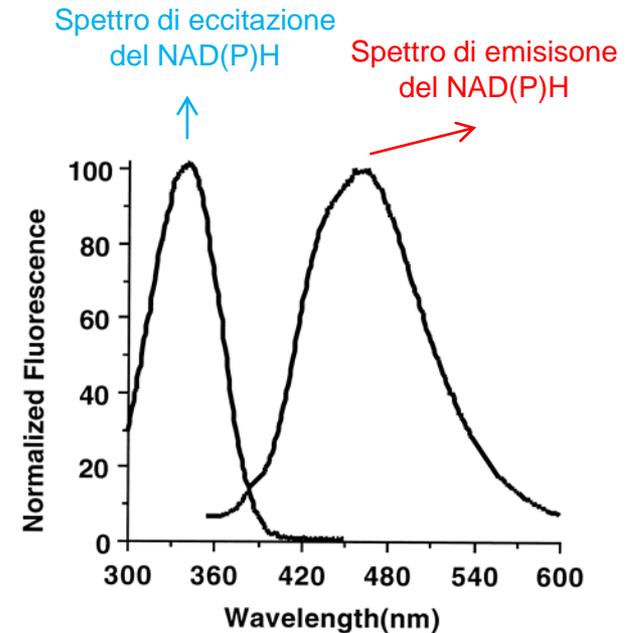
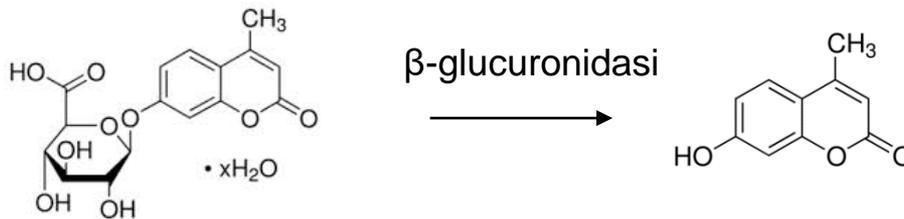
Effetto del pH sulla velocità di reazione

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



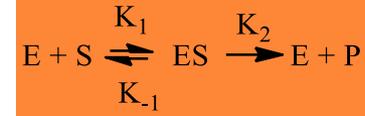
Altri metodi per la misura dell'attività enzimatica

- Metodi spettrofluorimetrici
- Metodi a luminescenza

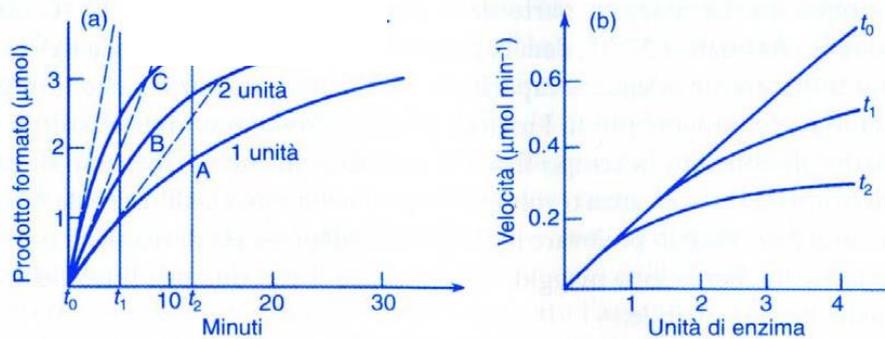


Riassunto Cinetica enzimatica

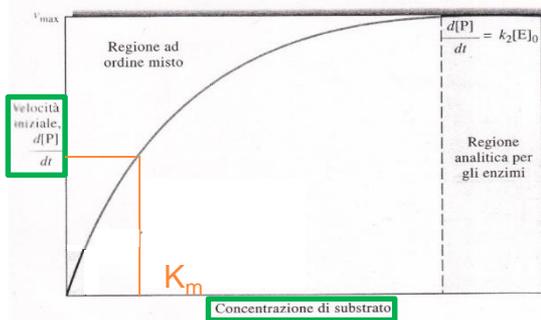
Determinazione concentrazione enzimi



è importante misurare la **VELOCITÀ INIZIALE** V_0



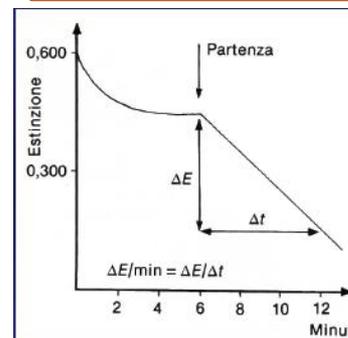
è importante lavorare in **CONCENTRAZIONI SATURANTI DI SUBSTRATO** ($V_0 = V_{max}$)



Se $[S] \gg K_m$

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

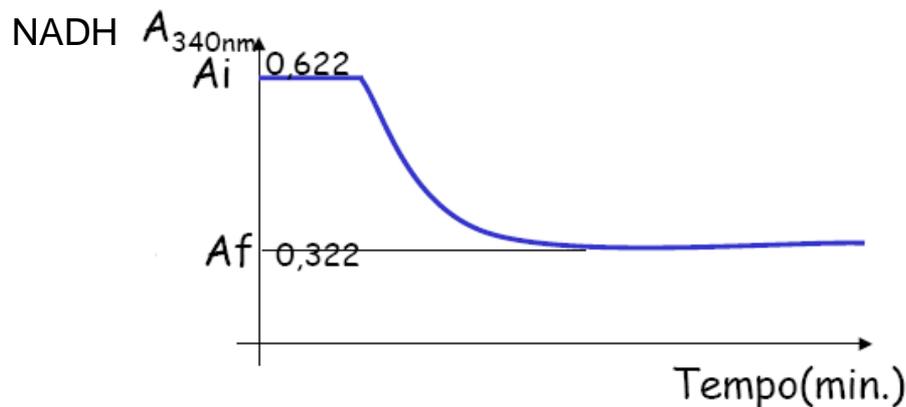
$$V_0 = K_2[E]_0 \text{ ed è } V_{max}$$



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

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



$$\Delta A = A_f - A_i$$

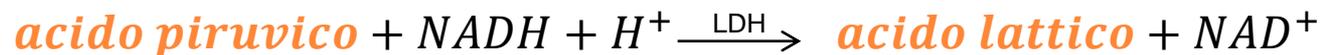
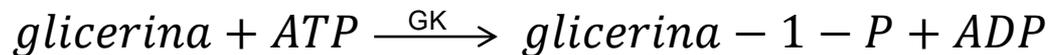
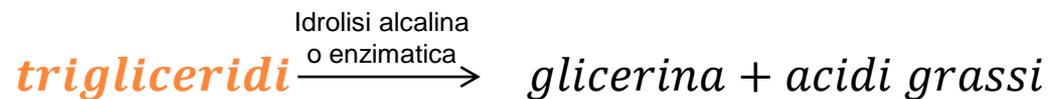
$$\Delta A = \epsilon b \Delta c$$

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

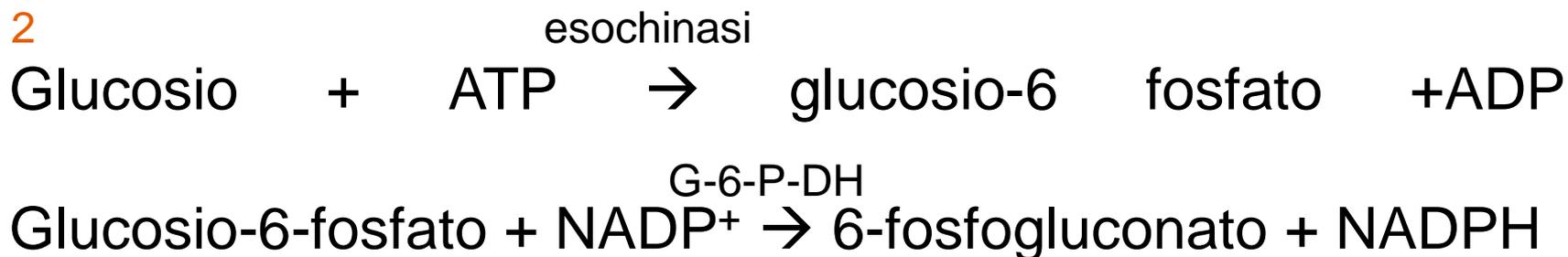
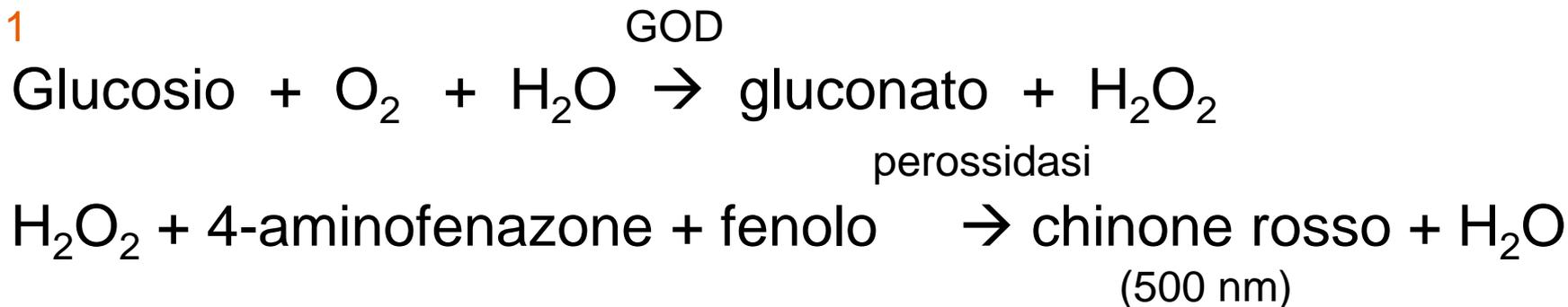
- Esempi di sostanze di interesse biologico:

- 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)

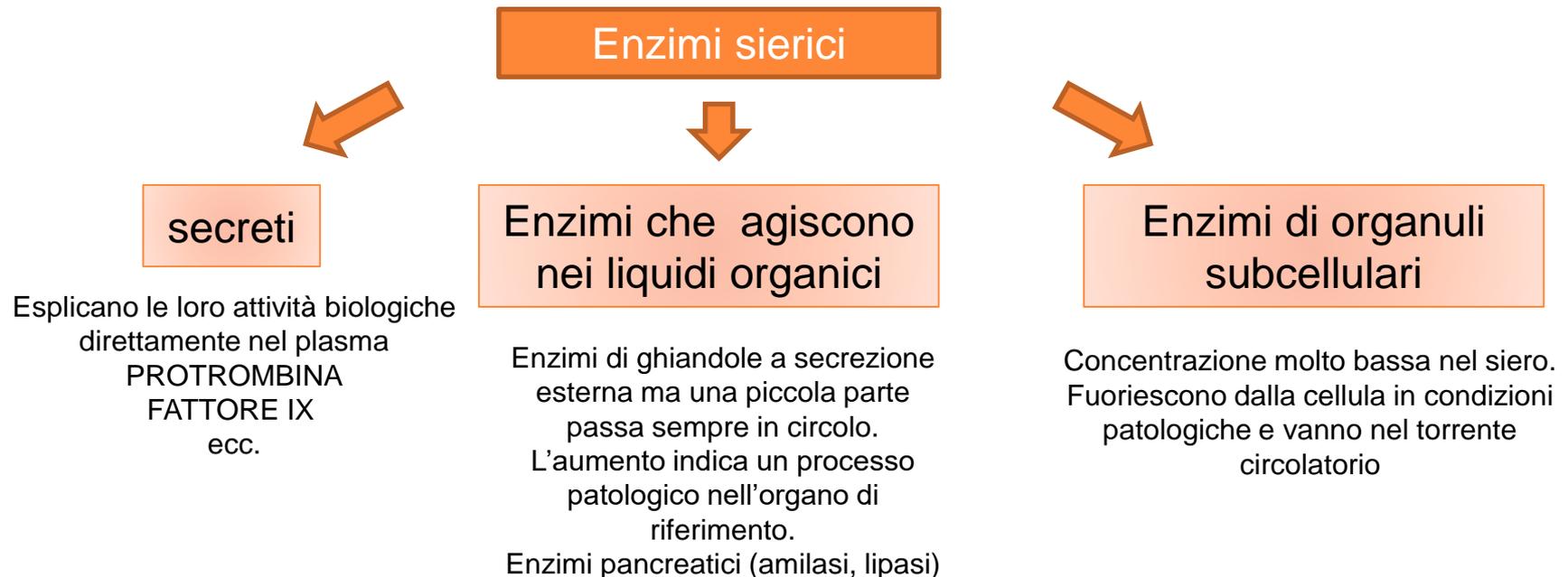


Tabella 6.7. Meccanismi responsabili delle variazioni di attività degli enzimi sierici in condizioni patologiche

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

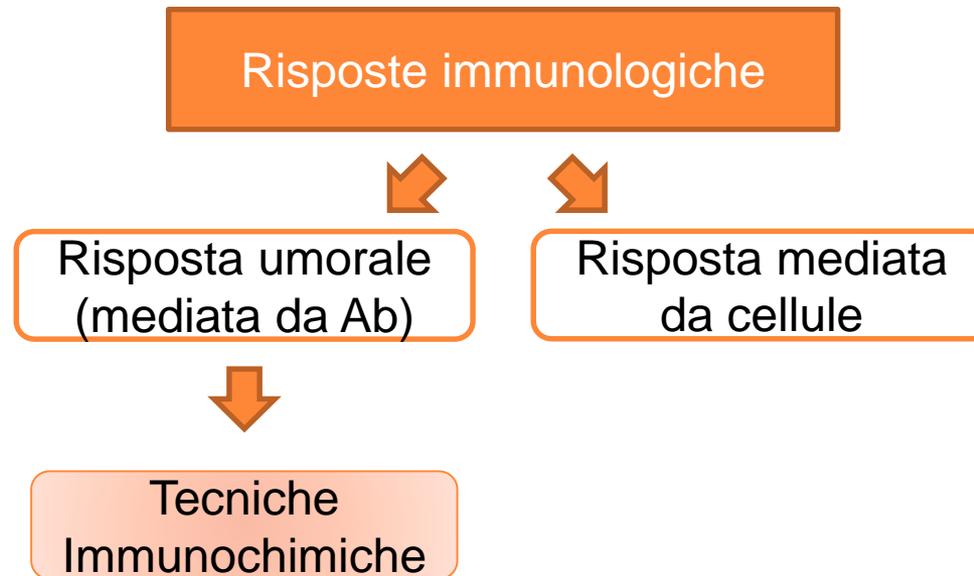
→ Indice della capacità sintetica del fegato

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

Tecniche analitiche

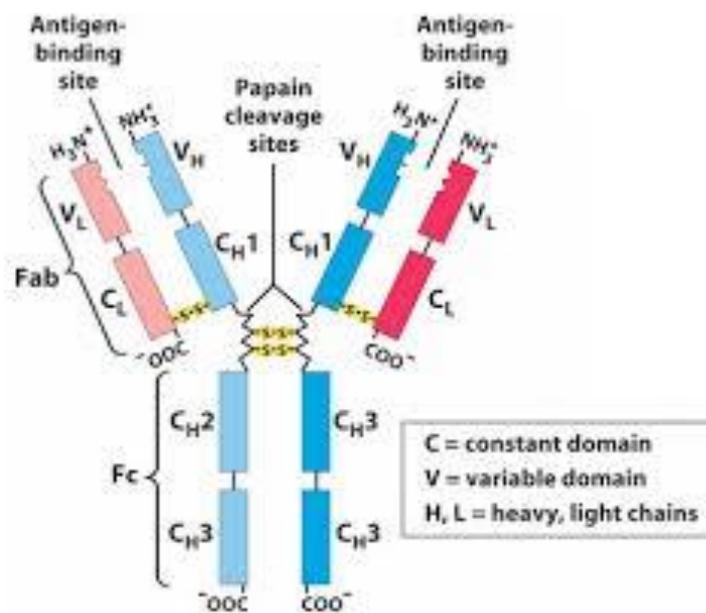
- Spettroscopia molecolare
 - assorbimento UV-VIS, luminescenza, riflettanza
- Spettrometria di massa
- Tecniche elettrochimiche
- Determinazione dell'attività enzimatica
- **Tecniche immunologiche**
- Tecniche per la diagnosi molecolare

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 |
|--|--------------------------------------|---|------------------------------------|---|---|
| PM | 160000 | 160000 | 900000 | 160000 | 190000-200000 |
| Catena pesante | γ | α | μ | δ | ϵ |
| Catena leggera | k o λ | k o λ | k o λ | k o λ | k o λ |
| Distribuzione primaria | Liquidi interstiziali e sangue (40%) | Colostro, saliva, secrezioni intestinali e respiratorie, sangue (40%) | Sangue (80%) | Sangue (75%) | Sangue (50%) |
| Concentrazione e nel siero normale (g/dL) | 1.0-1.5 | 0.1-0.4 | 0.05-0.15 | 0.003 | Estremamente bassa |
| % nel siero normale | 73% | 19% | 7% | 1% | - |
| Attività principale | Facilitano la fagocitosi | Neutralizzazione di tossine e virus | Effetto battericida e opsonizzante | Differenziano il linfocita B in plasmacellule | Reazione: ipersensibilità di tipo immediato |
| Placenta | Passano | no | no | no | no |
| Complemento | 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.

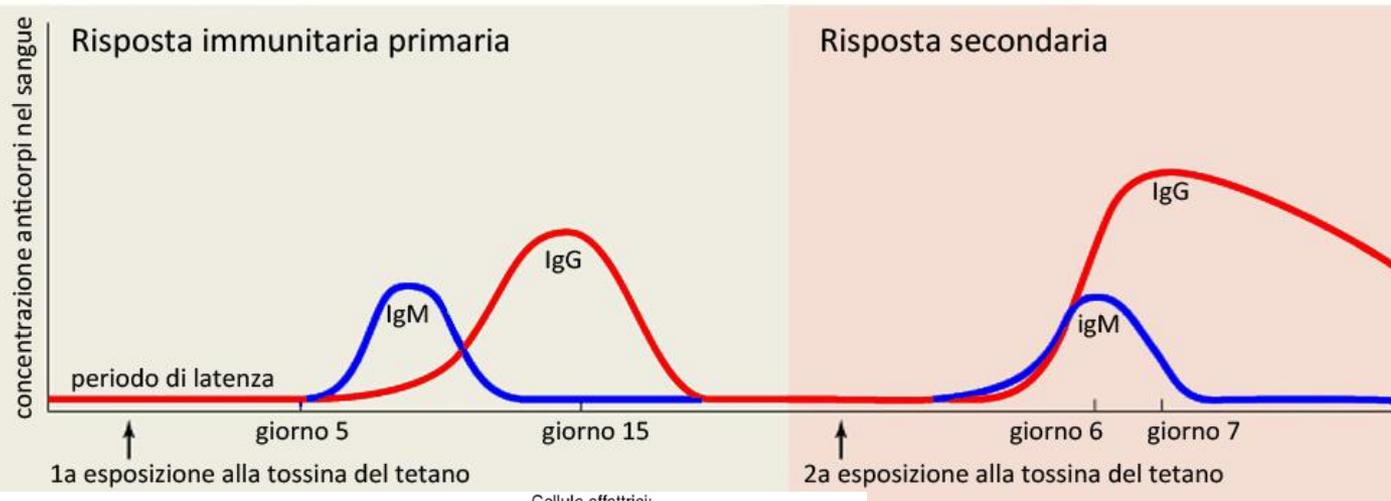
Reazione Ag-Ab

- **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

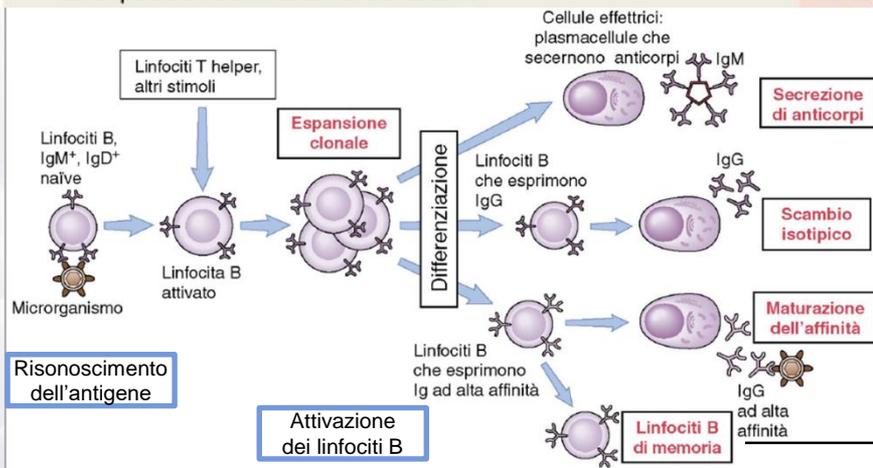
Reazioni sierologiche

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

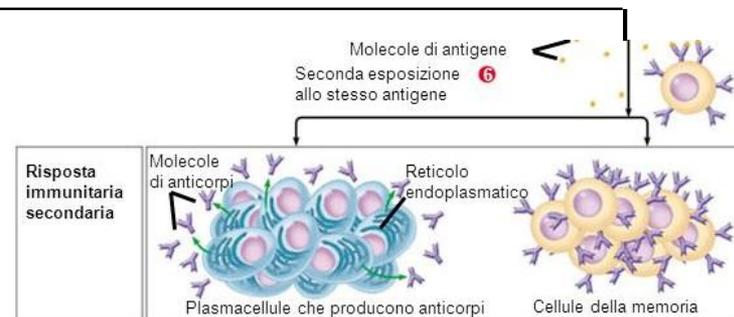
- **Agglutinazione**, quando l'antigene è corpuscolato (globuli rossi, batteri)
- **Precipitazione**, quando l'antigene è solubile
- **Neutralizzazione**, quando l'antigene, per azione del corrispondente anticorpo, perde la sua attività
- **Fissazione del complemento**, quando l'antigene è corpuscolato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



➔ **Ab policlonali**

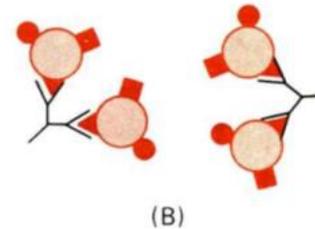
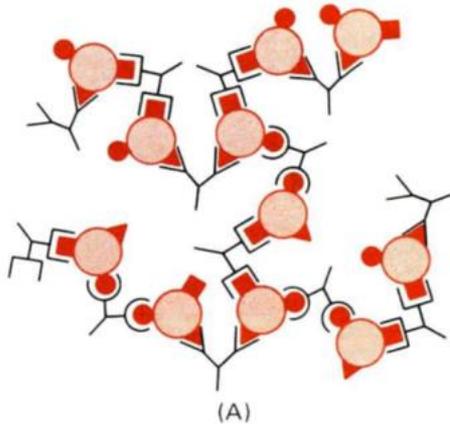
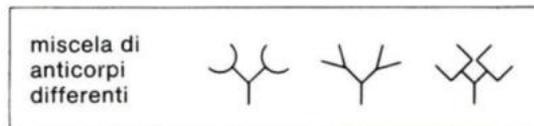


Risposta immunitaria umorale secondaria: indotta da una successiva iniezione di Ag dopo un certo intervallo di tempo dalla risposta primaria → risposta più rapida e oltre alle IgM aumentano le IgG



Ab monoclonali

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

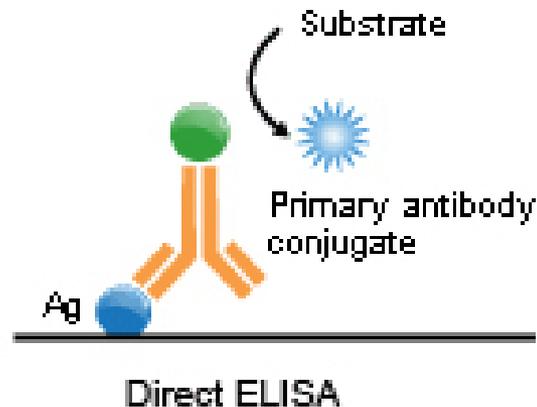


Saggi con Ag o Ab marcati

- **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

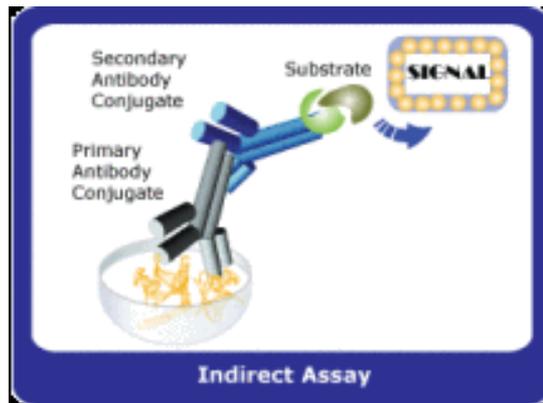


• ELISA diretto

- 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)

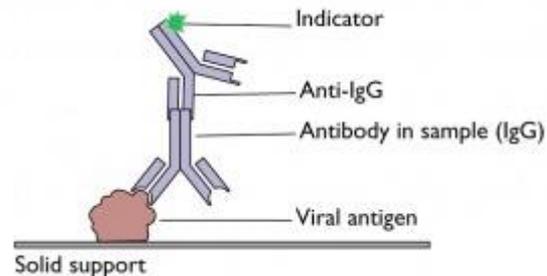
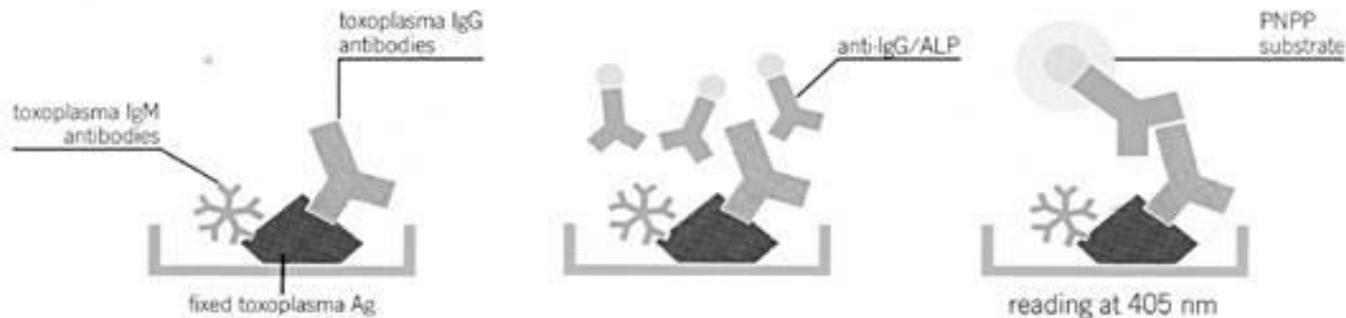


Toxo-IgG EIA-Kit

Enzyme immunoassay
for the determination of toxoplasma IgG antibodies

PRINCIPLE

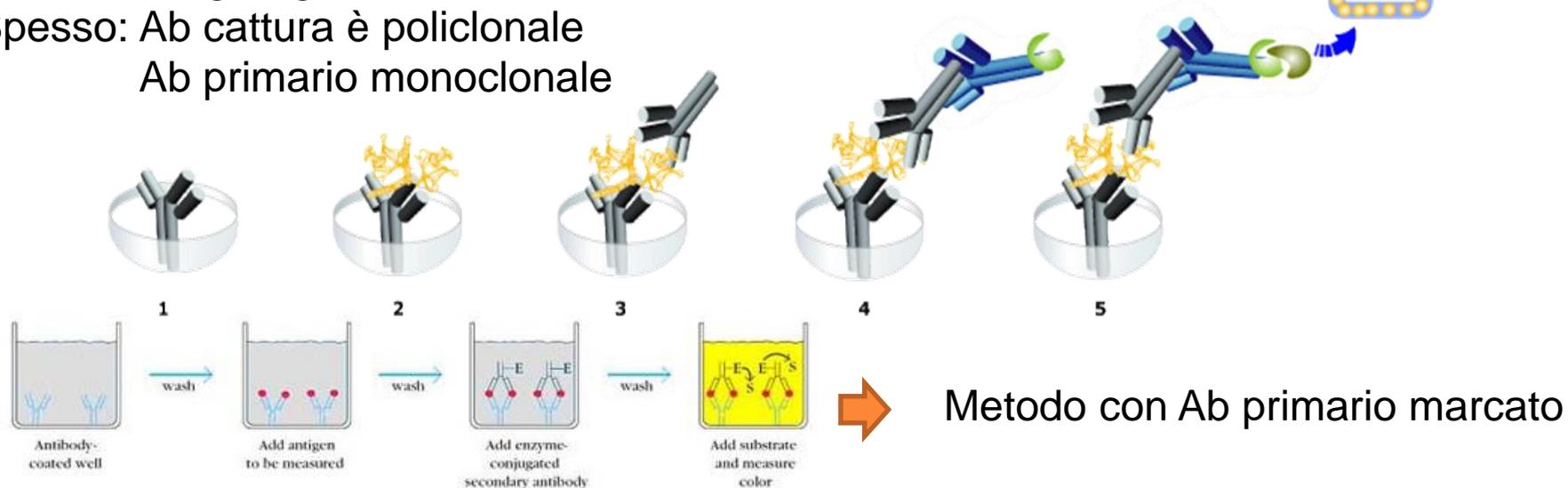
Specific antibodies in serum bind with the toxoplasma antigen coated onto a solid phase (strip); only IgG antibodies bind with the alkaline phosphatase labelled anti-IgG conjugate; the complex formed is revealed by hydrolysis of the enzyme substrate : p-nitrophenyl phosphate (PNPP). Automated reading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



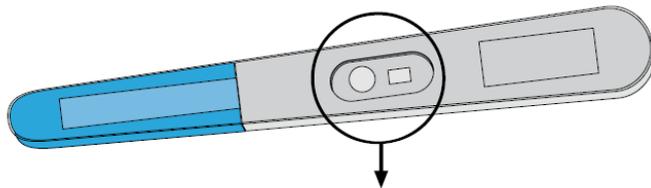
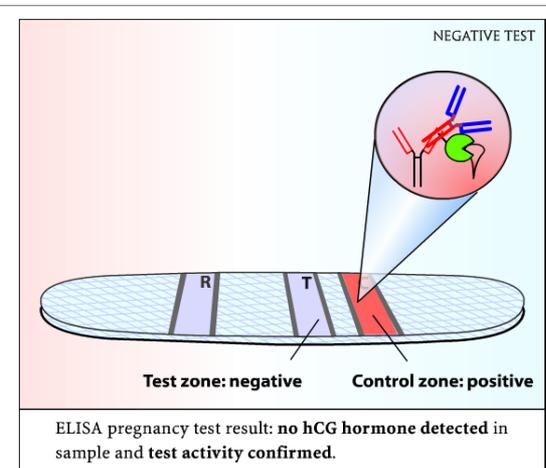
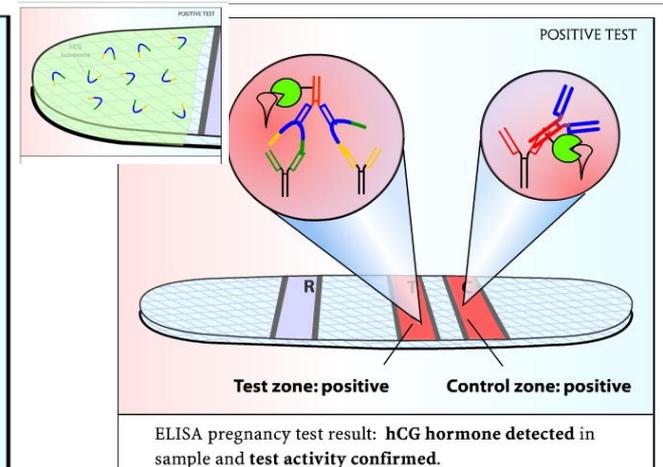
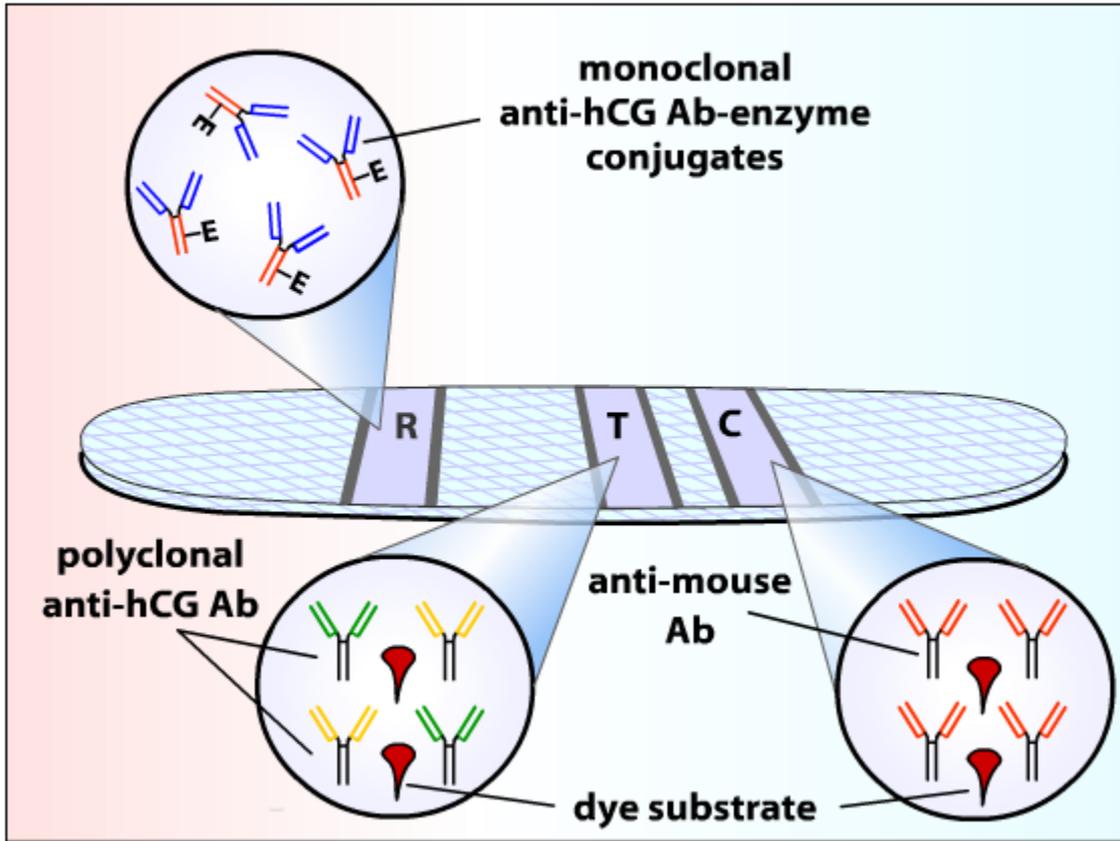
• Sandwich ELISA

- 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
- Quindi gli Ag devono avere almeno due siti di riconoscimento

Spesso: Ab cattura è policlonale
Ab primario monoclonale



TEST DI GRAVIDANZA: Presenza di gonadotropina corionica umana



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

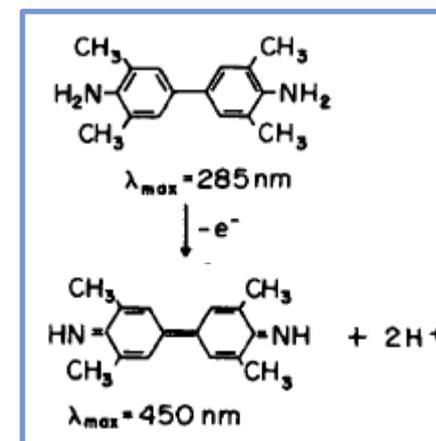
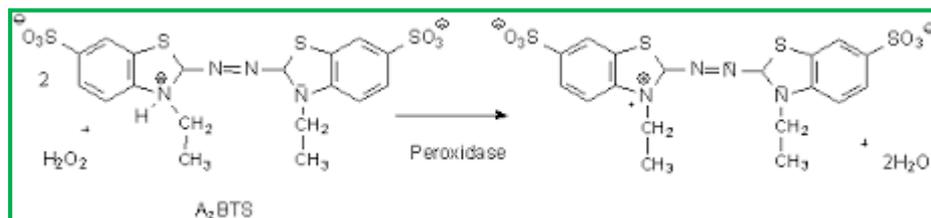
- Gravidanza ectopica e gravidanza molare
- Linee di evaporazione dell'urina
- Farmaci
- Condizioni mediche (certi tumori, cisti ovariche, problemi ai reni, menopausa)
- Precedenti aborti (indotti o spontanei, gravidanza chimica)
- Tempo di lettura (oltre il tempo consigliato)
- Test scaduto

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 → p-nitrofenolo (giallo)
 - HRP
 - ABTS, acido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonico) → composto verde (410 nm)
 - TMB, tetrametilbenzidina → composto blu



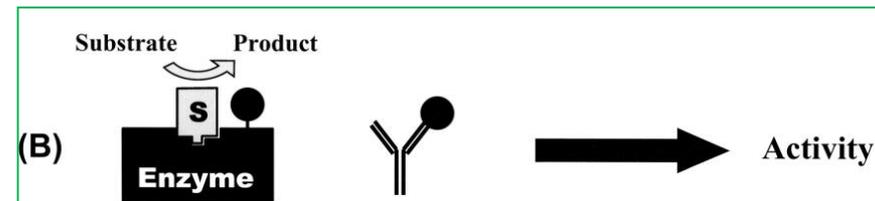
EMIT (Enzyme Multiplied Immunoassay Technique)

- 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

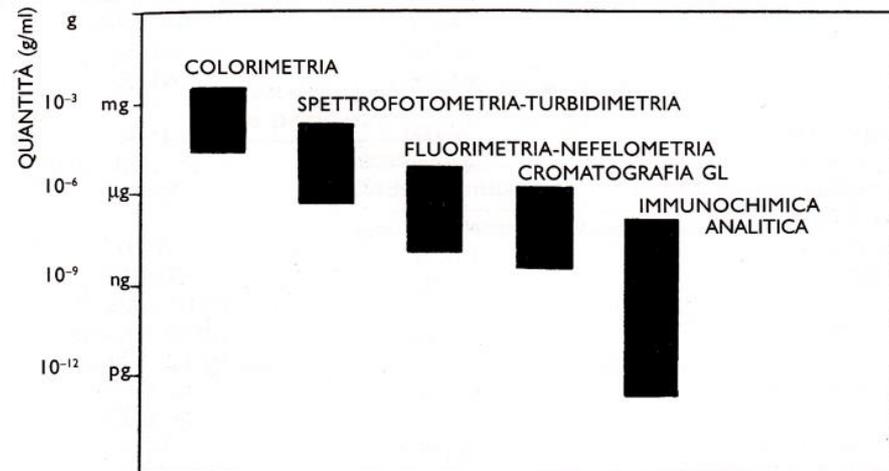
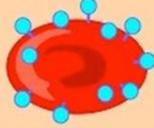
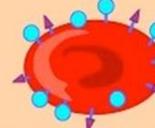
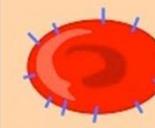
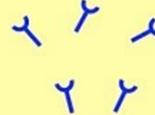
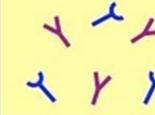
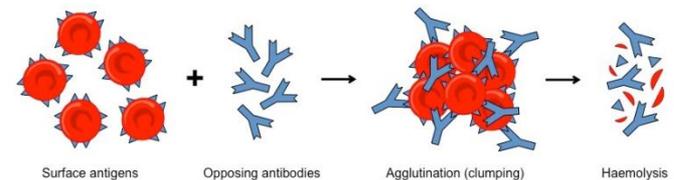


Figura 18.10. Livelli di sensibilità di alcune tecniche di misura comunemente impiegate in chimica-clinica; i metodi immunochimici (con vari marcatori) presentano i livelli di sensibilità nettamente più elevati.

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 |
|--------------------------------|--|--|---|---|
| Antigen (on RBC) | Antigen A  | Antigen B  | Antigens A + B  | Neither A or B  |
| Antibody (in plasma) | Anti-B Antibody  | Anti-A Antibody  | Neither Antibody | Both Antibodies  |
| Blood Donors | 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.

| | | | | | |
|----------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| anti-A | | | | | |
| anti-B | | | | | |
| anti-Rh | | | | | |
| gruppo | AB Rh+ | A Rh- | B Rh- | O Rh+ | O Rh- |

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

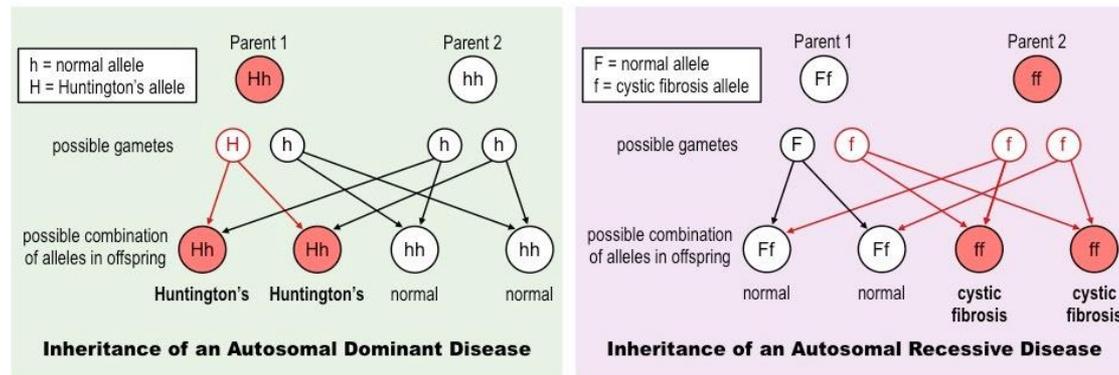
Processo di identificazione di una patologia mediante lo studio degli acidi nucleici (DNA ed RNA) nei tessuti o fluidi biologici.

Applicazioni cliniche della diagnosi molecolare

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

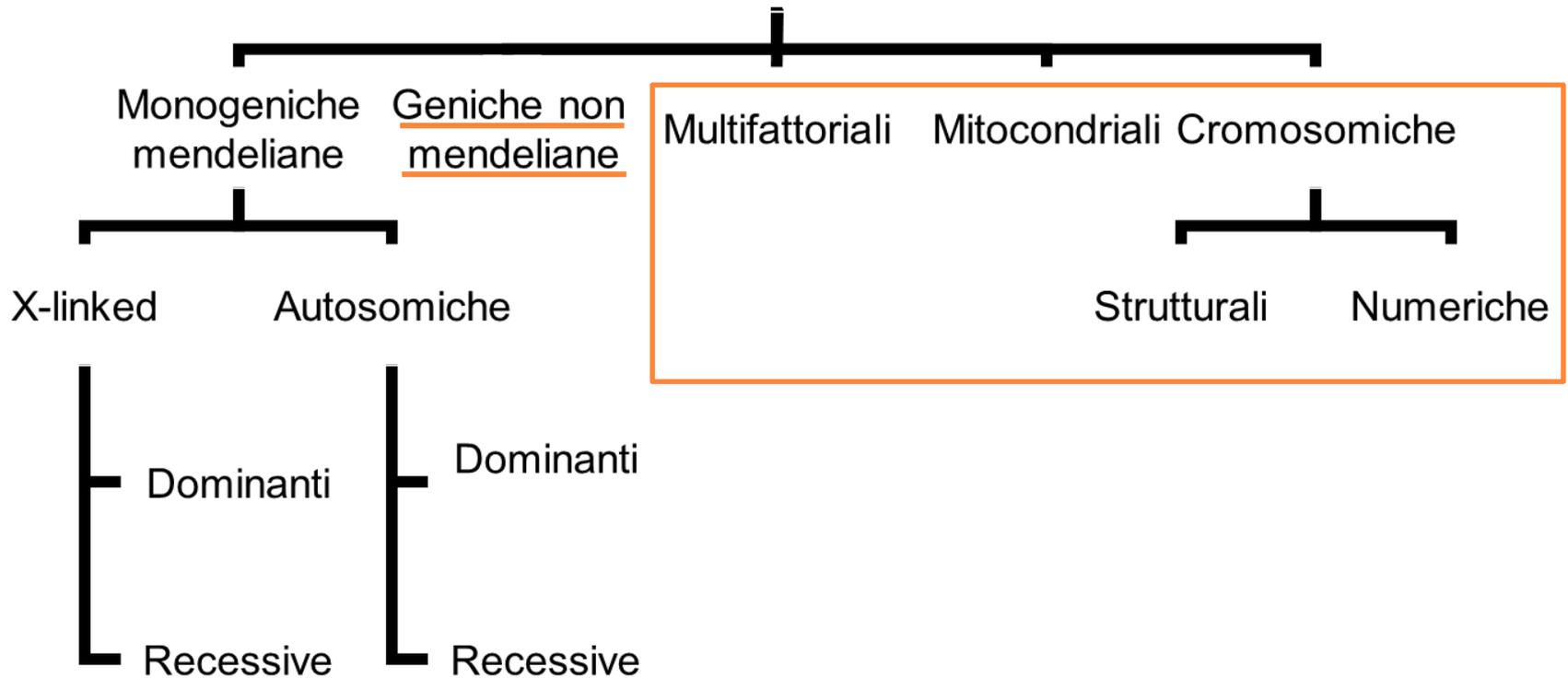
Diagnosi molecolare di malattie genetiche

- 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**



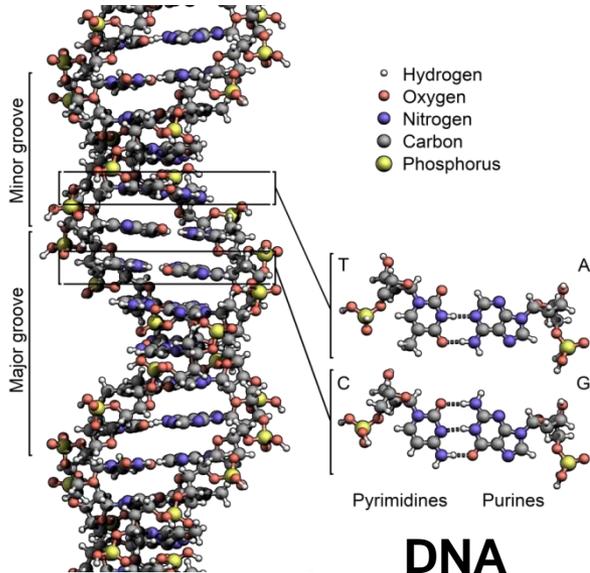
Complementare o in sostituzione all'approccio immunologico o colturale

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

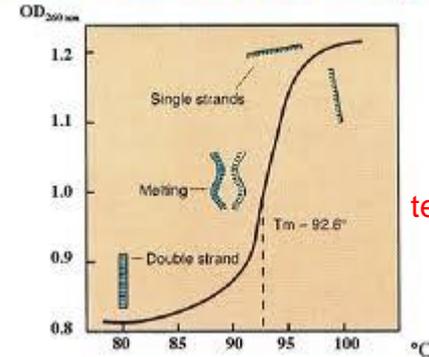


Denaturazione con l'aumento della T

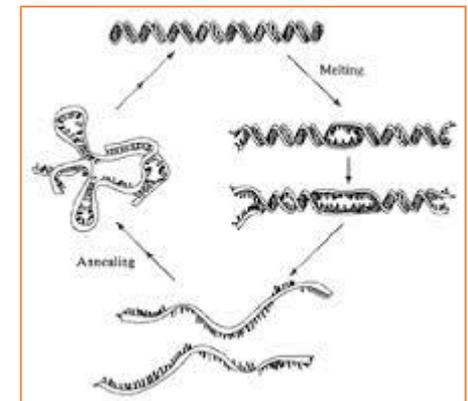


Rinaturazione con l'abbassamento della T
Serve una nucleazione (accoppiamento di 3 basi) poi il processo procede in modo automatico

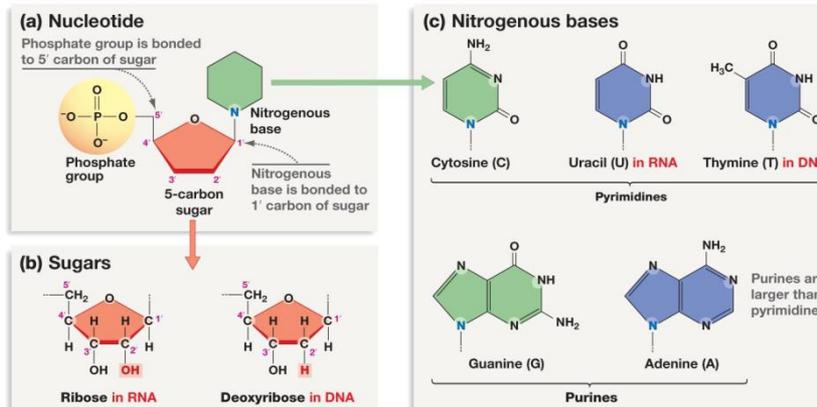
La denaturazione termica del DNA e l'“effetto ipertermico”



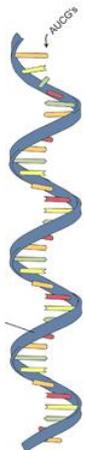
Melting temperature



DNA



Nucleotidi



RNA

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

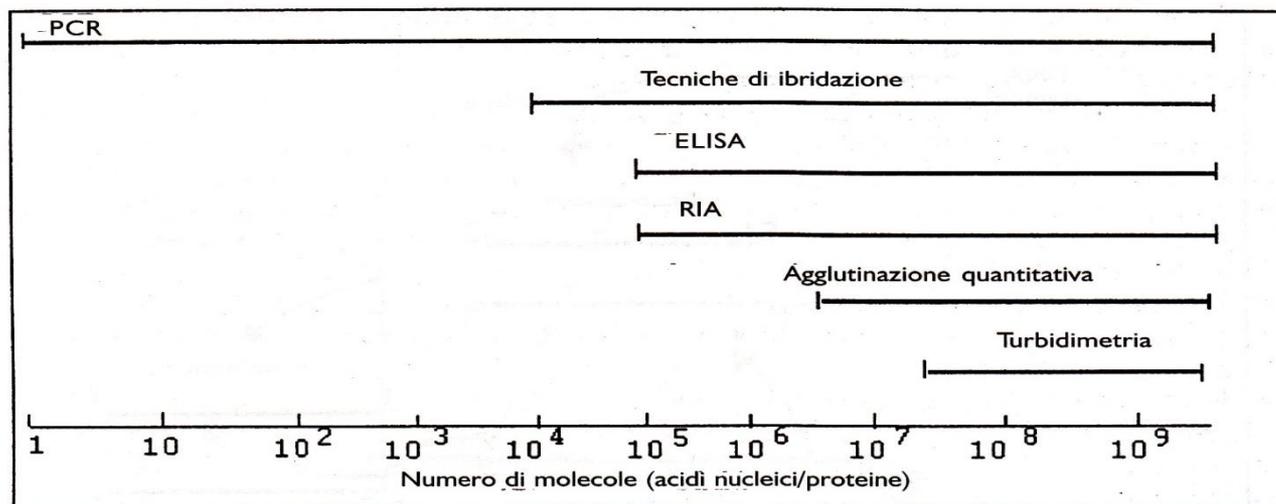


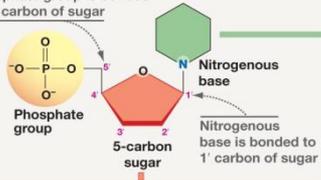
Figura 19.5. Limiti di sensibilità dei principali metodi diagnostici per la determinazione di proteine o acidi nucleici in un campione biologico.

è possibile amplificare:

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

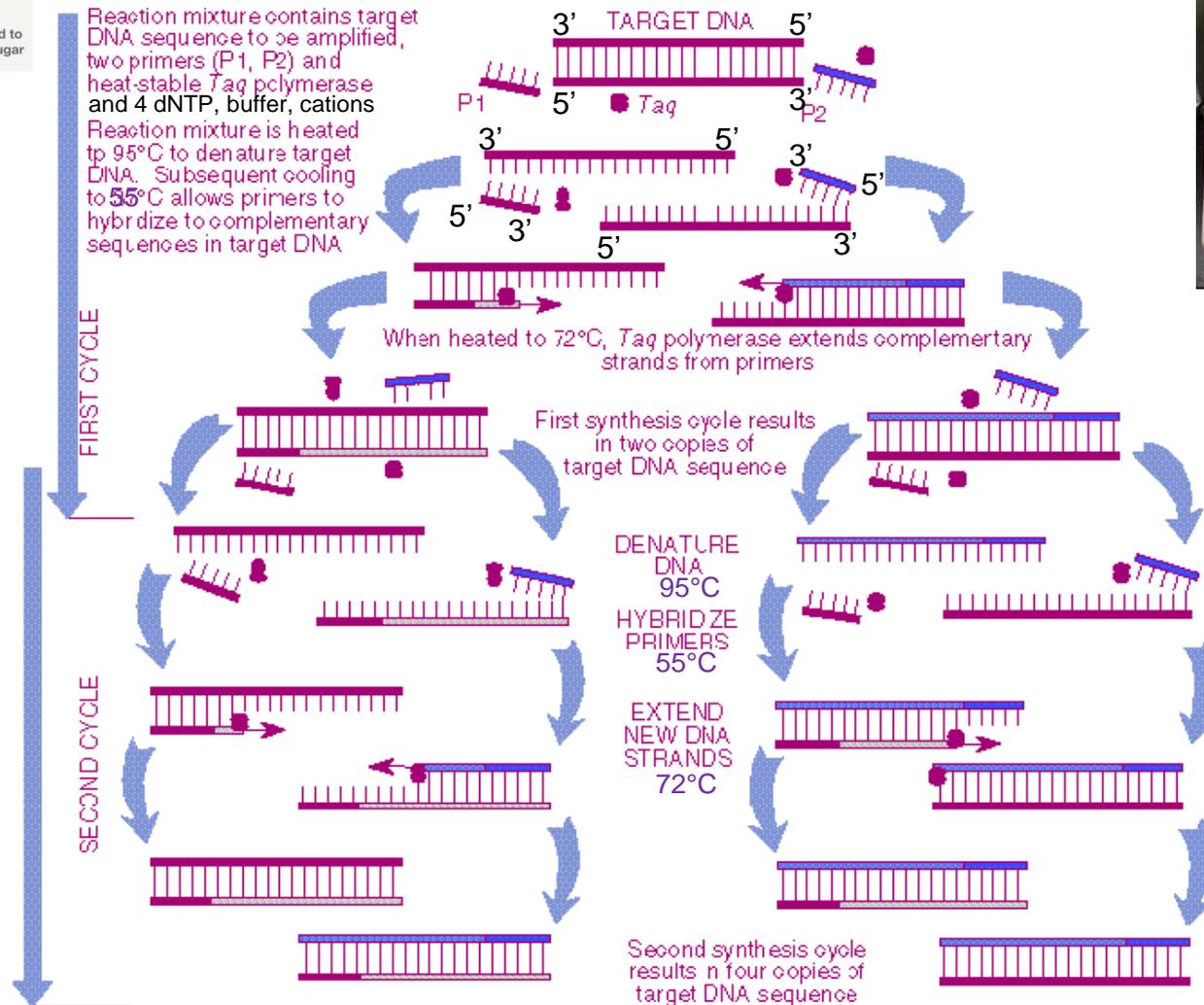
(a) Nucleotide

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 μL di saliva

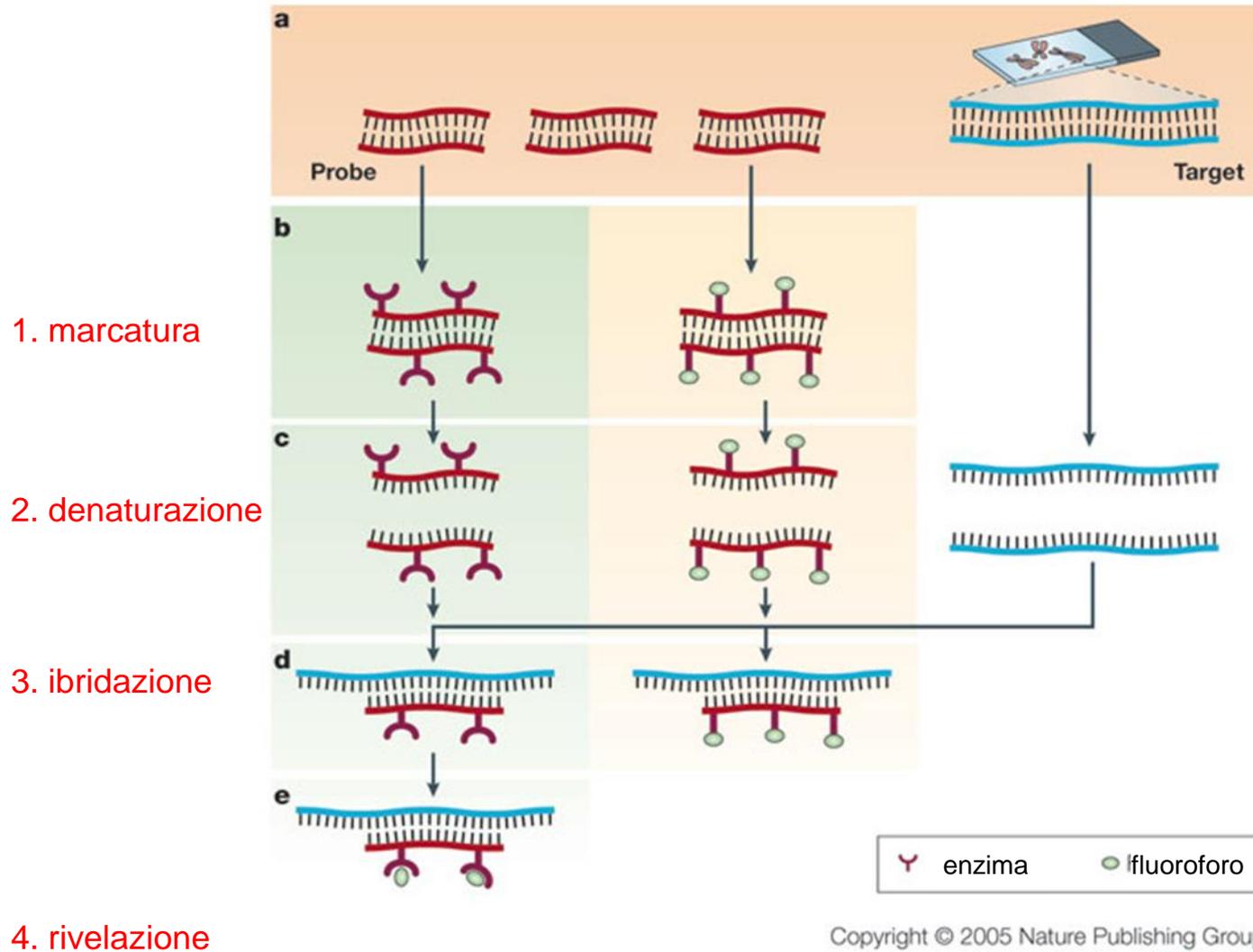
Rivelazione del prodotto amplificato

- 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 λ_{\max} dell'etidio bromuro intercalato)
- Per verificare la **specificità** del prodotto ottenuto è necessario utilizzare la tecnica dell'**ibridazione molecolare**.
- Real time PCR

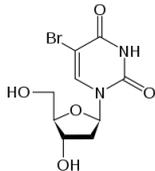
Reazioni di ibridazione

- 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

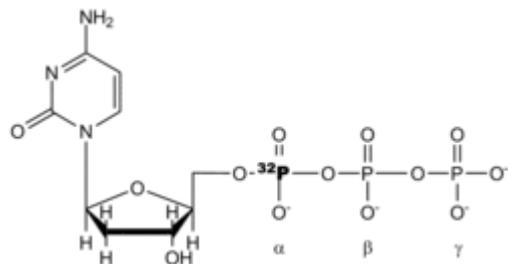
- Alta sensibilità (la costante di associazione tra sonda e target è maggiore che tra Ag e Ab)
- Alta specificità (è necessaria la complementarità di sequenza tra sonda e bersaglio)
- Per poter evidenziare l'ibridazione la **sonda** deve essere **marcata** inserendo nucleotidi marcati nella sequenza: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

Il metodo di rivelazione dipenderà dal tipo di marcatura utilizzata:

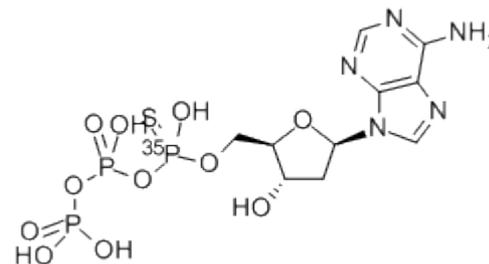
- Contatore a scintillazione
- Fluorimetro
- Spettrofotometro UV-VIS
- Ecc.

Sonde calde

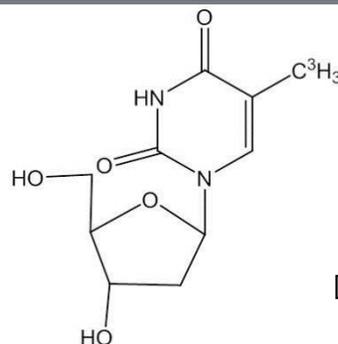
- Emissione rivelata mediante:
 - Conteggio al scintillatore → ibridazione in soluzione
 - Autoradiografia → ibridazione su filtro
- Tutti e quattro i trifosfonucleotidi sono disponibili in forma α - ^{32}P -nucleotide ma esistono anche derivati ^3H e ^{35}S



^{32}P alpha-deossicitidina trifosfato
 αP^{32} dCTP αP



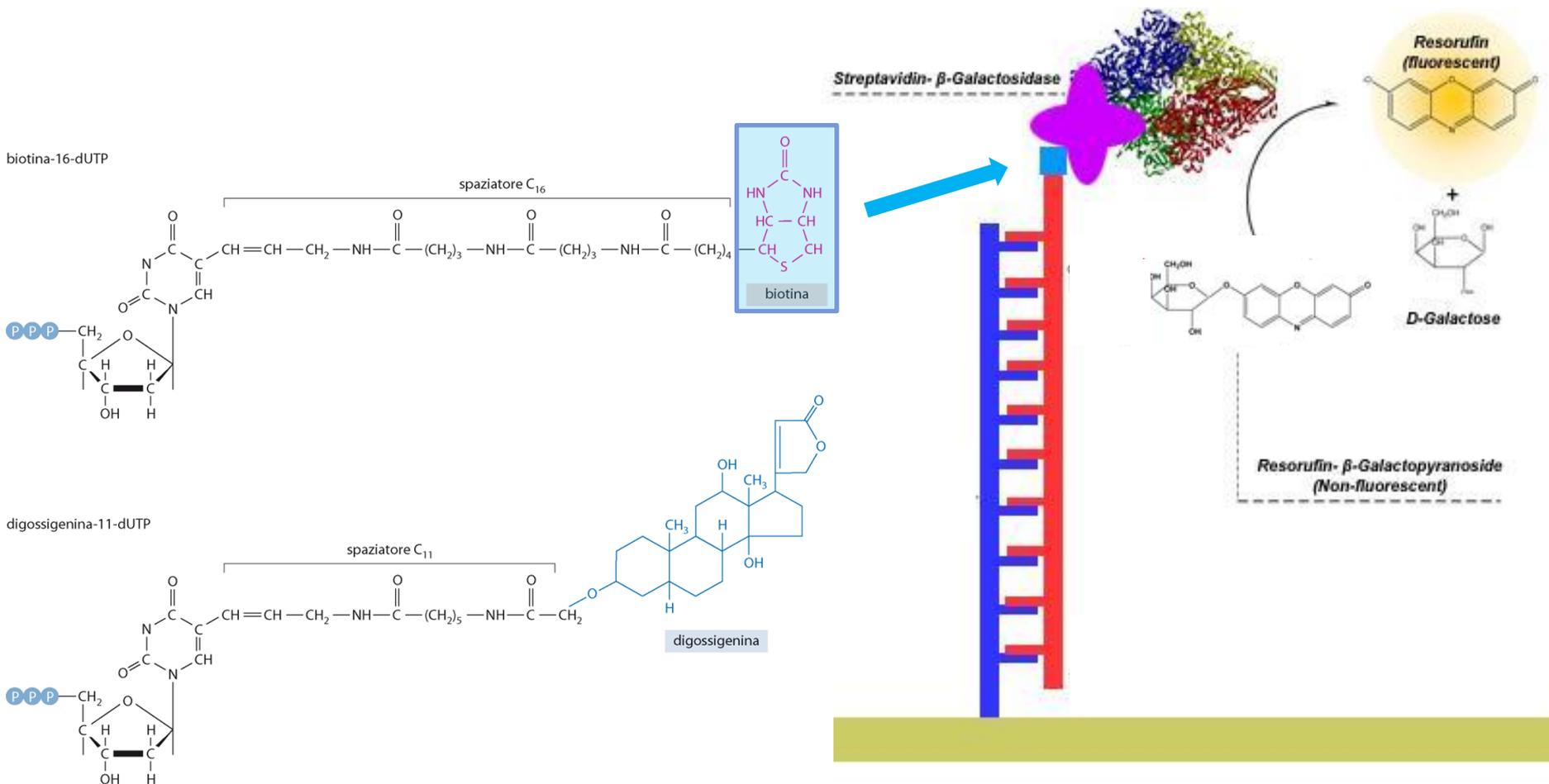
^{35}S alpha-tiodeossiadenosina trifosfato
dATP αS



^3H methyl deossitimidina trifosfato
Methyl ^3H dTTP

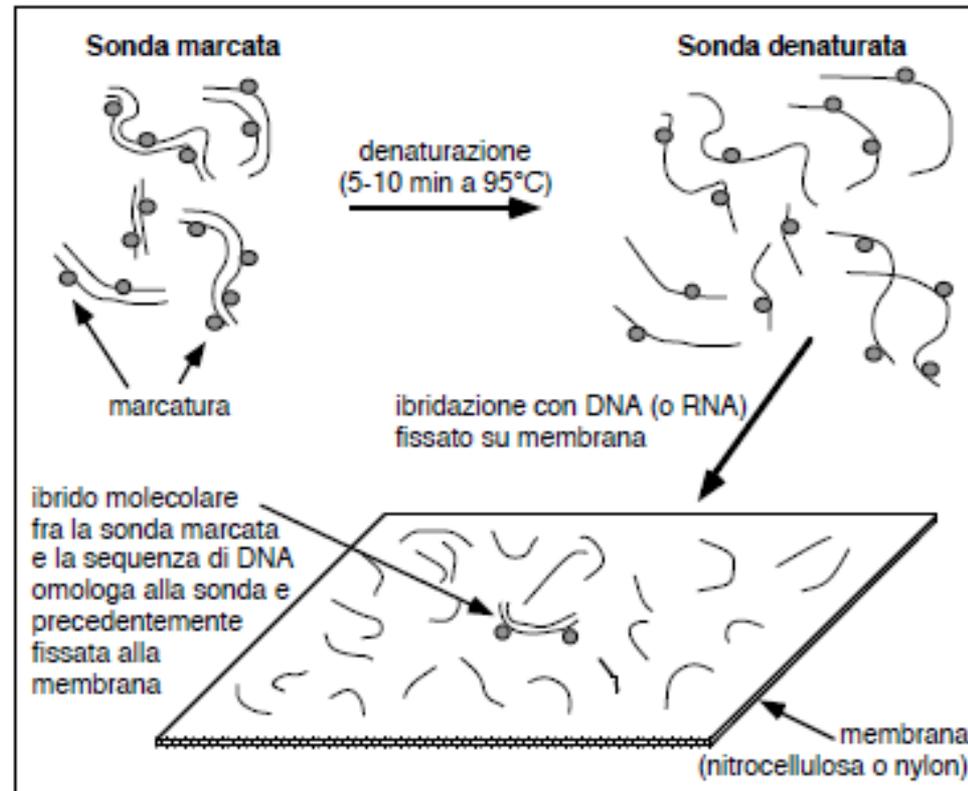
Singola marcatura in quanto manca l'OH in 3' per la polimerizzazione

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)

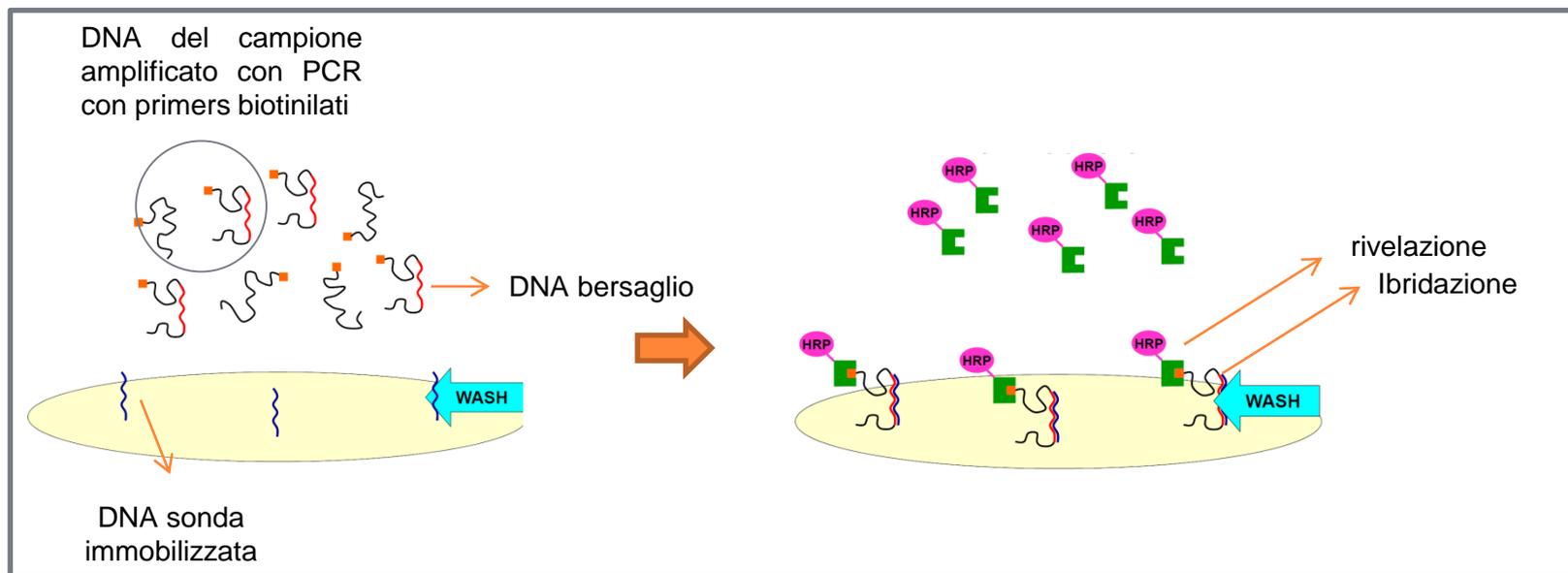


- Dopo gel-elettroforesi si effettua la denaturazione e poi il trasferimento su membrane (gel-blot)

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

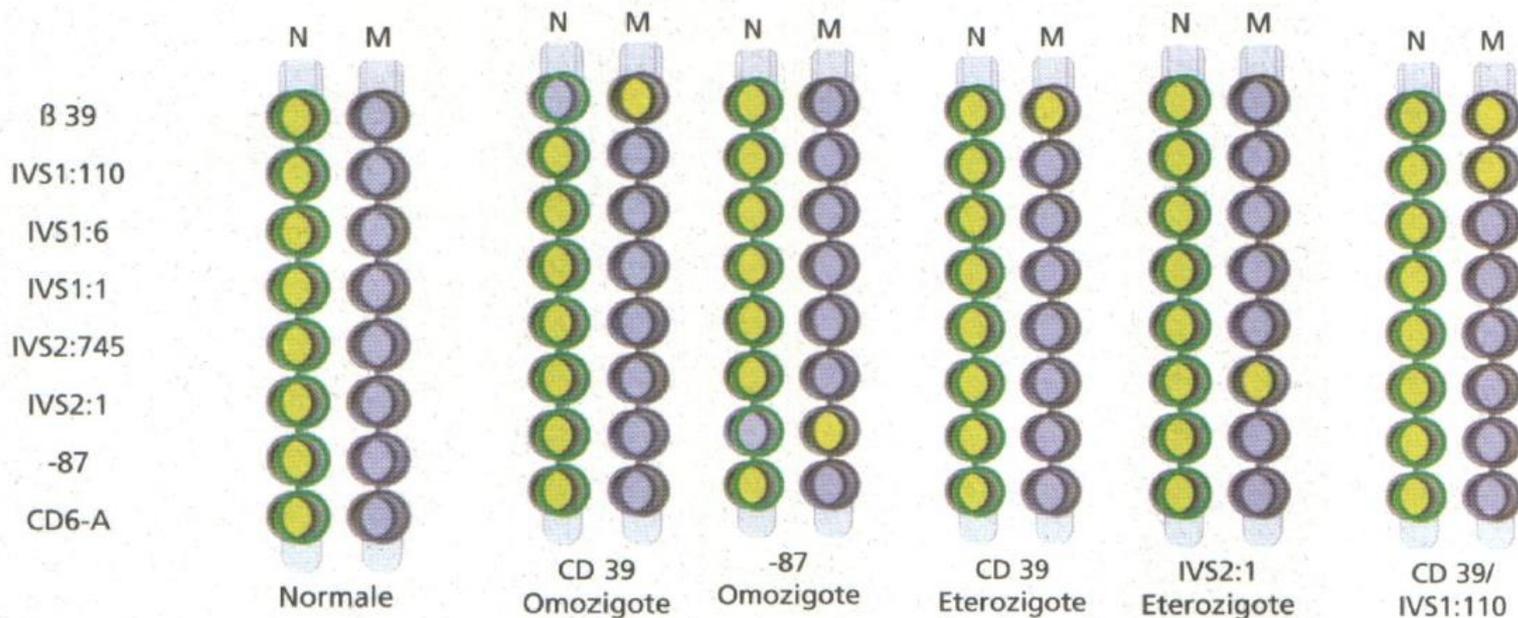
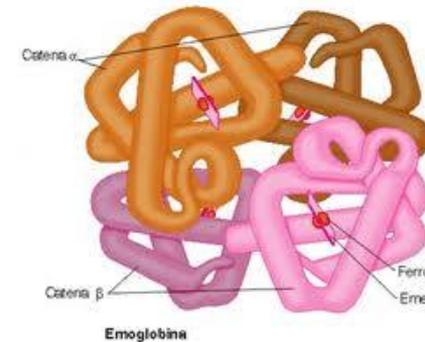
Tecniche di ibridazione molecolare mediante *reverse dot blot, RDB*



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

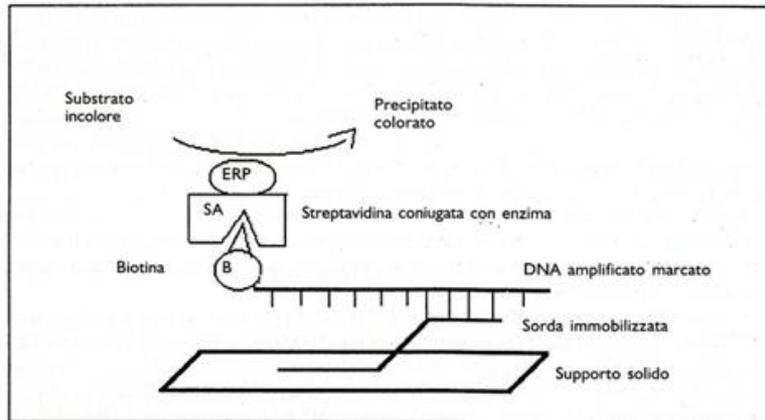


Figura 19.12. Esempio di metodo indiretto per la rivelazione del prodotto dell'ibridazione tra il DNA amplificato e la sonda specifica.

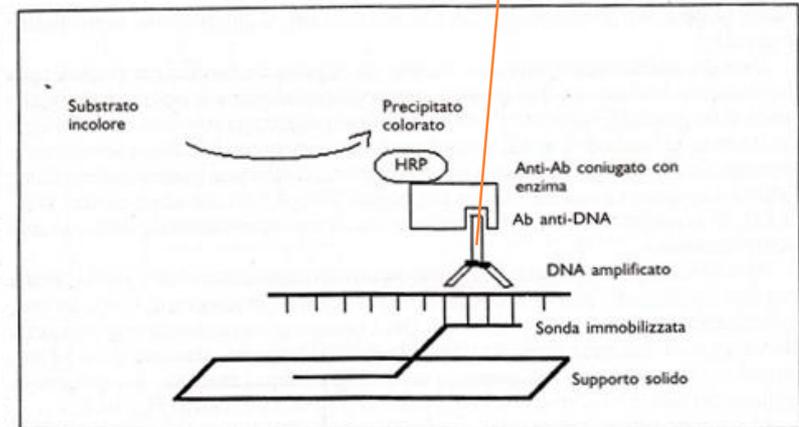


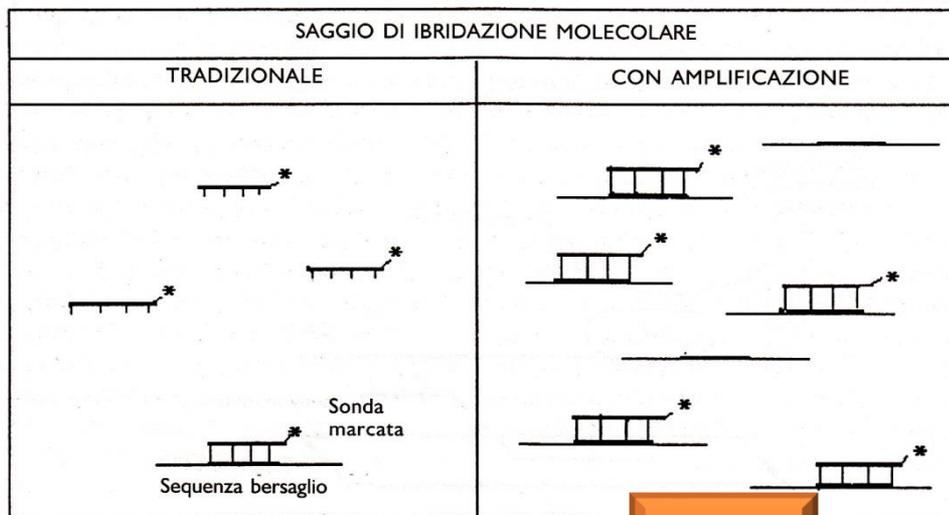
Figura 19.13. Esempio di metodo indiretto per la rivelazione del prodotto dell'ibridazione tra DNA amplificato e la sonda specifica.

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.

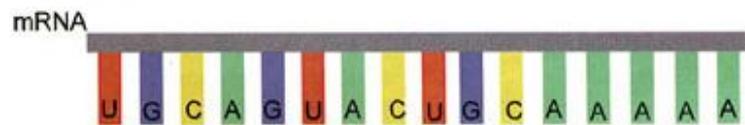


FIG. 1. RNA template. Prior to initiating reverse transcription the template RNA must be isolated from the sample to be tested. This figure shows a polyadenylated mRNA.

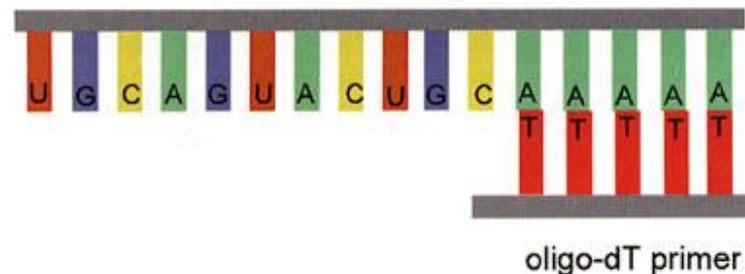


FIG. 2. Priming for reverse transcription. To generate cDNA using the enzyme reverse transcriptase (RT), a primer is annealed to the template RNA. The primer can be gene specific primers, random primers or oligo-dT primers for mRNA. In this example, oligo-dT primers are used to initiate cDNA synthesis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

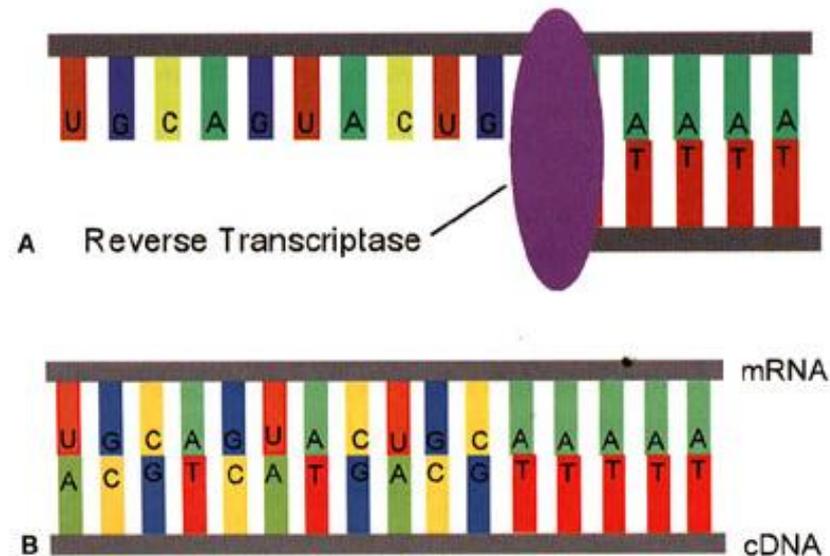


FIG. 3. First strand synthesis. The first strand of cDNA is synthesized using RT. Beginning at the primer annealing site (A), RT adds complementary nucleotide bases to the mRNA strand creating a strand of cDNA (B).



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)

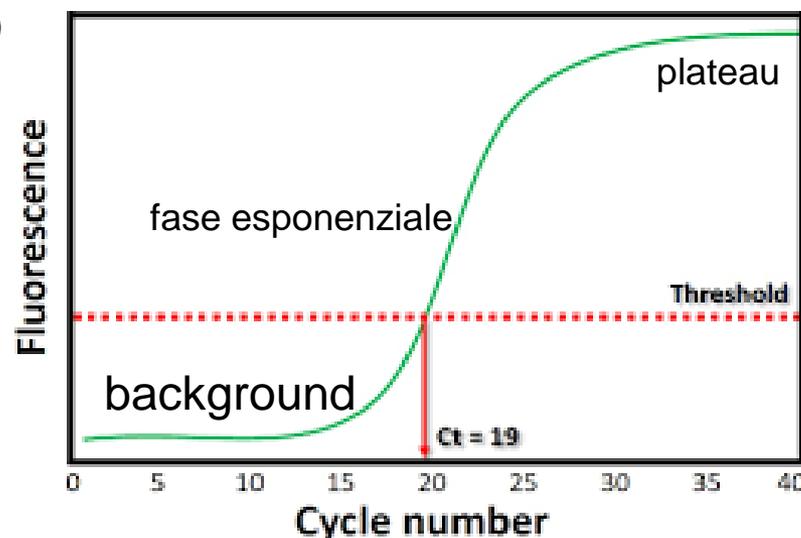
Il prodotto amplificato viene quantificato ad ogni ciclo

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



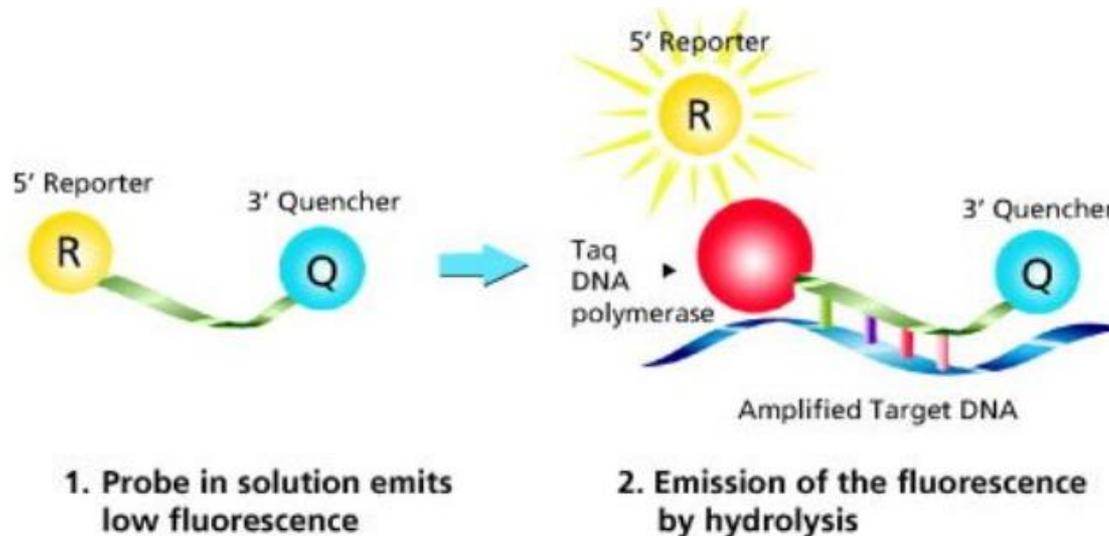
Real time PCR (qPCR)

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.

