

Biochimica clinica

Grandezze e unità di misura

La concentrazione è la quantità di sostanza in un determinato volume, da più diluito a più concentrato. I risultati delle analisi di laboratorio sono spesso espressi con unità di misura diversa e le unità di concentrazione usate possono essere differenti tra laboratori. Le quattro principali unità di misura sono: molarità (M, mM, μ M, nM)-unità di misura internazionale; percentuale (%); quantità di massa (g/L, mg/mL, mg/dL); parti per milione (ppm), per miliardo (ppb) e per trilione (ppt) usati soprattutto in tossicologia. Nel SI la concentrazione è espressa per mol/m³ (M), l'urea mM, Cu μ M; proteine in g/dL tradizionale o g/L internazionale. Intervalli di riferimenti in numeri variano tantissimo nelle diverse misure, es il cortisone in unità internazionale ha concentrazione 36-81nM nel cavallo, mentre in unità classiche 1,30-2,93 μ M.

Parametro	Tradizionale	Internazionale
Sodio	mg/dL	mM
Potassio	mg/dL	mM
Cloro	mg/dL	mM
Calcio	mg/dL	mM
Magnesio	mg/dL	mM
Ferro	μ g/dL	μ M
Rame	μ g/dL	μ M
Urea	mg/dL	mM
Creatina	mg/dL	mM
Creatinina	mg/dL	μ M
Glucosio	mg/dL	mM
Lattato	mg/dL	mM
Bilirubina	mg/dL	μ M
T4	μ g/dL	mM
Cortisolo	μ g/dL	μ M

Una mole di sostanza contiene $6,02 \times 10^{23}$ particelle (atomi, ioni, molecole, unità di formula) di quella sostanza, è una quantità di molecole. Il peso della mole dipende dal peso della singola unità (peso molecolare della sostanza), es 1 mole di glucosio pesa 180 g/mol, 3 moli di glucosio $3 \times 180 = 540$ g/mol. Dato che composti diversi hanno pesi molecolari diversi, a parità di numero di particelle hanno massa diversa (NB: se so il peso molecolare della sostanza-Da, so quanto pesa 1 mole). Una mole di sostanza pesa la sua massa molecolare espressa in grammi (**$g = PM \times moli$**).

Glucosio	(PM = 180 Da)	1 mole = 180 g	2 moli = (180x2) = 360 g	180 g di Glucosio (PM=180)	180 g / 180	1 mole
				360 g di Glucosio	360 g / 180	2 moli
Cortisolo	(PM = 362 Da)	1 mole = 362 g	1,5 moli = (362x1,5)=543 g	500 g di Glucosio	500 g / 180	2,7 moli
Bilirubina	(PM = 585 Da)	1 mole = 585 g (~ ½ Kg)				
Insulina	(PM = 5800 Da)	1 mole = 5800 g (~ 5 kg)		362 g di Cortisolo (PM=362)	362 g / 362	1 mole
Emoglobina	(PM = 65000 Da)	1 mole = 65000 g (65 kg)		724 g di Cortisolo	724 g / 362	2 moli
				1,5 Kg di Cortisolo	1500 g / 362	4,14 moli

Multipli e sottomultipli decimali

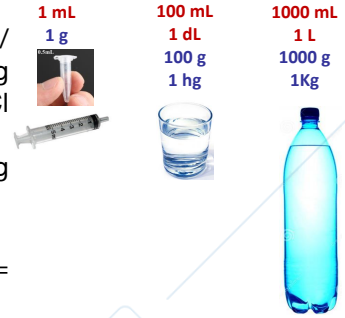
tera	T	10^{12}	1 000 000 000 000
giga	G	10^9	1 000 000 000
mega	M	10^6	1 000 000
kilo	k	10^3	1 000
etto	h	10^2	100
deca	da	10^1	10
deci	d	10^{-1}	0,1
centi	c	10^{-2}	0,01
milli	m	10^{-3}	0,001
micro	μ	10^{-6}	0,000 001
nano	n	10^{-9}	0,000 000 001
pico	p	10^{-12}	0,000 000 000 001
fento	f	10^{-15}	0,000 000 000 000 001
atto	a	10^{-18}	0,000 000 000 000 000 001

La molarità è l'espressione di concentrazione (quantità di sostanza in un determinato volume): **$M = n \text{ moli} / 1 \text{ l}$** soluzione, es se voglio fare una soluzione di glucosio 1M devo mettere 180g in 1l di soluzione. **mM=mg/L/PM**, la mM è in mmoli/L.

Esercizio: -valore misurato 3mM \rightarrow mg/dL?, intervallo di riferimento 40-60 mg/dL, peso molecolare glucosio 180 Da. $3mM = 3mmoli/L$ [$3mmoli/L \times 180mg = 540mg$]/L=54 mg/dL (NB:da L a dL se L sotto devo togliere uno 0).

-valore misurato 2,5 mg/ml \rightarrow mM?, soglia anaerobica 4mM=mmol/L, peso molecolare lattato 90Da. $2,5mg/ml / 90 = 0,027mmoli/ml \times 1000 = 27mmoli/L$.

La percentuale (%) indica la parte su 100; peso/peso grammi/100g, peso/volume grammi/100mL (o 1 dL → g/dL). 1mL=1g, 100mL=100g 1dL=1hg 1000mL=1000g 1L=1kg. Esercizi: -soluzione fisiologica 0,9% NaCl=0,9g NaCl in 100mL, 0,9g:100mL=x:1L x=0,009g



-preparare 1 L di soluzione al 3% glucosio: 3g:100mL=x:1000mL x=30g glucosio

-preparare 2,5L di soluzione 0,9% NaCl: 0,9g:100mL=x:2500mL x=22,5g NaCl.

I ppm sono 10^{-6} , ppb 10^{-9} ; ppm= mg/L (Kg)= μ g/mL (g)= g/t; ppb= μ g/L (Kg)= ng/mL (g)= mg/ton. Sono molto utilizzati in tossicologia.

ppm: 10^6		ppb: 10^9	
Pesi - volumi		Pesi - volumi	
ton -		ton -	
Kg - L		Kg - L	
g - mL		g - mL	
mg - μ L		mg - μ L	
μ g - nL		μ g - nL	
ng - pL		ng - pL	
pg - fL		pg - fL	

tera	T	10^{12}
giga	G	10^9
mega	M	10^6
kilo	k	10^3
etto	h	10^2
deca	da	10^1
deci	d	10^{-1}
centi	c	10^{-2}
milli	m	10^{-3}
micro	μ	10^{-6}
nano	n	10^{-9}
pico	p	10^{-12}
fento	f	10^{-15}
atto	a	10^{-18}

Esercizio: -8ppm= 8μ g/mL; 0,3ppm= 300ng/mL; 2ppm= 2mg/Kg; 7ppb= 7ng/mL; 0,2ppb= 200 μ g/t.

-Tetraciclina nel latte 0,5ppb (limite di legge); se in un campione di latte la concentrazione di tetraciclina è 0,04 μ g/mL, viene superato il limite? 0,04 μ g/mL=0,04ppm=40ppb (non può essere utilizzato).

La presenza di enzimi nel sangue può indicare che un tessuto è danneggiato. La quantità degli enzimi si esprime con l'intensità (velocità) della reazione catalizzata, la velocità degli enzimi è direttamente proporzionale alla velocità della reazione da essi catalizzata. Ci sono due sistemi per vedere quanto va veloce la reazione: -sistema tradizionale→ quantità di enzima in grado di convertire 1 μ mole di substrato in prodotto in 1 minuto (μ mol/min);

-SI→ katal (kat), quantità di enzima che converte 1 mole di substrato in prodotto in 1 secondo (moli/sec), normalmente si usano i sottomultipli.

Esercizio: -preparare 10mL di una soluzione di un antibiotico a concentrazione 1mg/mL avendo a disposizione una soluzione iniziale madre con concentrazione 25mg/mL. 1mg/mL x 10mL= 10mg 25mg/mL:1mL=10mg: x mL x=10/25=0,4mL antibiotico, 10-0,4=9,6mL fisiologica oppure uso **V1 x C1=V2 x C2** V1=(10,1)/25=0,4mL

Metodi di analisi biochimiche in laboratorio

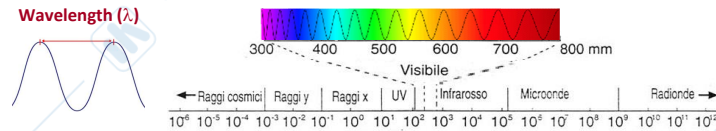
Lo sviluppo del colore è dovuto al diverso comportamento delle onde elettromagnetiche nei confronti della soluzione considerata.

I metodi di analisi biochimiche in laboratorio possono essere diretti o indiretti: -analisi indiretta→ rilevano e quantificano analiti dopo reazioni o dopo separazione degli altri componenti del campione; le reazioni possono essere chimiche, enzimatiche o immunochimiche, le separazioni si classificano in elettroforesi e cromatografia.

-analisi diretta→ si considera l'analita, quindi si rilevano e quantificano gli analiti di interesse biochimico clinico senza una separazione o una reazione chimica/biochimica; si diversificano metodi elettrochimici, es calcolo pH, e la fotometria atomica.

La differenza principale è che nel caso dell'analisi diretta si vede subito l'analita, mentre in quella indiretta sono necessarie delle reazioni (spesso più di una); in entrambi i casi comunque alla fine si vanno a vedere le onde elettromagnetiche (sinonimo di energia radiante), misurate attraverso il luminometro, metodi fotometrici (es analisi urine-indiretta), immunochimici con reattivi marcati, metodi non specifici di colorazione degli acidi nucleici (analisi del DNA-onde elettromagnetiche fluorescenti alla luce UV). NB: applicazione delle onde elettromagnetiche in tutti i tipi di analisi di laboratorio.

L'onda elettromagnetica è una radiazione le cui caratteristiche più importanti da considerare in laboratorio sono: -lunghezza d'onda λ → distanza tra due picchi (fra un punto in un ciclo e lo stesso nel ciclo successivo), a seconda della lunghezza d'onda si hanno diversi colori. Ci sono delle specifiche lunghezze d'onda che la retina riesce a convertire in impulso nervoso (spettro visibile), in particolare vanno da 350 a 800nm, ognuno con diverso colore. In laboratorio biochimico si usano principalmente le misurazioni visibili e gli UV (200-300nm, usati per vedere il DNA). Altri tipi di lunghezze d'onda comprendono raggi X, γ , infrarossi.



-intensità → energia che passa attraverso un'area unitaria nell'unità di tempo; legata alla quantità della sostanza presente-quante onde ci sono, colore più o meno intenso. Si misura in watt/m² ed è proporzionale al quadrato dell'ampiezza. In sostanza l'intensità è la quantità di onde elettromagnetiche (dipende da quantità e spessore).

Misurando la lunghezza d'onda delle radiazioni è possibile fare una analisi qualitativa; con l'intensità si fa una analisi quantitativa.

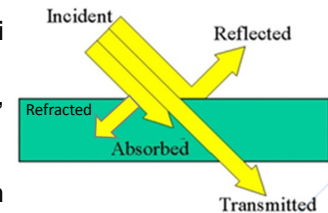
Dopo la reazione nella provetta le onde elettromagnetiche possono essere:

-assorbite o trasmesse → la metodica è fotometria e spettrofotometria di assorbimento;

-rifratte o difratte → onde deviate, cambia la rifrazione, metodi turbidimetria, nefelometria o rifrattometria;

-riflesse → spettroscopia di riflettanza;

-prodotte → fluorimetria, luminometria, spettroscopia di emissione atomica, non si considera il colore già presente, ma quello che viene prodotto.



Radiazioni assorbite: l'assorbanza misura le onde elettromagnetiche assorbite dalla sostanza, intensità delle onde elettromagnetiche trattenute dalla cuvetta; gli strumenti utilizzati per misurarla sono colorimetro (misura le onde visibili) e spettrofotometro (misura le onde visibili e non), c'è una sorgente di energia, un selettore di lunghezza d'onda e un rivelatore di onde elettromagnetiche. Per la misurazione dei raggi UV bisogna tenere conto che il vetro ferma questi raggi, quindi le provette devono essere di quarzo.

Una specifica onda elettromagnetica viene fermata da una certa sostanza in base alla sua struttura chimica; ogni sostanza ha uno specifico spettro di assorbimento, cioè un'onda elettromagnetica colpisce una sostanza e si ferma in essa solo se la sua lunghezza d'onda è in grado di andare a interferire con la costituzione elettronica della sostanza, l'energia è uguale a quella che fa saltare un elettrone da un livello inferiore a uno superiore. Un protone o un elettrone ha una sola lunghezza d'onda che viene assorbita, ma una molecola più complessa assorbe diverse lunghezze d'onda in relazione alla sua composizione e visto che ogni molecola è diversa, anche le onde elettromagnetiche assorbite sono diverse. Le molecole in realtà non hanno la capacità di assorbire le onde elettromagnetiche, ma hanno spettri di assorbimento diversi. Lo spettro di assorbimento è un grafico caratteristico di ogni sostanza fotoassorbente (es bilirubina ha uno spettro che assorbe tra 400-500nm) che rappresenta quanto viene assorbito, quindi le onde elettromagnetiche trattenute, rispetto alla lunghezza d'onda; gli atomi hanno spettri a righe-assorbono a valori specifici, le molecole hanno spettri continui, le differenze tra gli spettri di molecole dipendono dalla loro composizione (es colore carne deriva dallo stato chimico delle molecole di mioglobina). Negli spettri a righe a seconda della geometria dell'atomo viene prodotta una linea di assorbimento (estremamente atomo-specifica), usata per identificare la composizione chimica dei mezzi che la luce può attraversare, es Ca 442,7nm.

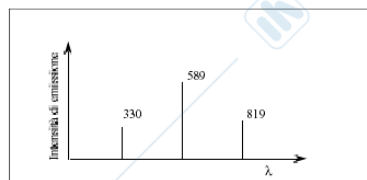
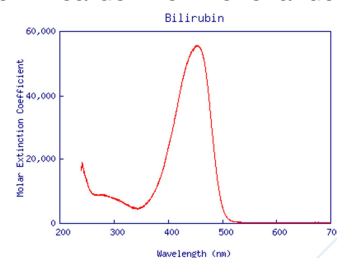


Figura 17. Rappresentazione schematica dello spettro del sodio.



L'assorbanza (ABS) è una trasformazione matematica della trasmittanza (T). La trasmittanza è il rapporto tra l'intensità delle onde elettromagnetiche trasmesse e quelle che sono passate, intensità a una specifica lunghezza d'onda, $T = I/I_0$, normalmente viene messa in % ($T\% = T \times 100$), è priva di unità di misura e può avere valori tra 0 e 1 (in % da 0 a 100 → 0% non è passato niente, 100% è passato tutto). L'assorbanza di una soluzione è il logaritmo decimale del reciproco della trasmittanza $ABS = \log(1/T) = \log(100/T\%) = 2 -$

$\log(T\%)$, ha valori che possono andare da 0 a 2. Se ho 0% di onde assorbite, $T\% = 100$, $ABS = 0$; se 99% è assorbita, $T\% = 1$, $ABS = 2$. Esercizio: $T=1\%$ $ABS=\log(100/1)=2$, $T\%=0,1$ $ABS=\log(100/0,1)=3$.

La trasmittanza (T) all'aumentare della concentrazione diminuisce (inversamente proporzionale), la funzione della concentrazione è esponenziale, quindi T diminuisce in modo iperbolico. L'assorbanza all'aumentare della concentrazione aumenta, la funzione della concentrazione è una sigmoide con una regione lineare, quindi il vantaggio è che vedo dove al variare della concentrazione l'assorbanza aumenta o diminuisce (molto meglio usare ABS che T) e trovo il range di linearità del dosaggio (nel range valore varia in modo lineare).

Trasmittanza e assorbanza non dipendono soltanto dalla concentrazione dell'analita, ma anche da intensità della luce incidente, lunghezza d'onda della luce incidente, spessore attraversato, natura chimica della sostanza assorbente, concentrazione del soluto.

Onde rifratte: la rifrattometria si basa sull'indice di rifrazione, cioè la variazione subita dalla radiazione luminosa quando attraversa un mezzo più o meno trasparente. In veterinaria questo metodo viene utilizzato per valutare indirettamente la presenza di proteine e il peso specifico delle urine (maggiore rifrattarietà indica maggiore presenza di proteine e peso specifico). Lo strumento usato è il rifrattometro che usa le onde elettromagnetiche, misura l'angolo di rifrazione in un liquido, può essere dotato di una sorgente luminosa e di un sensore che verifica l'angolo deviato dell'onda. L'angolo di rifrazione è maggiore all'aumentare della concentrazione delle sostanze presenti, dà solo un'indicazione generale sulla presenza di esse, non dice quali sono e quante.

Altri metodi di tipo indiretto per misurare le onde rifratte sono torbidimetria e nefelometria, che misurano il risultato di reazioni chimiche, biochimiche e immunochimiche che producono precipitati in soluzione non trasparenti alle onde elettromagnetiche, in particolare si formano delle particelle insolubili che producono un insieme di fenomeni di onde elettromagnetiche (assorbimento, riflessione e diffrazione). È come se si usasse uno spettrometro che, al posto di misurare le onde elettromagnetiche assorbite, misura le onde rifratte. La turbidimetria misura precipitati in soluzione con particelle di diametro superiore al micrometro, quando l'assorbimento prevale sulla diffrazione; la nefelometria misura precipitati in soluzione con particelle di dimensione del nanometro, quando prevale l'effetto della diffrazione.

Onde riflesse: sono le onde elettromagnetiche che tornano indietro, sono sempre nel visibile e sono tutte reazioni che avvengono su un supporto solido. Si può misurare l'intensità del colore visivamente confrontandola con una scala cromatica o con il riflettometro, che quantifica numericamente l'intensità del colore della luce riflessa.

Onde prodotte: ci sono tre tipi di onde prodotte, in tutti i casi si ha un'eccitazione: quando un atomo è sottoposto ad una sollecitazione energetica vi è il salto di un suo elettrone da un livello energetico inferiore a quello superiore. Ogni sostanza è in grado di emettere onde elettromagnetiche e le stesse lunghezze d'onda sono in grado di assorbirle; principio di Kirckoff: la λ della radiazione elettromagnetica che un atomo emette quando viene eccitato è la stessa che è in grado di assorbire.

Le molecole possono essere eccitate in tre modi: -calore→ spettroscopia di emissione atomica misura le onde elettromagnetiche emesse a specifiche lunghezze d'onda da molecole eccitate con il calore e consente di individuare gli atomi che hanno generato tali radiazioni (analisi qualitativa) e la concentrazione (analisi quantitativa)-usata per quantificare Na e K;

-radiazioni elettromagnetiche→ fluorimetria misura le radiazioni elettromagnetiche emesse da molecole eccitate con una radiazione elettromagnetica-usata in reazioni immunochimiche nel dosaggio di anticorpi o antigeni e per analisi e dosaggi di acidi nucleici. Una molecola fluorescente assorbe una radiazione ad una certa lunghezza d'onda (luce eccitante) e ne emette una di lunghezza d'onda superiore (luce fluorescente);

-reazioni chimiche/biochimiche→ luminometria prevede l'eccitazione degli elettroni di molecole attraverso reazioni chimiche o biochimiche e misura l'emissione di radiazioni elettromagnetiche.

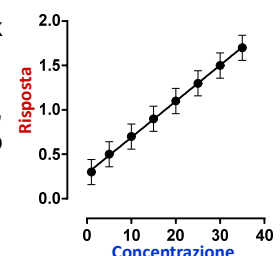
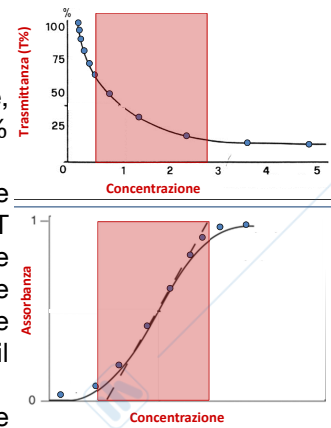
Nel caso di emissione naturale si parla di radiometria.

L'unità internazionale dell'intensità del flusso luminoso è la candela (cd), ma il risultato della lettura strumentale dell'energia radiante è espresso con unità relative, come trasmittanza (%) e assorbanza (ABS), unità di fluorescenza ecc.

Per risalire dalla lettura strumentale alla concentrazione dell'analita nel campione si confronta il valore trovato con quello di un campione standard, quindi **concentrazione standard : concentrazione campione = lettura dello standard : lettura campione**. Es: concentrazione μM campione?

Campione ABS 0,32, concentrazione standard $80\mu M$, standard ABS 0,54. $x=(0,32 \times 80)/0,54=47,4\mu M$.

Se ci sono diversi standard a concentrazioni diverse, si fa la curva di calibrazione, quindi si ha come risultato finale diversi campioni a concentrazione crescente. Se ho



diverse provette standard di cui conosco la concentrazione e la assorbanza, si crea il grafico e si crea una curva dose-risposta e se questa è lineare, si può effettuare una regressione lineare e usare l'equazione di una retta di regressione per risalire alla concentrazione del campione ($y=bx+a$, dove y è la risposta e x la dose, a intercetta, b pendenza; $x=(y-a)/b$). Es: ABS 1,18, serie di campioni a diverse concentrazioni. Concentrazione mg/mL? $y=bx+a$ $1,18=0,04x+0,28$ $x=22,5\text{mg/mL}$.

La retta di regressione ha l'equazione e R^2 , il quale indica quanto la retta passa vicino ai punti. Man mano che i punti si discostano R^2 diminuisce, mentre se R^2 ha valore 1 la retta passa per i punti (in laboratorio deve avere questo valore). Quindi per capire come impostare la retta di regressione si devono scegliere i punti con un supporto grafico (non si discostano tanto dalla retta), ma anche numerico vedendo R^2 .

Un grafico generico dose-risposta o concentrazione-segnale presenta: -LOL→ limite di linearità, ovvero quando il grafico inizia a piegarsi, è la concentrazione massima che si può fare con quel test (limite superiore), es glicemia 280mg/dl;

-LOQ→ limite di quantificazione, cioè valore minimo considerato nella retta (parte lineare);

-LOD→ limite di determinabilità, rappresenta l'ultima concentrazione che dà uno spostamento appena inizia a salire la retta; cambiando dose cambia la risposta, ma non so determinare la quantità (metodo con limite di determinabilità alto determina poco).

La sensibilità del metodo indica quanto si sposta la risposta in base alla concentrazione; più è pendente la retta, più è sensibile il metodo. NB: sensibilità \neq limite di determinabilità.

Esiste un sistema per risalire alla concentrazione dalla assorbanza (solo per ABS! per le altre unità di misura si deve avere sempre uno standard): si usa il *coefficiente di estinzione molare* (ξ), ovvero uno standard fisso relativo a quella sostanza e a una specifica lunghezza d'onda (legge di Lambert-Beer). Il coefficiente di estinzione molare dice l'assorbanza che ha quella sostanza pura a concentrazione 1M e a una specifica lunghezza d'onda in una soluzione per un cammino ottico unitario (1cm); è calcolato sperimentalmente, es la tirosina ha coefficiente di estinzione molare 1405, $\text{NADH}+\text{H}^+$ $6,3 \times 10^3$ (a λ 340nm). In realtà 1M è una concentrazione altissima, si ricava un numero sperimentale a concentrazioni elevatissime.

Legge di Lambert-Beer: $\text{ABS} = \xi b c$, $c = \text{ABS}/\xi b$, dove ξ coefficiente di estinzione molare (1M), c concentrazione, b cammino ottico (1cm). L'unità di misura di ξ è $\text{l/mole (M}^{-1} \text{cm}^{-1})$, $\xi = \text{ABS}/ [\text{C(moli/L)} \times b(\text{cm})]$.

Se voglio determinare il lattato, si prende il sangue, si fa una reazione con la lattico deidrogenasi e se c'è del lattato viene trasformato in piruvato e per ogni molecola di lattato se ne forma una di $\text{NADH}+\text{H}^+$ (reazione: $\text{lattato}+\text{NAD}^+ \rightarrow \text{piruvato}+\text{NADH}+\text{H}^+$); quindi avendo ABS a 340nm di $\text{NADH}+\text{H}^+$ si divide per ξ e si trova la concentrazione. Il NAD^+ (ossidato) ha uno spettro di assorbimento con un picco a 260nm e poi scende, mentre il $\text{NADH}+\text{H}^+$ assorbe a 260nm, ma ha anche un picco di assorbanza a 340nm. Il NAD da ossidato a ridotto cambia, quindi solo misurando a 340nm si può misurare l'accumulo di lattato.

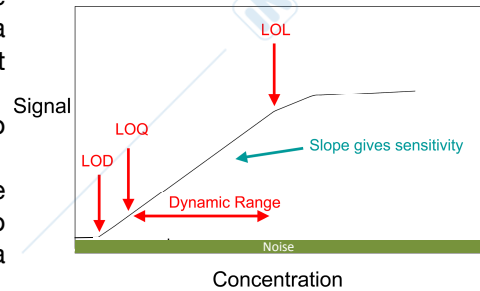
Per calcolare il coefficiente di estinzione molare si deve sapere la molarità di una sostanza e quindi il peso molecolare. Spesso in laboratorio le molecole non hanno un peso molecolare omogeneo, es proteine e acidi nucleici, ma si usa una approssimazione della concentrazione, ovvero si usano dei coefficienti di conversione. Si sceglie una lunghezza d'onda che so che assorbe es tutte le proteine e uso dei fattori di conversione. ABS a 280nm di una miscela di *proteine*, si moltiplica $\times 1,55$ e si ottengono le proteine in mg/mL ; ABS a 260nm per sapere il DNA si moltiplica $\times 50$ e si ottiene in $\mu\text{g/mL}$; RNA come il DNA ma si moltiplica $\times 40$. Per sapere la concentrazione delle proteine nel campione di acido nucleico si fa il rapporto $\text{ABS } 260/\text{ABS } 280$ e quindi si ha l'indice di contaminazione da proteine, deve essere $>1,8$.

Es: lettura a 260nm 0,573 ABS, coefficiente di conversione 50, concentrazione DNA= $0,573 \times 50 = 28,65\mu\text{g/mL}$.

Metodi biochimici in laboratorio: esistono metodi di: -analisi indiretta→ si quantificano gli analiti dopo reazioni (chimiche, enzimatiche, immunochimiche) e/o dopo separazione (elettroforesi, cromatografia) del campione;

-analisi diretta→ fotometria atomica, metodi elettrochimici.

Metodi di chimica clinica: sono metodi indiretti che dipendono dall'interazione di una sostanza chimica e l'analita di interesse. La reazione chimica può essere una sola o una sequenza. Gli analiti che usano reazioni di tipo chimico sono: bilirubina, urobilinogeno, creatinina, proteine totali (ruolo in diagnostica clinica e anche in applicazioni in analisi di alimenti), emoglobina, corpi chetonici, ioni di interesse biochimico clinico (K, Na, Mg, P, Fe, Zn, Ca). La creatinina e i corpi chetonici possono essere misurati anche con metodi enzimatici; gli ioni di interesse biochimico clinico possono essere misurati anche con metodi di spettroscopia di assorbimento e/o di emissione atomica e con metodi elettrochimici. I sistemi enzimatici rispetto ai chimici hanno una migliore specificità, riesco a determinare concentrazioni più basse, sono più precisi.



Le informazioni sull'analita o di un suo prodotto di reazione sono ottenute misurando le radiazioni elettromagnetiche; i metodi chimici usano le onde assorbite e riflesse.

Bilirubina: può essere diretta o indiretta, totale o coniugata, è un metabolita del gruppo eme, viene eliminata o con la bile o le urine, non è solubile e il fegato ha un ruolo importante per il metabolismo del gruppo eme, perché lo rende solubile. Quindi il gruppo eme degradato a bilirubina viene rilasciato nel sangue, però non è solubile, allora si lega all'albumina per essere trasportato (*bilirubina indiretta*), arriva al fegato dove diventa glucuronide della bilirubina (*bilirubina diretta*) ed è solubile. Si tratta di un meccanismo di detossificazione: si aggiunge un glucosio e si forma l'acido glucuronico, che è molto reattivo e si lega a delle sostanze dell'organismo, in particolare viene coniugato alla bilirubina, che in questo modo diventa solubile (bilirubina diretta) e può essere eliminata. La bilirubina diretta può passare nella bile e andare nell'intestino o nel sangue e arrivare al rene.

A seconda di che bilirubina aumenta (diretta/indiretta), ci sono delle diagnostiche diverse, ad esempio nell'ittero emolitico si ha un aumento della bilirubina indiretta, nell'ittero ostruttivo si ha aumento della bilirubina diretta, nell'ittero epatocellulare aumentano entrambe. La distinzione della bilirubina diretta ed indiretta è dovuta al fatto che i metodi di dosaggio la misurano in modo diretto o indiretto. Si tratta di un metodo chimico in cui viene usato il *reattivo di Ehrlich*, il quale si lega con la bilirubina e si forma un composto (azocomposto) che assorbe a 600nm e diventa verde-azzurro a pH alcalino se si lega alla bilirubina. Il reattivo di Ehrlich riesce a distinguere i due tipi di bilirubina, ma non è in grado di riconoscerla se è legata alle proteine, quindi se si fa il dosaggio del sangue come tale si vede solo la bilirubina glucuronata (bilirubina diretta reagisce direttamente con il reattivo di Ehrlich). Per misurare la bilirubina indiretta, la quale è legata all'albumina, si deve fare un trattamento del sangue con alcol metilico, dimetilsolfossido o acetato di Na-caffaina per scindere il legame con le proteine. La bilirubina totale è la somma di bilirubina indiretta e diretta, la coniugata è solo quella diretta.

Creatinina: è un prodotto di degradazione di creatina e creatina fosfato nel muscolo, è prodotta in quantità costante in funzione della massa muscolare. La concentrazione del sangue della creatinina dipende da quanto viene filtrata dal rene, quindi è un parametro del funzionamento del rene. La sua concentrazione aumenta quando il rene è già in grave insufficienza renale. La GRF è un indice di filtrazione glomerulare in base alla concentrazione della creatinina nel plasma, dipende dalla concentrazione creatinina e dal peso dell'animale.

Per misurare la concentrazione di creatinina nel sangue si usa il *metodo di Jaffe*: in presenza della creatinina a pH alcalino diventa arancione-rosso, la cui intensità è misurata a 505nm. Quindi si trova il valore di ABS e si confronta con lo standard per trovare la concentrazione. Alcuni componenti del plasma interferiscono con il metodo di Jaffe, ad esempio proteine, glucosio, alcuni acidi.

La creatinina può essere dosata anche con sistemi enzimatici.

Proteine: si dosano solo con sistemi chimici. Inizialmente si fa l'analisi delle proteine totali, poi per sapere quali proteine sono aumentate o diminuite si fa un'altra analisi con l'elettroforesi. Le proteine totali si dosano in sangue, urine, latte e in generale fluidi biologici; le principali cause di alterazione della concentrazione delle proteine nel plasma sono variazioni del volume del plasma (disidratazione) o aumento/diminuzione di alcune proteine plasmatiche. NB: la presenza di proteine nelle urine è indice di alterazioni della filtrazione glomerulare.

Le proteine pure si possono dosare in modo diretto, se si moltiplica ABS x 1,55, invece in sostanze biologiche si fanno delle reazioni chimiche.

Ci sono molti metodi per dosare le proteine: -metodo BCA→ limite di rilevabilità (range in cui si determinano le proteine) 20 μ m-2mg /mL, assorbimento a 540nm;

-metodo di Lowry→ limite di rilevabilità 10-500 μ m/mL, essendo un limite più ristretto è più sensibile, ABS 500-750nm;

-metodo di Bradford→ limite di rilevabilità 2-20 μ m/mL, ABS massima a 470nm.

I metodi BCA e Lowry si basano sulla reazione del biureto: è una reazione che coinvolge una ossidazione dello ione Cu, in cui lo ione rameico si riduce a rameoso interagendo con il legame peptidico delle proteine.

Tra i vari metodi, oltre a variare il limite di rilevabilità, cambia anche la lunghezza d'onda di assorbimento. Quindi le proteine possono essere dosate in soluzione, ma esistono anche sistemi di interazioni chimiche.

Ioni: con i metodi chimici si possono dosare anche gli ioni Ca, Mg, Zn, P, Fe, P inorganici, Na.

Emoglobina: il colore del sangue deriva dallo stato chimico delle molecole di Hb; cambiamenti a livello di struttura molecolare si riflettono in un cambiamento dello spettro di assorbimento. Ci sono sistemi diretti che indicano la quantità di Hb ossigenata e Hb non ossigenata, che si basano su meccanismi di assorbimento specifici con l'uso di saturimetri.

Il saturimetro (detto anche pulsiossimetro od ossimetro) è un dispositivo non invasivo con il quale è possibile conoscere la saturazione dell'ossigeno nel sangue, rispetto alla quantità di emoglobina totale

presente nel sangue. La sonda è composta da due diodi che generano onde elettromagnetiche nei campi del rosso (circa 660 nm) e dell'infrarosso (circa 940 nm) e da una fotocellula che misura l'intensità dei fasci dopo che hanno attraversato la cute e la circolazione del paziente. Quindi, il saturimetro fa un'analisi differenziale dello stato di ossigenazione di Hb andando a misurare le lunghezze d'onda specifiche, che sono diverse tra emoglobina e desossiemoglobina (a 660nm Hb assorbe più di HbO₂, viceversa a 940nm).

Esistono strumenti ancora più evoluti che permettono di distinguere tra emoglobina, ossiemoglobina, carbossiemoglobina, metaemoglobina e emoglobina ridotta, usando 6 diverse lunghezze d'onda.

Metodi enzimatici: vengono usati per il dosaggio di: -analiti→ si aggiunge un enzima al campione da analizzare, questo tra tutti i metaboliti presenti trasforma solo il suo substrato, es glucosio, lattato, creatinina, chetoni;

-enzimi→ si aggiunge un substrato al campione da analizzare, se l'enzima è presente, il substrato si trasforma nello specifico prodotto, es lipasi, CK.

Gli **analiti** quantificabili con metodi indiretti dopo reazione chimica sono: glucosio, fosfati, creatinina, colesterolo, trigliceridi, urea, acido urico, acido lattico, corpi chetonici.

Sono tutte e due reazioni enzimatiche, molto specifiche, possono essere singole o una sequenza. La differenza è che il metodo enzimatico per il dosaggio degli analiti è a termine (si aspetta che la reazione finisca), mentre per il dosaggio di enzimi si misura quando la reazione si sta ancora svolgendo.

Per dosare metaboliti con metodi enzimatici si misura quanto prodotto/substrato/coenzima è presente alla fine della reazione quando si è esaurito tutto il substrato (metodo a termine). La velocità con cui un enzima converte il substrato in prodotto dipende da pH, temperatura, cofattori, concentrazione di substrato ed enzima; in questo caso non si misura la velocità della reazione, ma si aspetta che la reazione termini.

La registrazione all'equilibrio della variazione complessiva del parametro è misurata quando tutto il substrato è stato convertito in prodotto; quindi i parametri che influiscono sulla velocità della reazione si devono controllare, ma in modo abbastanza grossolano, devono essere sufficienti per permettere alla reazione di finire.

Si ottiene la concentrazione dell'analita che è direttamente proporzionale a ciò che si misura nella provetta; la concentrazione del prodotto finale dipende dalla concentrazione dell'analita.

I metodi a termine sono caratterizzati da tempi brevi, quindi la quantità di enzima aggiunto è tale da garantire una cinetica di primo ordine e tale da portare a termine la reazione (99% substrato consumato) in 2-3 min; inoltre i parametri come pH, cofattori e coenzimi si devono controllare solo per far andare a termine la reazione e non è così importante che la reazione avvenga a una temperatura controllata perfettamente (non misuro l'attività enzimatica), ma anche in questo caso a una temperatura che nei tempi previsti porti comunque a termine la reazione.

Alla fine della reazione si guarda il colore; la concentrazione dell'analita si trasforma in ABS, fluorescenza, luminescenza ecc (a seconda della misura che si vuole usare) e poi si confronta con uno standard.

Nei dosaggi enzimatici ci possono essere: -misure di substrati/prodotti per i quali non è possibile usare il coefficienti di estinzione molare, quindi si deve confrontare il risultato con uno standard (metodo usato anche per i metodi chimici). Nel caso di uno standard solo si fa la proporzione concentrazione campione : concentrazione standard = lettura campione : lettura standard. Se ci sono più standard, si usa la retta standard.

-misure di substrati/prodotti/coenzimi per i quali è possibile usare metodi basati sull'energia radiante assorbita e il coefficiente di estinzione molare. Si conosce, quindi, il coefficiente di estinzione molare ξ di uno dei reattivi della reazione enzimatica e si può trovare la concentrazione sfruttando questo dato, è il caso del NAD ossidato e ridotto. Ad esempio Lattato+NAD⁺→piruvato+NADH+H⁺ ossidazione (perdita di e⁻) del lattato e riduzione del NAD catalizzata dall'enzima LDH, quindi si ottiene l'ABS del NADH+H⁺ grazie al suo spettro di assorbimento (340nm-NAD⁺ è trasparente a questa lunghezza d'onda) e si può vedere quanto se ne è formato; per ogni molecola di lattato si forma una molecola di NAD ridotto.

Per risalire alla concentrazione si può prendere l'ABS e porla come uno standard o usarla nella legge di Lambert-Beer ($C=ABS/\xi b$). Si può usare anche $C=\Delta ABS/\xi d \times Vt/Vc \cdot n$ dove ΔABS è la variazione di ABS iniziale e finale, ξ coefficiente di estinzione molare, d spessore della cuvetta (1cm), Vt volume della miscela di reazione, Vc volume del campione, n stechiometria della reazione (di solito ha valore 1).

I test enzimatici possono avvenire con una sola reazione, ma spesso prevedono anche reazioni secondarie; nel caso in cui la prima reazione non sia quantificabile direttamente si deve accoppiare una seconda reazione. Gli enzimi usati nelle reazioni accoppiate sono essenzialmente: -perossidasi→ ha come substrato H₂O₂, che può derivare dalla respirazione cellulare. Il mitocondrio attraverso la perossidasi riduce H₂O₂ a H₂O e O₂ (H₂O₂ + donatore e⁻ ridotto→2H₂O + donatore e⁻ ossidato + O₂). Tutto il metabolismo ossidativo dà origine ad acqua (prodotto di scarto). Nella provetta si mette una sostanza in grado di cedere elettroni e caratterizzata anche da un cambiamento di colore quando viene ossidata, ad esempio ABTS, OPD, reattivo di Trinder. Quindi nella provetta si ha H₂O₂, perossidasi e una sostanza che cambia colore quando si ossida, es ABTS diventa verde, OPD arancio, reattivo di Trinder rosso.

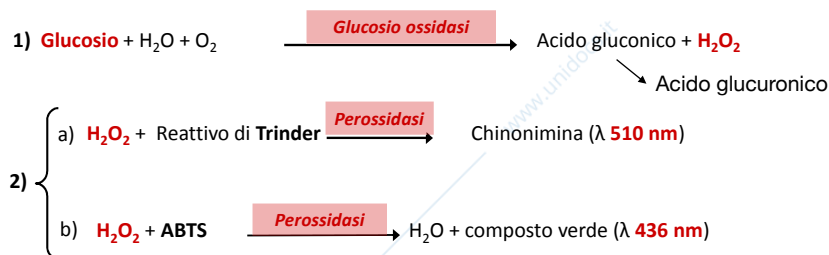
La perossidasi è molto usata anche perché esiste un donatore di e^- che quando si ossida diventa luminescente, ovvero il luminolo. Il luminolo insieme a H_2O_2 e perossidasi perde e^- e diventa luminescente.

-deidrogenasi→ la reazione enzimatica primaria che coinvolge l'analita di interesse biochimico clinico può produrre un prodotto che è substrato per una deidrogenasi NAD dipendente. Con la deidrogenasi $NAD^+/NADH+H^+$ dipendenti a lettura ABS λ 340nm NAD^+ non assorbe, $NADH+H^+$ assorbe. I due enzimi che si utilizzano come deidrogenasi NAD dipendenti nelle reazioni secondarie sono glucosio 6 P deidrogenasi e glutammato deidrogenasi. Il vantaggio della deidrogenasi NAD dipendente è che si può risalire alla concentrazione dell'analita senza dover usare uno standard.

Nei dosaggi enzimatici non è detto che il primo prodotto sia visibile, quindi si aggiunge molto spesso una seconda reazione con perossidasi o deidrogenasi NAD dipendente.

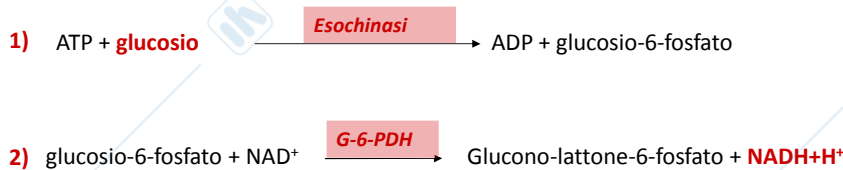
Dosaggio del glucosio con metodi enzimatici: può essere misurato in diversi modi, ma sono comunque sistemi enzimatici e alla base c'è un enzima con un suo substrato, quello che cambia è la seconda reazione accoppiata: nel metodo colorimetrico la reazione accoppiata può prevedere glucosio ossidasi o perossidasi; nel metodo UV esochinasi e glucosio 6 P deidrogenasi; nei metodi su cartine e strip e biosensori glucosio ossidasi; nei metodi in luminescenza luciferasi.

Metodo colorimetrico: si prende il glucosio e si fa una prima reazione in modo che si produca H_2O_2 , in modo tale che nella reazione accoppiata si possa usare la perossidasi.



La quantità di glucosio nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di prodotti ossidati colorati che si formano. L'aumento di assorbanza misurato viene confrontato con quello di uno standard.

Metodo UV: in questo caso non si ha uno spettro visibile. Si fanno sempre due reazioni:



ASSAY PROCEDURE:	
Wavelength:	Hg 365nm, Hg 334nm, 340 nm
Temperature:	25° or 37° C
Reaction mixture:	The reagent 1 is to be mixed with reagent 2 in the ratio of 1+5.
Pipette into cuvettes:	
Reaction mixture	1000 μ l
Sample	10 μ l
Mix and after 10 min. at 25°C or 5 min. at 37°C measure absorbance of Sample A_{340nm} against absorbance of Reagent Blank A_{340} .	
A_{340} is ascertained once per series.	

Lettura inizio a λ 340nm = 0.05 ABS

Lettura fine a λ 340nm = 0.23 ABS

ϵ $NADH+H^+$ a λ 340nm = $6.3 \times 10^3 M$

Campione 10 μ L

Volume reattivi 1000 μ L

$$\text{Concentrazione (mM)} = \frac{\Delta A}{\epsilon d} \times \frac{V_t}{V_c n}$$

$$\text{Concentrazione} = \frac{0.18}{6.3 \times 10^3 M} \times \frac{1010}{10} = 0.00288 M = 2.88 \text{ mM}$$

La quantità di glucosio nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di $NADH+H^+$ che si forma; per trovare la concentrazione si prende ABS a 340nm e la si divide per il coefficiente di estinzione molare ($C = \Delta ABS / \epsilon d \times V_t / V_c n$).

Metodo in luminescenza: si usa la perossidasi sia nella prima che nella seconda reazione e non si va a vedere il colore, ma l'emissione delle onde elettromagnetiche.

Metodo su cartine e strip: possono essere usate glucosio ossidasi, H_2O_2 e O-toluidina e con la O-toluidina ossidata si ottiene una sostanza blu-verde (base di Schiff) con varie tonalità di colore, oppure glucosio ossidasi, H_2O_2 e ioduro di potassio e si sviluppano varie tonalità di blu.

Biosensori: è uno strumento che trasforma i segnali chimici in segnali elettrici. Quindi i metodi elettrochimici trasformano un segnale chimico in elettrico, usando una reazione enzimatica. Nel caso del glucosio viene usata la glucosio ossidasi:

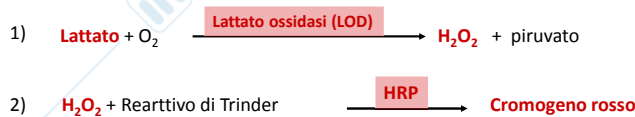


Nel biosensore il primo passaggio non viene visto attraverso un cambiamento di colore, ma ad esempio si va a vedere il consumo di ossigeno o quanta H_2O_2 si produce o l'abbassamento del pH con l'acido glucuronico e questo sempre con metodi elettrochimici.

Dosaggio dell'acido lattico con metodi enzimatici: si usano metodi UV o colorimetrico. Nel metodo UV si ha un'unica reazione:



Nel metodo colorimetrico due:



Dosaggio dell'urea con metodi enzimatici: anche in questo caso si usano UV e colorimetro. Il primo enzima in entrambi i casi è l'ureasi, mentre nella reazione accoppiata per il metodo UV si usa la glutammato deidrogenasi, per il colorimetrico la nitroprusside.

Dosaggio della creatinina con metodi enzimatici: non si aggiunge il reattivo di Jaffe, ma la creatinasi, enzima in grado di convertire la creatinina in creatina. Poi dalla creatina si fanno una serie di reazioni e si ottiene un colore più o meno intenso.

Dosaggio dei corpi chetonici con metodi enzimatici: si usa il test su strip con un enzima specifico per i corpi chetonici (HBDH) nella prima reazione e poi l'ossidoreduttasi nella seconda reazione.

Dosaggio del colesterolo con metodi enzimatici: nella prima reazione si usa la colesterolo esterasi e dopo una cascata di reazioni l'ultima coinvolge la perossidasi e si ottiene un colore rosso.

Dosaggio dei trigliceridi con metodi enzimatici: il primo enzima specifico dei lipidi è la lipasi, l'ultima reazione coinvolge la perossidasi.

Dosaggio dell'acido urico con metodi enzimatici: il primo enzima è specifico, l'ultimo sempre perossidasi.

Dosaggio dei fosfati con metodi enzimatici: si usano metodi UV o colorimetrico. Nel test UV si usa la fosforilasi e la G6PDH e si ottiene $\text{NADPH} + \text{H}^+$. Nel test colorimetrico prima si usano enzimi specifici e nell'ultima reazione la perossidasi.

Quindi spesso i primi enzimi sono sempre specifici, mentre quelli dell'ultima reazione coinvolgono la perossidasi o la deidrogenasi NAD dipendente.

Nei metodi enzimatici per il dosaggio degli **enzimi** si sfrutta l'entità biologica di questi ultimi. Gli enzimi sono proteine che devono stare all'interno delle cellule e l'aumento della concentrazione di alcuni enzimi nei liquidi biologici può essere indice di danno cellulare, sono marcatori molto precisi. I meccanismi responsabili di un aumento degli enzimi nel plasma possono essere: danno o necrosi cellulare, aumento del turnover cellulare, induzione enzimatica in cui aumenta la sintesi proteica dell'enzima, ostruzione dei dotti escretori di ghiandole esocrine.

Ci sono alcuni enzimi che possono essere usati per dosare i metaboliti del sangue, ma possono essere anche dosati, ad esempio la lattico deidrogenasi è coinvolta nella glicolisi anaerobia e l'aumento della sua concentrazione nel sangue può essere indice di una patologia. La lattico deidrogenasi ha concentrazioni diverse nei vari tessuti, perché la glicolisi anaerobia deve essere attivata in muscolo, cuore, cervello e fegato a concentrazioni di glucosio e ossigeno diverse, quindi ci sono enzimi diversi nei diversi tessuti (isoenzimi=proteine/enzimi con stessa funzione, ma sequenze di aa leggermente diverse).

Gli enzimi hanno nomi propri, esiste una classificazione internazionale che permette di sapere che enzima mi interessa, cioè ci sono dei codici associati a sigle precise. Gli enzimi possono essere classificati in grosse categorie a seconda di che reazione viene catalizzata, ci sono 6 classi: -ossidoreduttasi→ fanno ossidoriduzioni;

- transferasi→ trasferiscono gruppi;
- idrolasi→ idrolizzano un substrato;
- liasi→ rimozione o addizione di un gruppo a un substrato;
- isomerasi→ fanno isomerizzazione;
- ligasi→ formazione di nuovi legami.

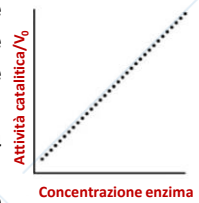
In biochimica clinica interessano particolarmente 3 classi: -ossidoreduttasi→ LDH (lattico deidrogenasi), HBDH (α e β idrossibutirrato deidrogenasi);

- transferasi→ ALT (alanina), AST (aspartato), CK (creatinchinasi);
- idrolasi→ LIP (lipasi), ALP (fosfatasi alcalina), AMY (amilasi), ChE (colinesterasi).

La particolarità del dosaggio degli enzimi è una proteina presente nel sangue che non dovrebbe esserci. Ci sono tanti metodi per misurare gli enzimi nel sangue, il più comune è il metodo immunochimico (ELISA), che prevede l'uso di anticorpi, oppure non si va a vedere la proteina, ma si sfrutta la sua attività (es LDH si va a vedere quanto lattato si forma).

Gli enzimi sono proteine (eccezione rRNA) che agiscono come biocatalizzatori e accelerano la velocità di reazione (quantità di substrato convertita in prodotto nell'unità di tempo), senza modificarne la costante di equilibrio, ad esempio l'anidasi carbonica velocizza la reazione di 10^7 , l'ureasi 10^{14} .

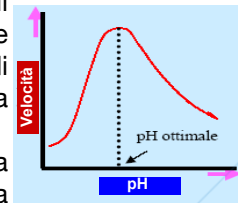
Lo scopo di un dosaggio enzimatico in biochimica clinica è sapere se nel campione biologico è presente l'enzima e se è variata la sua concentrazione. Il dosaggio enzimatico è l'unico caso delle analisi del sangue in cui non si ha una concentrazione, ma si hanno delle unità in cui si esprime la velocità della reazione, quindi si misura l'attività catalitica. All'aumentare della concentrazione dell'enzima, aumenta la sua attività catalitica. L'attività catalitica (velocità della reazione) dipende da: concentrazione dell'enzima, temperatura, pH, concentrazione ionica e quantità di substrato. Tutte queste variabili devono essere controllate per dosare gli enzimi presenti.



Temperatura: la velocità con cui un enzima è in grado di convertire il substrato in prodotto è esponenziale, quindi piccole variazioni di temperatura cambiano di molto la velocità. Si deve controllare che la temperatura rimanga tale durante tutta la reazione e se si fa un confronto con un altro campione, la temperatura delle due reazioni deve essere uguale. La velocità della reazione aumenta del 10% ogni °C e raddoppia per ogni aumento di 10°C. Tra i 40° e i 70° C si ha la denaturazione (enzima PCR non si denatura a 100°); i dosaggi enzimatici di norma vengono fatti a 30-37°C, a una temperatura ottimale per l'enzima specifico, comunque deve essere costante nelle diverse reazioni e anche durante il dosaggio.



pH e concentrazione ionica: il pH condiziona la capacità di un enzima di trasformare il substrato in prodotto, perché il legame enzima-substrato è di interazione non covalente (forze di Van Der Waals, legami H, attrazioni elettrostatiche). Il pH condiziona lo stato di ionizzazione degli aa del sito attivo dell'enzima, es Hb cambia la sua struttura e la sua attività in funzione di piccole variazioni di pH di tessuto o polmone.

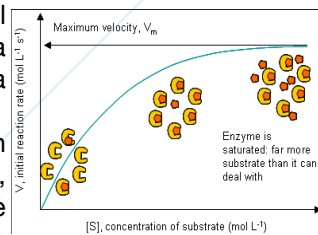


Quindi l'attività catalitica è correlata allo stato di ionizzazione degli aa, alla concentrazione ionica totale e cambia la velocità della reazione enzimatica. La concentrazione ionica totale è rilevante perché in presenza di troppo o troppo poco ione cambia la capacità dell'enzima di riconoscere il substrato.

Anche in questo caso si ha una curva a campana, un pH ottimale e questo si deve usare per misurare l'attività catalitica.

Quantità di substrato: la velocità di una reazione catalizzata da un enzima varia al variare della concentrazione del substrato con una funzione iperbolica. La variazione della velocità rispetto alla concentrazione del substrato è descritta dall'equazione di Michaelis-Menten.

L'enzima (E) prima si deve combinare con il substrato (S) per formare un complesso (ES) che si decompone producendo enzima libero (E) e prodotto (P), quindi $E+S \rightarrow ES \rightarrow E+P$. A bassa concentrazione di S la maggior parte dell'enzima è nella forma libera e la concentrazione di ES dipende dalla concentrazione di S. In queste condizioni la velocità della reazione catalizzata è proporzionale alla concentrazione di substrato (*cinetica di I ordine*). Ad alta concentrazione di S tutto l'enzima è nella forma ES e la velocità dipende dalla concentrazione dell'enzima (*cinetica di ordine zero*, di saturazione); quando il numero di molecole di substrato supera il numero degli enzimi la velocità viene saturata.



I dosaggi enzimatici sono eseguiti in cinetica di saturazione (ordine zero), con una quantità di substrato vicina a quella che determina la velocità massima, cioè quando il fattore limitante nella velocità di produzione del prodotto è la quantità dell'enzima. Quindi dall'equazione di Michaelis-Menten ricavo la K_m : ogni enzima presenta una specifica K_m , che indica qual è la concentrazione del substrato che dà metà della velocità massima, di conseguenza nel dosaggio metterò due volte la K_m e la concentrazione di substrato dovrà essere 20-50 volte superiore alla K_m , perché permette di avere una velocità massima per un certo periodo.

Il risultato di un'analisi enzimatica, quindi la velocità della reazione catalizzata si esprime in km/h; nel SI l'unità di misura dell'attività catalitica è la *katal* (kat), che rappresenta la quantità di enzima che converte 1 mole di substrato in prodotto in 1 secondo, invece nel sistema tradizionale si usa l'*unità* (U), ovvero la quantità di enzima che converte 1 μ mole di substrato in prodotto in 1 minuto. $1 \text{ kat} = 6 \times 10^7 \text{ U}$; $1 \text{ U} = 1.67 \times 10^{-9} \text{ kat}$; $1 \mu\text{kat} = 60 \text{ U}$.

Nella provetta si va a vedere se aumenta il prodotto, se diminuisce il substrato o se aumenta o diminuisce il coenzima nel tempo. La velocità della reazione è data da: **$V_r = \text{variazione di substrato o prodotto o coenzima} / \text{tempo}$** . La diminuzione del substrato, l'aumento del prodotto o la variazione del coenzima sono misurate con metodi basati sull'energia radiante, analizzando assorbanza, torbidità, diffrazione, fluorescenza, luminescenza. Se ci sono condizioni di cinetica di ordine zero, temperatura, pH e forza ionica costanti e assenza di inibitori o attivatori, la produzione di prodotto nel tempo è lineare (retta). Quando il

substrato inizia a diminuire la velocità della reazione rallenta e la curva inizia ad appiattirsi. Quando il substrato finisce, si raggiunge un plateau nel quale il prodotto non aumenta nel tempo.

La misura della variazione di prodotto o substrato nel tempo può essere calcolata con due sistemi: -sistema di misura a tempo fisso (discontinuo)→ la reazione si ferma in momenti predeterminati (tra 2-5min) e si divide la misura della diminuzione del substrato o dell'aumento del prodotto (ΔR) per il tempo (t) trascorso. L'esempio più comune di errore a tempo fisso si ha quando la concentrazione di enzima nel campione è molto elevata e consuma tutto il substrato in tempi rapidissimi. Per evitare errori si può diluire il campione, quindi metterne metà (metodi a due o più punti).

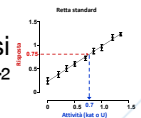
-sistema di misura in continuo→ metodo più preciso. Si registra in continuo (0-5min) la diminuzione del substrato o l'aumento del prodotto (ΔR). Si sceglie un intervallo di tempo e si divide la misura della diminuzione del substrato o dell'aumento del prodotto (ΔR) per il tempo trascorso nel periodo selezionato (Δt). La misura in tempo continuo permette di verificare che la misurazione della variazione di prodotto nel tempo ($\Delta R/t$) non sia alterata da presenza di attivatori e/o inibitori. Si può scegliere l'intervallo di tempo nella quale siamo sicuri la reazione si sia svolta in cinetica di ordine zero, temperatura, pH e forza ionica costanti e assenza di inibitori o attivatori.

L'attività enzimatica viene misurata con variazione ABS o altri valori dati dall'energia radiante/tempo. Per risalire dalla lettura strumentale alla concentrazione dell'analita nel campione biologico si usano degli standard: -soluzioni ad attività nota dell'enzima che vengono analizzate con la stessa metodica utilizzata per il campione biologico ad attività sconosciuta;

-il risultato strumentale ottenuto sul campione viene confrontato con quello ottenuto sugli standard.

Attività campione (kat/mL) : attività standard = $\Delta R/t$ campione : $\Delta R/t$ standard se è presente un solo standard.

In presenza di più standard si può determinare l'attività con interpolazione del grafico, si costruisce la curva dose-risposta lineare con l'equazione della retta di regressione $y=bx+a$ e r^2 99%.



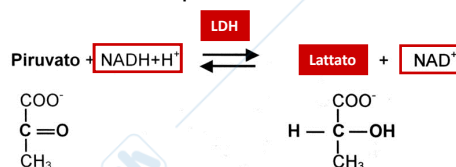
Se uno dei reattivi cambia concentrazione durante la reazione enzimatica, può essere quantificato in spettrofotometria con l'utilizzo del coefficiente di estinzione molare, quindi si può risalire dalla ΔABS all'attività enzimatica senza usare standard. La variazione di concentrazione del prodotto/substrato/coenzima misurato in spettrofotometria di assorbimento può essere calcolata con la legge di Lambert-Beer $c= \Delta ABS/\xi b$, più precisamente **attività catalitica**= $\Delta Abs/t / \xi d \times Vt/Vc$, perché la velocità della formazione del prodotto dipende dalla quantità di enzima presente nella provetta, quindi dal volume di campione biologico aggiunto. Questo metodo si applica tutte le volte in cui nella reazione enzimatica primaria o secondaria è un ossidoriduzione (es variazione di concentrazione di $NADH+H^+$). L'unità di misura dell'attività catalitica sarà in katal se ABS in moli e t in secondi, in unità se ABS in μ moli e t in minuti.

NB: attività catalitica kat o U /mL (velocità), concentrazione M o g/L (quantità).

Dosaggio della Lattico deidrogenasi con metodi enzimatici: LDH è un enzima ubiquitario, quindi aumenta in processi di danneggiamento e necrosi dei tessuti, è un indice di malessere tissutale. La LDH è presente nelle cellule del sangue e il problema è che può passare al plasma anche prima di emolisi. Inoltre, si deve tenere presente che EDTA e ossalati inibiscono la LDH, quindi il dosaggio viene più basso se sono nel campione.

LDH è coinvolta nella glicolisi anaerobia, permette l'ossidazione del piruvato a lattato

NB: piruvato acquista elettroni e si riduce, lattato perde elettroni e si ossida.



Per dosare la LDH si usa il metodo UV: la quantità di $NADH+H^+$ ossidato a NAD^+ è proporzionale alla quantità di piruvato ridotto a lattato. Concentrazione di lattato/piruvato= concentrazione $NADH+H^+=\Delta ABS/\xi$ del $NADH+H^+$ a $340\text{nm}=6,3 \times 10^3 \text{ M}$.

Se il test è condotto in condizioni di stato stazionario, cinetica di ordine zero e pH e t ottimali, la velocità della reazione (quantità di substrato trasformato nel tempo) è proporzionale alla concentrazione dell'enzima che la catalizza: attività LDH (kat o U/mL)= $\Delta Abs/t / (6,3 \times 10^3) \times Vt/Vc$.

Dosaggio della α e β idrossibutirrato deidrogenasi con metodi enzimatici: HBDH è presente in muscolo, fegato e miocardio, catalizza la riduzione di α e β chetobutirrato e α e β idrossibutirrato. Anche in questo caso si ha una reazione NAD dipendente (stesso calcolo di LDH).

Dosaggio della fosfatasi alcalina (ALP) con metodi enzimatici: enzima ubiquitario, presente soprattutto in osteoblasti e fegato, il suo aumento è spesso correlato a tumori ossei. Nei giovani animali la fonte è l'osso,

negli adulti il fegato. L'ALP catalizza l'idrolisi di diversi esteri dell'acido fosforico: monoestere fosforico + H₂O → alcool + acido fosforico. L'ALP funziona meglio a pH 10. La velocità della reazione è misurata determinando l'aumento della concentrazione dell'alcol con uno spettrofotometro, la concentrazione sarà maggiore tanto più sarà intenso il colore. Attività ALP = $\frac{\Delta \text{Abs}}{t} \cdot \frac{1}{\epsilon d} \cdot \frac{Vt}{Vc}$.

Dosaggio della amilasi (AMY) con metodi enzimatici: è un enzima pancreatico che catalizza l'idrolisi di legami α 1-4 di omopolisaccaridi del glucosio, in caso di un suo aumento nel plasma si hanno problemi di pancreatite. Nel cane l'attività dell'amilasi è 5-6 volte maggiore che in altre specie, non è riassorbito a livello di tubuli renali (urina non utile nella diagnosi di pancreatite).

Si può dosare attraverso un test diretto o indiretto in cui si utilizza un substrato sintetico riconosciuto dall'enzima.

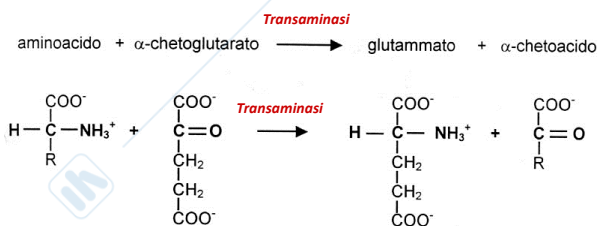
Dosaggio della lipasi (LIP) con metodi enzimatici: la lipasi catalizza l'idrolisi dei trigliceridi in posizione 2 e 3, la sorgente di questo enzima è il pancreas esocrino e aumenta nel plasma durante la pancreatite. La determinazione della LIP può essere fatta in turbidimetria: la presenza dell'enzima diminuisce la turbidità, quindi si valuta la turbidità nel tempo e si risale alla concentrazione della LIP.

Nel caso del metodo colorimetrico si usa un substrato colorimetrico, che viene idrolizzato dalla LIP.

Dosaggio della colinesterasi (ChE) con metodi enzimatici: è un enzima che diminuisce quando il fegato che lo produce è danneggiato; può anche essere indice di avvelenamento da organofosfati. Il dosaggio si basa sempre su una variazione di Abs.

Dosaggio della glutamil-transpeptidasi (GGT) con metodi enzimatici: è un enzima ubiquitario, aumenta nel caso di malattie epatiche ostruttive.

Dosaggio delle transaminasi con metodi enzimatici: sono enzimi deputati al metabolismo degli aa a livello del fegato. La transaminasi stacca il gruppo amminico, il quale viene usato nella biosintesi degli aa o viene escreto, e i chetoacidi dagli aa. I gruppi NH₃ dei 20 aa convergono sull'αchetoglutarato che diventa



glutammato, grazie alle transaminasi e al coenzima vit B6 (NB: quando si fa una reazione in provetta è necessario che ci siano i coenzimi).

Le transaminasi che si dosano sono: -alanina aminotransferasi (ALT)→ catalizza la reazione di transaminazione dell'alanina, che senza NH₃ diventa piruvato. ALT si trova nel citosol degli epatociti, è un marker di lesione o congestione epatica in cane e gatto. Per vedere se c'è ALT nella provetta si fa una reazione accoppiata a quella della LDH, si vede il NADH+H⁺ ridotto nel tempo.

-aspartato aminotransferasi (AST)→ catalizza la reazione di transaminazione dell'aspartato, che senza NH₃ diventa ossalacetato. È un enzima ubiquitario, indice di danno a muscolo o fegato. Nel cavallo ha valori molto più alti che in altre specie, quindi si deve diluire il campione. Per visualizzare la reazione dell'AST si accoppia alla reazione della malico DH e il consumo di NADH+H⁺ viene quantificato misurando la diminuzione di ABS nel tempo a 340nm.

Dosaggio della creatininchinasi (CK) con metodi enzimatici: catalizza la fosforilazione reversibile della creatina da parte dell'ATP: creatin fosfato + ADP → creatina + ATP. La CK è uno degli enzimi più organo specifici, perché è presente in muscoli scheletrici, miocardio e cervello. La reazione della CK è accoppiata a quella della esochinasi e della G6PDH, tanto più CK c'è, tanto più NADH+H⁺ si forma.

Dosaggio degli isoenzimi: gli isoenzimi sono proteine codificati da geni diversi, che catalizzano la stessa reazione ma in tessuti diversi con proprietà molecolari diverse (differiscono per Km, pH, modulatori). Gli isoenzimi esistono quasi di tutti gli enzimi, quelli con ruolo clinico sono LDH e CK.

Isoenzimi CK: CK è un dimero formato da due subunità (B e M); sono 3 isoenzimi: CK1 cervello (BB), CK2 cuore (BM), CK3 muscolo (MM). In veterinaria ha relativa importanza differenziare isoenzimi della CK, in quanto l'infarto al miocardio e l'ictus cerebrale non sono patologie clinicamente rilevabili.

Isoenzimi LDH: LDH è un tetramero formato da H e M. Esistono 5 isoenzimi (LDH 1 a 5) con diverse combinazioni di H e M, ma tutti hanno come substrato piruvato e lattato.

Per distinguere i diversi isoenzimi sia di CK che di LH ci sono due modi: -inibizione selettiva→ si fa il dosaggio, si mette il substrato e l'enzima risulta presente, ma non si sa quale tipo. Allora si inibisce un isoenzima e si rifà il dosaggio, una differenza di attività tra prima e dopo aggiunta indica la presenza/ assenza dello specifico isoenzima. Oppure si può fare un'inibizione immunologica aggiungendo anticorpi specifici per una subunità.

-metodi elettroforetici→ le proteine diverse si distribuiscono in modo diverso in base alla carica elettrica che hanno. Per vedere solo un determinato isoenzima si aggiunge o un anticorpo o si mette il substrato (verrà convertito in prodotto in presenza dell'enzima, quindi avrà una colorazione specifica).

Metodi elettroforetici: fanno parte dei metodi di analisi indiretta con separazione. L'elettroforesi è la separazione di molecole cariche sotto l'azione di un campo elettrico; la direzione di migrazione di uno ione dipende dal campo elettrico e dalla polarità della carica netta dello ione, quindi i cationi vanno verso il catodo (polo negativo), mentre gli anioni vanno verso l'anodo (polo positivo), in realtà si ha una separazione delle cariche in modo selettivo.

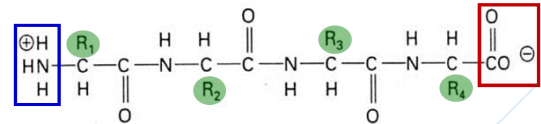
Questi metodi hanno applicazioni molto ampie, però sono principalmente due le molecole su cui si usano:

-proteine→ l'analisi più comune è la quantificazione delle diverse sieroproteine, in particolare con l'elettroforesi si può avere un'idea della concentrazione di 4 classi di proteine (albumine, α , β e γ globuline) e a seconda del tipo di proteine che vengono trovate si classifica la patologia, es gammaglobuline indicano un processo infiammatorio. Un'altra analisi è la quantificazione delle frazioni proteiche nelle urine: si va a vedere quante e quali proteine ci sono, a seconda di quali proteine sono presenti si possono distinguere diverse patologie (renali, extrarenali, processi infiammatori). Ancora, questi metodi vengono usati per la quantificazione di isoenzimi (LDH e CK) e isoormoni (eritropoietina-antidoping) nel plasma. In generale le analisi delle proteine possono dare informazioni riguardo alla caratterizzazione delle proteine nei tessuti.

-acidi nucleici (DNA e RNA)→ usati per diagnostica di malattie infettive, parassitarie, identificazione di specie degli alimenti di origine animale, identificazione OGM e clonaggio.

Con il metodo dell'elettroforesi non si ricava l'assorbanza, ma il risultato è rappresentato da delle immagini di gel, che con un particolare software vengono analizzate e si forma l'elettroferogramma (grafico) da cui si deduce il numero delle proteine nei campioni. Esistono sistemi automatizzati e manuali.

Proteine e DNA migrano in un campo elettrico, perché contengono gruppi ionizzabili, quindi possono essere analizzati in elettroforesi.



Proteine: la carica della proteina è dovuta ai gruppi carbossilici (COOH), che danno la carica negativa (COO⁻), e amminici (NH₂), che danno la carica positiva (NH₃⁺). Il pH della soluzione condiziona lo stato di ionizzazione dei gruppi amminici e carbossilici terminali di una proteina: a pH acido i gruppi carbossilici sono neutri e si ha NH₃⁺, mentre a pH basico si ha NH₂ e COO⁻; cambiando il pH si cambia la presenza di gruppi positivi e negativi, quindi si cambia la carica della proteina.

Ciò che distingue le proteine sono gli aa che le compongono: tutti gli aa hanno un gruppo carbossilico e uno amminico, ma questi formano il legame peptidico nella proteina, perciò gli unici gruppi che rimangono sono i due terminali carichi positivamente e negativamente. La carica della proteina non dipende solo dai gruppi carbossilico e amminico, ma anche dai gruppi funzionali carichi positivamente e/o negativamente. I gruppi funzionali degli aa che compongono la proteina sono diversi, formano le catene laterali. Numero e carica dei gruppi funzionali dipendono dalla sequenza aminoacidica della proteina.

Gli aa sono 20 e 5 di questi presentano, oltre ai gruppi carbossilico e amminico terminali, delle catene laterali con dei gruppi amminici o carbossilici. Di questi 5 aa quelli con carica positiva e gruppi amminici (basici) nelle catene laterali sono Lisina, Arginina e Istidina, mentre quelli carichi negativamente con gruppi carbossilici (acidi) nelle catene laterali sono Aspartato e Glutammato.

Il pH condiziona la carica dei gruppi carbossilici e amminici. In particolare, la pK è la costante di dissociazione, che è il pH al quale il gruppo carbossilico o amminico acquista o cede i propri protoni; più è alta, meno è forte l'acido. I gruppi amminici e carbossilici terminali di una proteina sono caratterizzati da una pK, ciò significa che NH₂ diventa NH₃⁺ tutte le volte che il pH è inferiore a 9,7, invece COOH diventa COO⁻ se il pH è inferiore a 3. Quindi una proteina presenta gruppi amminici e carbossilici delle catene laterali carichi positivamente o negativamente a seconda del pH, la pK del gruppo e la somma totale delle cariche, perciò i gruppi terminali sono relativamente importanti.

L'emoglobina è molto ricca di istidina e il pH è in grado di cambiare la sua affinità per l'ossigeno. Questo succede perché il pH nell'organismo ha piccole variazioni e l'istidina nei gruppi laterali ha un aa con un valore di pK vicina al fisiologico, quindi è l'unico aa in grado di acquisire o cedere elettroni in funzione di cambiamenti di pH nel range fisiologico, ciò influisce sul suo funzionamento.

La carica di una proteina dipende dalla sequenza aminoacidica, dal pH in cui si trova e dal punto isoelettrico pI (pH a cui una proteina ha carica netta nulla-dipende dalla sequenza aa ed è specifica per ogni singola proteina). Quindi proteine diverse hanno sequenze aa diverse e punti isoelettrici diversi, se cambia anche un solo aa cambia il punto isoelettrico. Conoscere il punto isoelettrico di una proteina è utile perché si può sapere che carica ha a un certo pH. La carica dipende dal fatto che il pH sia sopra o sotto il punto isoelettrico. Ogni proteina ha un suo punto isoelettrico: le albumine hanno un punto isoelettrico a 4,7. Per sapere che carica ha l'albumina si può mettere a un pH superiore della sua pK, es a pH 6 iniziano a predominare le cariche negative. Le immunoglobuline a pH 6 hanno diverse cariche: qualcuna non ha

carica, altre hanno carica positiva (pH inferiore a pK). Quindi variando il pH si possono far andare le proteine o verso l'anodo o verso il catodo: a un pH superiore la proteina ha una carica negativa, a un pH inferiore ha una carica positiva; più il pH è lontano dal punto isoelettrico (pI) più la proteina è carica. Se il pH=pI la carica è nulla; se pH>pI la carica è negativa; se pH<pI la carica è positiva. Si può cambiare la solubilità di una proteina cambiando il pH della soluzione (processo usato per produrre il formaggio o nella maturazione delle carni).

Acidi nucleici: la carica è data dall'acido fosforico. Il DNA e RNA sono degli acidi, possono essere o carichi negativamente o neutri, al contrario della proteina che può essere sia carica positivamente che negativamente. Per rendere neutro il DNA si deve abbassare il pH, portandolo al di sotto della pK; la pK dell'acido fosforico all'interno del DNA è 0,9, quindi per avere un acido nucleico neutro si deve avere una soluzione a pH 0.

Fattori che influenzano la mobilità elettroforetica: -campo elettrico→ la velocità di migrazione di uno ione in un campo elettrico dipende dall'equilibrio tra la forza di spinta del campo elettrico, la carica netta dello ione e le forze frenanti del mezzo ($v=Eq/f$, E gradiente di potenziale, q carica della molecola, f coefficiente frizionale); in uno stesso esperimento E e f non variano, per cui la velocità è condizionata da q. Una velocità di migrazione maggiore delle proteine vuol dire che hanno una carica negativa maggiore. Le albumine sono le proteine che migrano più lontano, perché hanno il pI molto basso, sono più acide.

Il campo elettrico è caratterizzato da due elettrodi e una differenza di potenziale tra essi, misurata in Volt (V), e si ha un flusso di cariche elettriche attraverso un materiale conduttore. Più sono i V, tanto più è la differenza di potenziale, ci sono elettroforesi da 100V a 3000V. Nel momento in cui si muove una carica elettrica si genera una potenza che viene dispersa in calore, quindi se si usano voltaggi molto alti, il sistema viene sballato, perché più è alto il voltaggio, più si genera calore e si denaturano le proteine, per questo esistono dei sistemi di raffreddamento (più sono migliori, più è alto il voltaggio che si può usare). Più è alta la corrente, più è veloce la separazione e migliore deve essere il sistema di raffreddamento.

L'altra cosa che viene controllata nel campo elettrico è l'alimentatore, quindi si regola il voltaggio e l'intensità di corrente. L'intensità di corrente è misurata in Ampere (A) e condiziona anch'essa il campo elettrico.

-tampone→ nel sistema elettroforetico è importante controllare il tampone, perché proteine e acidi nucleici sono in soluzione. Il tampone condiziona il pH, quindi la carica. Le funzioni del tampone sono: trasporto della corrente, determinare e tamponare il pH della soluzione, determinare la carica netta delle molecole da separare. Il pH condiziona la carica, quindi la sua velocità e la sua direzione di migrazione. La forza ionica (concentrazione dei sali) deve essere controllata perché la corrente viene trasportata dagli ioni dei sali presenti in soluzione.

-supporto di migrazione→ la migrazione delle proteine sottoposte al campo elettrico non avviene nel vuoto, ma su dei supporti solidi (acetato di cellulosa, gel di agarosio, gel di poliaccrilamide). Il supporto di migrazione ha un'importanza notevole, tanto quanto il pH. Le proteine migrano in bande o zone nel supporto solido (elettroforesi zonale).

L'acetato di cellulosa è il supporto più comune nell'applicazione di biochimica clinica dell'elettroforesi per l'analisi delle proteine del siero del plasma. È inerte, quindi è una sostanza che fa migrare le molecole come se fossero quasi nel vuoto, si forma un reticolo con maglie molto larghe quindi le proteine non vengono frenate. La separazione del siero e delle proteine avviene in funzione della loro carica e della loro dimensione.

Il gel di agarosio è formato dalla polvere dello zucchero che messa nel tampone si scioglie (punto di fusione a 65°) e se si fa raffreddare diventa rigido. È utilizzato per le analisi elettroforetiche di DNA e RNA; è attivo, quindi può contribuire alla separazione per azione di setaccio molecolare. Inoltre, si possono cambiare le percentuali di agarosio e quindi cambiare l'effetto frizionante. Una soluzione di agarosio 1% (in 100mL) ha pori per cui non pone resistenza alle proteine che migrano. Si può cambiare la quantità di agarosio a seconda di che DNA si ha per cambiare l'effetto frizionale.

Il gel di poliaccrilamide è utilizzato per l'analisi delle proteine quando è necessario un alto potere di risoluzione, in biochimica clinica viene usato per l'analisi delle proteine nelle urine. Viene usato nell'analisi delle proteine, ma anche di DNA e RNA quando c'è bisogno di separare molecole molto simili tra loro. Ha una capacità di selezione molto alta, la porosità dipende dal T% dal rapporto tra acrilamide e bisacrilamide. È attivo (separazione per setaccio molecolare), è il più preciso e analitico dei supporti solidi.

-natura chimica della molecola→ si considerano carica, dimensione e forma. Ci sono elettroforesi in cui la separazione sfrutta le differenze di carica e altre che sfruttano la differenza di dimensioni molecolari.

Fissazione e colorazione delle proteine dopo l'elettroforesi: quando si fa l'elettroforesi si usa un gel, non si vede niente, le proteine migrano. Bisogna arrivare all'elettroferogramma per vedere le bande. Spesso bisogna fare la fissazione per bloccare le proteine dove sono arrivate e per farlo ci sono diversi modi, ad esempio la macchina prende il gel e si mette in un sistema che blocca tutto. Il passaggio successivo è la colorazione. Ci sono diversi metodi per evidenziare ciò che è stato separato: -metodi non specifici→ si

colorano tutte le proteine. Ci sono 3 metodi non specifici che differiscono per colore, quante proteine vengono viste e se sono quantitativi o meno.

I coloranti differiscono in base a quante proteine vedono e a quanto riescono a colorare. Ad esempio il Rosso Ponceau viene usato nelle analisi di sieroproteine nel plasma dopo elettroforesi su acetato di cellulosa. Il Rosso Ponceau ha una bassa sensibilità, quindi si vedono solo le proteine che sono in quantità elevate (colorate di rosso), ed è quantitativo, cioè più il colore è intenso più proteine ci sono.

Il Coomassie Brilliant Blue è un colorante a sensibilità alta e quantitativo, colora di blu e si vedono più bande; viene usato per i campioni in cui sono presenti poche proteine, ad esempio nelle urine.

Il nitrato d'argento ha una sensibilità molto alta, rileva proteine che hanno concentrazione anche molto basse, però non è quantitativo, quindi se c'è una macchia più scura non è detto che ce ne siano di più. Le vedo tutte ma è difficile dire quale proteina è più presente. La colorazione è bruno/nero.

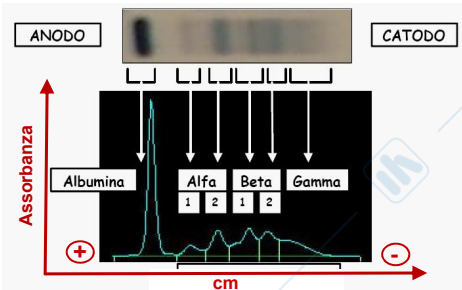
-metodi specifici→ colorano solo alcune proteine, servono per quando si vuole vedere se c'è una determinata proteina. Si può fare un dosaggio dell'attività enzimatica su gel o si fa una colorazione mediante anticorpi (Western-blotting). Nel dosaggio dell'attività enzimatica su gel si mette il gel a contatto con il substrato dell'enzima utilizzando un saggio che permetta la formazione di un prodotto colorato (isoenzimi). Nella colorazione tramite anticorpi dopo il blotting su membrana di nitrocellulosa si aggiunge una soluzione con un anticorpo marcato che si lega solo alla proteina (antigene specifico) presente in una banda. Il complesso Ag-Ab viene rivelato aggiungendo un substrato che trasformato in prodotto è misurabile. Per misurare RNA e DNA si possono realizzare sonde complementari, per le proteine si aggiungono anticorpi specifici per quella proteina che devo individuare, così si forma il complesso antigene-anticorpo (anticorpo deve essere marcato-sistema ELISA). Blotting significa che si trasferiscono le molecole dal gel a un supporto solido più facile da gestire.

Tipologie di elettroforesi per la separazione di proteine: -separazione in base alla carica netta→ è fatta in base alla velocità di migrazione data dalla carica elettrica netta. È la più utilizzata in biochimica clinica per le analisi del sangue, quindi per l'analisi e la quantificazione delle proteine del siero (albumine e globuline), non si vede solo quante ce ne sono, ma anche quali sono. Lo scopo è andare a vedere quali e quante proteine ci sono.

Si hanno anodo, catodo e supporto solido con una soluzione tampone a pH alcalino $\geq 8,6$ (formata da tris-fosfato, tris-glicina, tris-EDTA). Mettendo un pH alcalino la maggior parte delle proteine sono cariche negativamente e migrano verso l'anodo, perché le proteine del siero hanno tutte punto isoelettrico minore di 8,6. Per far sì che la velocità dipenda solo dalla carica si usa un supporto solido non selettivo, come l'acetato di cellulosa o una poliacrilamide a bassa T% (non superiore a 7-8%); quindi la separazione avviene solo in base alla carica. La velocità dipende dal punto isoelettrico delle proteine, più la proteina è lontana dal punto isoelettrico, maggiore è la carica e maggiore è la velocità; in questo caso le albumine sono quelle con maggiore carica negativa. È fondamentale sapere dove sono polo positivo e negativo, in modo tale da sapere dove sono le varie proteine.

Perciò per fare l'elettroforesi in base alla carica netta si prendono 1-2 μL di siero e si applicano 100-300 V, dopo circa 15-20 minuti le albumine raggiungono il fondo; se si aumenta il voltaggio, ci vuole meno tempo e viceversa. Il tempo per fare un'elettroforesi è standardizzato in modo che le albumine arrivino in fondo. Dopo la fissazione si fa una colorazione con il rosso Ponceau (bassa sensibilità) e vengono evidenziate 4-6 bande. Cambiando colorante cambia la quantità di proteine che si colorano e il colore delle diverse bande. Dopo la colorazione si vanno a fare calcoli sull'elettroferogramma. Per fare l'elettroferogramma si mette il gel in uno scanner e si misurano quante onde elettromagnetiche passano (assorbanza). Il gel viene messo in un densitometro, che misura la densità delle onde elettromagnetiche assorbite di ogni banda. Quindi si costruisce un grafico con la distanza in cm percorsa dalle proteine durante l'elettroforesi (proporzionale alla velocità di migrazione delle proteine; velocità dipende dal pI) sull'asse delle x, cioè quanto ha migrato, e sull'asse delle y l'assorbanza (proporzionale alla concentrazione delle proteine). Sull'elettroferogramma ci sono i centimetri, polo positivo e negativo (asse x) e assorbanza (y). Le albumine vengono messe vicine all'asse delle x. Per individuare le diverse frazioni proteiche su un elettroferogramma è fondamentale indicare dove sono anodo e catodo e quindi qual è stata la direzione di migrazione.

Per dire quante albumine e quante globuline in g/dL ci sono basta sapere quante proteine c'erano nel campione di siero. Quindi si fa il dosaggio delle proteine totali del siero con il metodo indiretto (Lowry, BCA, Bradford), che come risultato dà la concentrazione totale. L'area totale sotto il grafico corrisponde alle proteine totali, l'area del picco corrisponde a x proteine. Si fa una proporzione; il software dice la quantità di una certa proteina in percentuale. Poi sapendo la concentrazione delle proteine totali, si può risalire alla



concentrazione delle singole proteine in g/dL. Quindi la concentrazione in g/dL si ottiene moltiplicando la concentrazione delle proteine totali del siero per le % delle frazioni.

-SDS-elettroforesi→ è fatta in base alla velocità di migrazione data da peso molecolare e forma. Viene usata per misurare le proteine delle urine, perché a seconda delle dimensioni delle proteine delle urine si può dire se c'è un danno a livello tubulare, glomerulare.

SDS è un detergente anionico, come un sapone, carico negativamente. Questo detergente si lega alle proteine, rendendole cariche negativamente indipendentemente dal pH del tampone e dal loro pI, quindi si sa già che andranno verso il polo positivo. Questo tipo di elettroforesi usa un supporto solido selettivo, in grado di filtrare; si usa sempre e solo un gel di poliacrilamide fino al 12% T. La separazione dipende dalla velocità di migrazione e qui la velocità dipende solo da f ; quelle più vicino al polo sono le più piccole.

Oltre a SDS, si può aggiungere anche il 2 β -mercaptoetanolo e in questo caso si denatura completamente la proteina (si rompono i ponti disolfuro) e così la migrazione delle proteine dipende dal peso molecolare (perché sono tutte tagliate in pezzetti). Lo svantaggio del 2 β -mercaptoetanolo è che le proteine polimeriche cambiano completamente l'aspetto in elettroforesi.

In presenza di 2 β -mercaptoetanolo insieme a SDS l'elettroforesi viene segnata in condizioni denaturanti, mentre se c'è solo SDS l'elettroforesi è in condizioni native. Le due tipologie non possono essere confrontate, danno risultati completamente diversi.

Se si fa l'analisi delle urine è importante sapere il peso molecolare delle proteine che si sono separate; in base al peso molecolare delle proteine si distinguono diversi tipi di proteinuria (glomerulare, tubolare o mista). Per sapere il peso molecolare si confrontano con uno standard.

Anche in questo caso si fa un elettroferogramma e si hanno diverse colorazioni per sapere quante sono. Nel grafico dell'elettroferogramma si mettono sulle x le distanze in cm percorse dalle proteine durante l'elettroforesi, sulle y si mettono i pesi molecolari, si fa una retta di regressione e si usa la formula della retta di regressione (come per il confronto con lo standard).

-focalizzazione netta (IEF)→ è fatta in base alla posizione raggiunta al punto isoelettrico delle proteine. È più specialistica, in biochimica clinica si usa per l'analisi degli isoormoni, degli isoenzimi e per l'identificazione di specie. Non è una gara di velocità, ma di posizione.

Il supporto solido è selettivo in quanto il gel non ha lo stesso pH all'anodo e al catodo, ma c'è un gradiente di pH tra i due poli (si mette un acido e dall'altra parte una base). In questo modo tutte le proteine si distribuiscono in funzione dei loro punti isoelettrici e della loro dimensione (selettivo per questo), si fermano quando arrivano al loro pI, quindi quando hanno carica nulla, e formano delle bande.

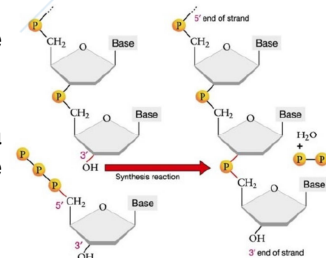
Il tampone è diverso da anodo a catodo: all'anodo c'è un acido forte, al catodo una base forte. Una proteina migra fino a raggiungere il punto in cui il pH corrisponde al suo pI (carica netta nulla=velocità nulla), si dice che le proteine si focalizzano. Il supporto solido non deve essere selettivo per peso molecolare e forma, perciò si usa una poliacrilamide a bassa T%. Il gel ha acido e base, quindi il pH non è molto stabile, ma in realtà nel gel ci sono degli anfolti, cioè sostanze a pI ben preciso, e queste sostanze, oltre a distribuirsi, hanno un effetto tampone, così rendono stabile il gradiente di pH. Si possono usare anfolti di range diverso. Usando un gradiente stretto di pH è possibile separare anche proteine che differiscono di sole 0.01 unità di pI.

La IEF si può usare con gli isoenzimi, ovvero enzimi con pI diversi perché sintetizzati in tessuti diversi. Quindi vengono messi in un gel, si fermano in punti diversi, poi si aggiunge il substrato degli enzimi e appaiono delle macchie di colore nei punti in cui si sono fermati i diversi isoenzimi. La separazione degli isoenzimi non viene fatta su carica netta perché sono molto simili, nemmeno su SDS perché hanno peso molecolari molto simili, però hanno pI sufficientemente diversi per poter separarli con il metodo IEF.

L'analisi per l'identificazione di specie si fa su pesci (centinaia di specie). Si ottiene il tracciato di focalizzazione isoelettrica delle proteine idrosolubili e queste vengono messe in un gel di elettroforesi. I pesci hanno codici genetici diversi, proteine diverse e quindi si usano gel diversi. Una volta fatta l'analisi, ogni campione ha un suo andamento e per dire di che pesce si tratta si mette il campione in un database con tracciati standard certificati; il software compara l'elettroferogramma con quelli standard e indica la percentuale di similitudine. Questo metodo non si può fare su specie molto simili tra di loro.

La IEF viene usata anche per l'analisi degli isoormoni. Per fare il test anti-doping si misura l'eritropoietina, un ormone secreto dalle cellule del rene, prodotto come un isoormone. L'eritropoietina nel doping non è come quella fisiologica, ma è una isoforma. Le isoforme di eritropoietina migrano in punti diversi dopo la IEF. Nel cavallo dopato con eritropoietina aumenta la produzione di globuli rossi, ma dopo un paio di mesi il cavallo diventa anemico (sintomo di doping con eritropoietina nel cavallo), perché l'eritropoietina somministrata è quella umana e viene riconosciuta come un antigene, quindi il SI produce anticorpi.

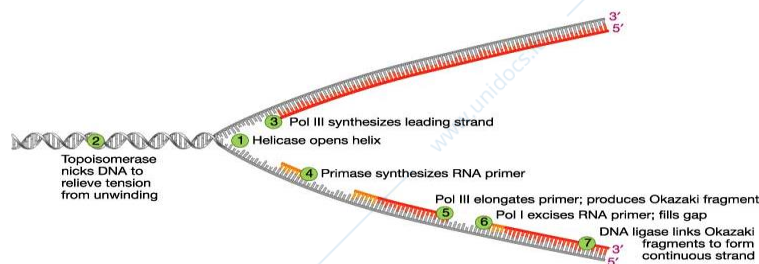
Tecniche di biologia molecolare: il DNA è costituito da due filamenti polinucleotidici avvolti attorno a un asse ideale in modo da formare una struttura a doppia elica con passo regolare. Il desossiribosio costituisce la parte



centrale di ciascun nucleotide, in posizione C1 viene legata la base azotata, in C5 il gruppo fosfato, in C3 il gruppo OH viene usato per formare il legame nucleotidico. Per formare la catena polinucleotidica i nucleotidi trifosfati vengono assemblati con legame fosfodiesterico tra il carbonio 3 di un nucleotide e il carbonio 5 del nucleotide successivo.

Il DNA secondo il modello di Watson e Crick presenta uno scheletro della doppia elica è costituito dal 2-desossiribosio e dagli H₃PO₄. Le basi azotate al centro della doppia elica si legano tra loro con legami a idrogeno tra basi puriniche e basi pirimidiniche; le basi di un filamento sono legate a quelle del filamento antiparallelo secondo la legge della complementarità, quindi A-T e C-G. La complementarità delle basi azotate costituisce il fondamento per la duplicazione del DNA e la trasmissione del codice genetico.

Ogni cellula madre che si divide deve trasmettere l'intero patrimonio genetico alle due cellule figlie. Prima della divisione cellulare, quindi, il DNA si duplica attraverso un processo semi-conservativo in cui la doppia elica si apre e ogni filamento ne sintetizza uno ex-novo (50% uguale alla madre, 50% nuovo). I nuovi filamenti di DNA vengono sintetizzati ad opera della DNA polimerasi copiando i filamenti preesistenti (filamenti di stampo) secondo la legge della complementarità; la replicazione avviene in direzione 5'-3'. La DNA-polimerasi non è in grado di iniziare la sintesi ex-novo, ma può solo aggiungere nucleotidi a un innesco già preparato, quindi è necessario un innesco (primer), il quale è costituito da un frammento corto di RNA prodotto da una RNA-polimerasi detta Primasi. Una volta che il DNA è stato duplicato, gli RNA



primer vengono rimossi grazie alla attività di taglio di una DNA-polimerasi capace anche di riempire i tratti rimasti vuoti con DNA. I frammenti discontinui, infine, vengono saldati dalla ligasi.

PCR: è usata per analizzare gli acidi nucleici che sono difficilmente visibili, quindi prende un frammento di acido nucleico e ne amplifica la quantità in modo da poterlo analizzare meglio. Si ha una reazione di polimerizzazione ciclica che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni a partire da quantità piccolissime di DNA di partenza (< 1 µg di DNA totale). Si basa su alcune peculiarità della duplicazione del DNA in vivo ad opera della DNA polimerasi: -necessità di un DNA a filamento singolo come stampo per la sintesi di un filamento complementare;

-necessità di un innesco per iniziare la sintesi;
-sintesi del DNA solo in direzione 5'-3'.

Nel 1979 Mullis creò la PCR, cercando di ripristinare ciò che succede in natura, però inserì delle temperature che non sono tipiche in natura (94°, 45° e 72°), in modo da denaturare la doppia elica rompendo i legami H. La PCR ha un solo enzima, cioè la DNA polimerasi, la quale prima era termolabile, quindi a ogni ciclo nella reazione si doveva aggiungere di nuovo. Oggi esistono delle tecnologie, ad esempio il termociclatore è uno strumento che prevede una tecnica PCR automatizzata e si possono impostare temperatura, durata e numero di cicli in base al tipo di esperimento. L'enzima che si usa oggi è la Taq polimerasi, che deriva dal batterio termofilo ed è termostabile, quindi resiste alle alte temperature di denaturazione del primo step di amplificazione; la Taq catalizza la reazione di ibridazione dei nucleotidi e l'allungamento dei filamenti di DNA, l'amplificazione procede in direzione 5'-3'.

Per analizzare il frammento sono necessari innesti che facciano partire la reazione di polimerizzazione, ovvero i primers. I primers sono brevi sequenze nucleotidiche di sintesi complementari agli estremi del frammento di DNA da amplificare, sono due e si posizionano su entrambi i filamenti in direzione 5'-3'.

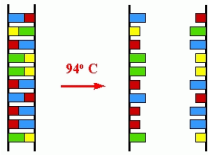
Il *DNA bersaglio* può essere di diversi tipi: -genomico (estratto dalla cellula)→ ha il vantaggio di essere estremamente stabile, quindi può provenire anche da materiale non perfettamente conservato, ad esempio sangue essiccato su carta da filtro (si può spedire anche a temperatura ambiente), matrici sottoposte a trattamento chimico/termico (come alimenti di origine animale);

-cDNA→ è il DNA complementare, ottenuto da uno stampo a mRNA mediante retroscrittura, serve per studi di espressione genica.

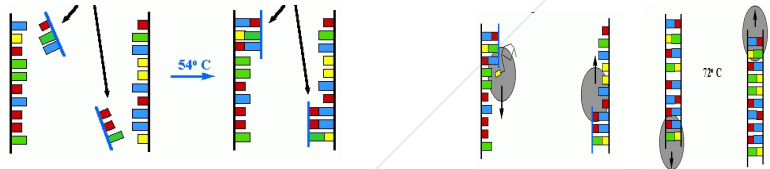
Le *tre fasi della reazione di PCR* sono: -denaturazione→ temperatura a 94°, la doppia elica di DNA stampo viene aperta per il calore elevato;

-annealing→ temperatura a 50-60°, i primers vanno a legarsi in maniera complementare sul DNA stampo. A seconda della sequenza, i primers hanno una temperatura alla quale si ha l'appaiamento. Più è alta la

temperatura, più il legame è specifico (tutte le basi sono complementari). Quindi si sceglie una temperatura sufficientemente lontana dalla temperatura di Melting (dipende dalla sequenza dei primer, dal numero di legame H tra primer e stampo) e sufficientemente alta per avere un legame specifico. La temperatura deve essere ottimale per entrambi i primers presenti.



-estensione→ la temperatura è a 72°, la DNA polimerasi allunga gli inneschi e produce due nuove catene di DNA.



Questo processo si ripete per un numero n di cicli e a ogni ciclo il numero di molecole di DNA "copiato" raddoppia, quindi è una reazione di tipo esponenziale.

Nel primo ciclo si ha l'appaiamento dei primers complementari ai frammenti di DNA denaturato. L'azione della Taq polimerasi e l'allungamento dei frammenti di DNA portano alla formazione dei long products, ossia frammenti di DNA delimitati solo dal lato in cui i primers ibridizzano. A partire dal secondo ciclo di amplificazione si formano gli short products; si hanno filamenti di DNA originali e la DNA polimerasi ne crea di nuovi (polarità inversa e primers si legano nella direzione 5'-3'), invece dai filamenti long formati nel primo ciclo si formano gli short products.

Ciclo per ciclo, ogni volta che si amplifica, si hanno filamenti originali con duplicazione lineare, mentre i long continuano ad aumentare e danno gli short. Gli short aumentano in modo esponenziale, mentre i long aumentano in modo lineare. Quando si analizza la reazione, si controllano gli shorts, perché aumentano in modo esponenziale e i long, visto che aumentano in modo lineare, non sono così influenti (piccola frazione del prodotto della PCR).

La resa teorica di una reazione di PCR a partire da una singola copia di DNA è data da $Y=N2^n$ (Y n molecole di DNA amplificato, N n molecole di DNA di partenza, n numero cicli PCR), quindi dipende dal numero di molecole di DNA di partenza e dal numero di cicli di PCR.

La resa reale di una reazione di PCR è $Y=X(1+E)^{(n-1)}$ (Y quantità di DNA, X quantità di DNA target, E efficienza di amplificazione, n numero cicli). La resa cala per l'effetto plateau, causato da: -competizione tra il prodotto dei cicli precedenti e i primers per l'ibridazione;

-inattivazione termica dell'enzima;

-riduzione del rapporto molare tra le concentrazioni della DNA-polimerasi e del DNA;

-riduzione progressiva dell'efficienza di denaturazione e/o di ibridazione;

-accumulo di pirofosfati (inibitori della polimerasi);

-progressiva diminuzione della concentrazione di uno o più componenti necessari alla reazione.

I *fattori critici della PCR* sono quelli in cui l'uomo ha influenza, di questi fanno parte: -temperatura e tempo di denaturazione→ per la temperatura non si va mai oltre i 97°. A 95° in 30 minuti si fanno circa 30 cicli di denaturazione di 1 minuto. Se la temperatura o il numero di cicli sono compresi tra la temperatura di denaturazione e 30 cicli, si deve diminuire il tempo di denaturazione o del ciclo.

Il numero di cicli va da 30 a 50, è 50 se il frammento è molto complesso; con un numero elevato di cicli si diminuisce il tempo di denaturazione. Dopo 30-35 cicli l'attività dell'enzima si riduce e i primers e gli acidi nucleici si esauriscono.

-temperatura e tempo di annealing→ se la temperatura è troppo bassa si possono appaiare frammenti che non sono specifici, ma hanno sequenze simili, per evitarlo si deve alzare la temperatura. Se si alza troppo la temperatura, invece, si ha una bassa resa perché si avvicina alla temperatura di Melting.

-temperatura e tempo di allungamento→ se il tempo è troppo breve si rischia di non finire l'amplificazione dei frammenti. L'allungamento finale dura circa 7-10 minuti per completare la sintesi degli eventuali prodotti parziali. A seconda della lunghezza del frammento si definisce il tempo della reazione.

Per quanto riguarda la visualizzazione dei prodotti di amplificazione bisogna tenere conto che gli acidi nucleici sono molecole cariche, quindi si possono separare mediante elettroforesi. La carica degli acidi nucleici si trova a livello dei legami fosfodiesterici, può essere negativa o neutra (se pH sotto 1); di solito i polinucleotidi sono sempre carichi negativamente e in una catena polinucleotidica c'è una carica negativa per ogni residuo. La carica dipende solo dalla lunghezza, invece la densità di carica (rapporto carica/massa)

è sempre uguale per tutti gli acidi nucleici. La separazione dipende solo dal coefficiente frizionale: i frammenti più lunghi migrano più lentamente di quelli più piccoli ($v=Eq/f$).

Gli acidi nucleici sono molecole cariche che possono essere separate mediante elettroforesi su un supporto omogeneo solido, che può essere gel di agarosio o gel di poliaccrilamide a bassa densità (usato per frammenti molto piccoli; ha elevata risoluzione ma sono difficili da preparare e maneggiare). Il risultato consiste in una serie di bande e il calcolo della lunghezza in basi delle bande incognite viene effettuato per confronto con una miscela di frammenti a PM noto.

La migrazione degli acidi nucleici nel gel è in funzione di dimensioni, peso molecolare e paio di basi. L'uso di marcatori di dimensione insieme ai campioni di DNA permette di determinare la dimensione del DNA campione. Inoltre, utilizzando una serie di frammenti di DNA a peso molecolare noto è possibile costruire una curva di taratura, dove ogni banda corrisponde ad un punto le cui coordinate sono costituite, in ascissa, dalla distanza in cm dal pozzetto e, in ordinata, dal Log_{10} del peso molecolare.

Ci sono diversi *metodi di colorazione degli acidi nucleici*: -non specifici→ il bromuro di etidio è un intercalante che si inserisce tra le basi di DNA ed è fluorescente, quindi le bande di DNA sono visibili illuminando il gel con raggi UV a 300nm;

-specifici→ sono più complessi, si basano sulle tecniche di Northern blotting e Southern blotting. Dopo il blotting su membrana si aggiunge una soluzione con una sonda marcata che si lega solo a una specifica sequenza nucleotidica. Le sonde devono essere complementari al frammento.

Il metodo PCR viene applicato nella ricerca di base, per lo studio di malattie genetiche ereditarie, per l'identificazione di marcatori molecolari di produttività, nella diagnostica di malattie infettive e parassitarie, per l'identificazione di contraffazioni alimentari. Per quanto riguarda la produzione e l'igiene degli alimenti si ha il riconoscimento di determinate specie patogene, cioè virus, batteri, protozoi e miceti. Il controllo delle frodi alimentari riguarda sostituzione di specie e omissione di dichiarazioni (specie, OGM).

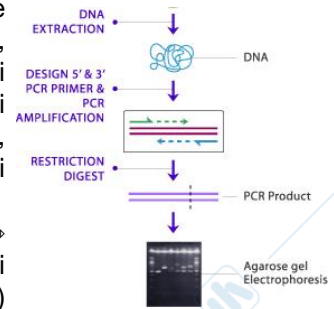
Ulteriori sviluppi delle analisi mediante PCR sono rappresentati da: -PCR-RFLP→ consiste nell'analisi dei polimorfismi di lunghezza di frammenti del DNA ottenuti per digestione con enzimi di restrizione. Gli enzimi di restrizione (endonucleasi) sono enzimi batterici o di sintesi che riconoscono e tagliano il DNA a doppia elica in siti specifici, quindi permettono di frammentare il genoma in punti precisi, in maniera riproducibile, dando origine a frammenti di lunghezza determinata. Le endonucleasi di restrizione si legano ad una sequenza specifica di DNA (sito di riconoscimento) e tagliano entrambi i filamenti di DNA. La sequenza riconosciuta varia da enzima ad enzima ed è composta da 4 a 8 basi. Molti enzimi di restrizione tagliano tratti di DNA palindromi, cioè che si leggono allo stesso modo in una direzione, su un filamento, e nella direzione opposta, sull'altro filamento.

Nella PCR-RFLP si ha l'amplificazione del tratto di DNA di interesse mediante PCR, la frammentazione del DNA amplificato con un set di enzimi di restrizione scelti sulla base della loro capacità di riconoscere sequenze nucleotidiche specifiche, poi la separazione dei frammenti mediante elettroforesi su gel di agarosio e infine lo studio del pattern di restrizione.

La presenza di un polimorfismo, un'inserzione o una delezione determina la perdita del sito di restrizione o la formazione di un nuovo sito. Questo aspetto si manifesta con la formazione di frammenti di differente lunghezza e quindi permette di tracciare i prodotti di origine animale, identificare la parentela tra soggetti (che condividono uno o più polimorfismi), identificare una mutazione caratteristica di una malattia genetica.

Ad esempio con i test genetici è possibile gestire le patologie ereditarie dei cani in allevamento in modo da eliminare progressivamente i soggetti malati. Dopo l'uomo, il cane è la specie per la quale sono state identificate più patologie/alterazioni a base ereditaria (circa 370), in particolare riguardanti apparato scheletrico, occhi e apparato cardiovascolare. Nelle forme autosomiche dominanti la selezione contro il gene dominante è generalmente agevole: il gene si esprime anche negli eterozigoti, quindi l'identificazione dei soggetti fenotipicamente affetti non è un problema, di conseguenza si possono favorire gli accoppiamenti esclusivamente fra soggetti sani. Grazie alla facilità di eradicazione, le anomalie sostenute da geni dominanti sono relativamente poco frequenti. Nelle forme autosomiche recessive, invece, la malattia si manifesta solo nei soggetti omozigoti recessivi, ma il gene permane nella popolazione, viene trasmesso e può diffondersi grazie agli eterozigoti. Per l'eradicazione della malattie nella popolazione è necessario intervenire favorendo gli accoppiamenti fra soggetti sani o fra soggetti sani e portatori, però è un metodo che richiede tempo. Per questo motivo è stata innovativa la diagnosi basata sui test del DNA possibile già in età precoce.

-PCR-sequenziamento→ è una tecnica che consente di ottenere la massima informazione su una molecola di DNA determinandone la sequenza nucleotidica completa (sequenza primaria). Questo metodo viene applicato per la determinazione della sequenza di una specifica regione di DNA, il sequenziamento di un



un virus, batterio o parassita) e si cerca l'Ab, mentre per rilevare un Ag si utilizzano Ab creati artificialmente e si controlla se si forma il complesso Ag-Ab.

I metodi immunochimici sono applicati in sierologia, nelle malattie infettive per cercare l'Ab contro la patologia o per trovare il patogeno introducendo Ab creati in laboratorio, oppure anche in tossicologia sono molto usati. Le sostanze che si possono cercare nel sangue, nel latte, nelle urine e nelle acque con i metodi immunochimici sono antibiotici, droghe, pesticidi, aflatossine, quindi qualsiasi molecola per cui si può produrre un Ab e andarlo a cercare, in biochimica clinica sono applicati per alcune patologie, ad esempio tutte le patologie endocrinologiche si basano su test immunochimici, come anche i test allergologici.

Gli Ab sono glicoproteine presenti nel sangue e prodotte durante la risposta immunitaria umorale, tra le loro funzioni c'è quella di proteggere dagli enzimi proteolitici; degli Ab fanno parte le γ -globuline (γ perché migrano meno in elettroforesi) e le immunoglobuline.

Una sostanza immunogenica, indicata con il nome di antigene, è una molecola che è in grado di stimolare la risposta anticorpale; le sostanze immunogeniche (Ag immunogenici) sostanzialmente sono le proteine.

Gli apteni, invece, sono tutte quelle sostanze che non sono in grado di stimolare una risposta anticorpale (non immunogeniche), perché sono uguali in tutte le specie, ad esempio il progesterone, ma esistono Ab che reagiscono specificatamente contro esse.

Gli Ab sono divisi in 5 classi, cioè IgG, IgA, IgM, IgE e IgD, hanno tutti una struttura di base costituita da due catene pesanti e due leggere tenute insieme dai ponti disolfuro, però hanno PM diversi e presentano catene proteiche simili ma diverse. In presenza di una malattia infettiva in sierologia per cercare gli Ab si può andare a cercare una qualsiasi classe (es si cercano le IgE per le allergie), mentre avendo l'Ab per cercare l'Ag o l'aptene normalmente si utilizzano le IgG come reattivo di laboratorio (più facili e specifiche da utilizzare).

Gli Ab hanno strutture simili (foglietti β ripiegati), le IgG sono tetrameri costituiti da due catene pesanti (50000 Da) e due leggere (25000 Da) e zuccheri, hanno un peso molecolare di 160000 Da (circa 1500 aa), quindi sono proteine molto grosse; di 160000 la parte che riconosce l'Ag è molto piccola, quindi sono piccole sequenze amminoacidiche (CDR; 10-15 aa) che riconoscono specificatamente quel determinato Ag e vengono chiamate zone ipervariabili. Le IgG nell'organismo presentano catene pesanti e leggere uguali, ma si differenziano nella zona ipervariabile, lo stesso vale per le altre classi di Ig; nella struttura tridimensionale le regioni ipervariabili si presentano come tre anse all'estremità dell'intelaiatura dei foglietti β , ogni catena, sia pesante che leggera, presenta tre anse random-coil che riconoscono l'Ag, quindi in totale ci sono 6 CDR. Esistono tante regioni ipervariabili, tanti quanti sono gli Ag che vengono riconosciuti.

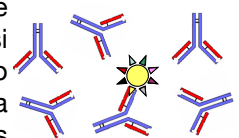
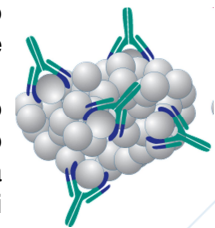
C'è differenza tra immunogenicità e antigenicità: solo le proteine con una certa dimensione sono in grado di stimolare la risposta anticorpale, quindi sono immunogeniche; gli apteni, i gruppi chimici semplici (<1000 Da) non sono immunogenici, reagiscono specificatamente con un Ab, ma non sono in grado di stimolare la risposta anticorpale da soli.

La specificità antigenica di una molecola dipende dagli epitopi. Gli epitopi (determinanti antigenici) sono parti dell'Ag in cui si lega l'Ab (legame non covalente), non sono strutture predeterminate, ma diventano epitopi nel momento in cui si lega l'Ab; possono esserci tanti epitopi sulla molecola, quindi tanto è più grande la molecola tanto più epitopi ci sono, es eritropoietina ha un PM di 30000 e può avere centinaia di epitopi. In una proteina le parti più immunogeniche sono le zone delle proteine diverse tra le varie specie.

Le caratteristiche generali degli epitopi valgono per qualsiasi molecola, invece per quanto riguarda le proteine si possono fare ulteriori diversificazioni, infatti gli epitopi possono essere: continui, che sono sequenziali, quindi gli aa sono tutti in sequenza nella struttura primaria dell'Ag proteico, non si possono spezzare, la sequenza è molto resistente (tipo di epitopo più resistente); oppure discontinui, quindi presentano gli aa vicini nella struttura tridimensionale, ma se le catene si separano, l'epitopo scompare.

Inoltre considerando il fatto che l'Ab ha un PM di 150000, si può affermare che gli Ag di grandi dimensioni (PM >3000 Da), quindi le proteine, sono immunogenici, possono avere tanti epitopi a cui si possono legare tanti Ab contemporaneamente, mentre gli Ag di piccole dimensioni (100-2000 Da) possono legare un solo Ab per volta anche se presentano più epitopi, es cortisolo ha due epitopi ma può legare un Ab alla volta perché è piccolo.

Ci sono due grosse categorie di Ab: -policlonali- sono prodotti da più cloni di plasmacellule, la popolazione è eterogenea, ma tutti gli Ab riconoscono gli epitopi dello stesso specifico Ag, differiscono per tipi di catene pesanti, leggere e CRD. Gli Ab riconoscono lo stesso Ag e si legano in epitopi diversi; se l'Ag è >3000 Da, l'Ab policlonale si lega a tanti epitopi, quindi gli Ab policlonali si possono legare allo stesso epitopo contemporaneamente (se le dimensioni sono sufficienti). La produzione di Ab policlonali si basa sulla stimolazione in vivo della risposta immunitaria da parte dell'Ag, quindi si prende l'Ag e si inietta in un animale, es



si inietta l'insulina di bovino in un topo e quest'ultimo produce Ab. I fattori da considerare per l'immunizzazione sono specie animale (se si usano proteine), quantità di Ag disponibile, quantità di siero da ogni prelievo, dose e forma (aptene) dell'Ag da somministrare, via di somministrazione e numero dei trattamenti da effettuare. Le specie che si utilizzano per produrre gli Ab policlonali sono conigli, capre, pecore, cavie, polli e asini.

Una volta fatti i richiami (come una vaccinazione), l'animale produce sempre più Ab e a un certo punto ne ha moltissimi nel sangue e con la cromatografia di affinità si possono prelevare. Il problema è che se l'animale muore, si può usare un altro animale, ma questo produrrà Ab leggermente diversi, perché la risposta immunitaria è diversa tra individui, quindi c'è una maggiore variabilità.

-monoclonali- artificio di laboratorio (prodotti in vitro), si separa il clone di plasmacellule che producono Ab tutti contro un solo epitopo; la popolazione è omogenea, gli Ab sono tutti identici perché hanno anche le zone ipervariabili uguali. Gli Ab riconoscono lo stesso Ag e si legano a uno specifico epitopo; riconosce sempre un solo epitopo, anche se le dimensioni dell'Ag sono >3000 Da, quindi gli Ab monoclonali non si possono legare contemporaneamente allo stesso Ag.

In laboratorio vengono usati solo i topi: si inietta l'Ag, si fanno le varie vaccinazioni e poi si va a prelevare la milza (organo in cui si vanno a differenziare le plasmacellule), in cui ci sono molte plasmacellule che producono Ab verso l'Ag iniettato. Il problema è che le plasmacellule prese dalla milza del topo non sopravvivono, possono essere mantenute vive al massimo per 3-4 giorni, dopodiché si trasformano, quindi è necessario deportarle e per fare ciò si prende un mieloma (tumore), quindi le cellule continuano a crescere ogni volta che il materiale viene scongelato. Esiste una tecnica risalente agli anni '70 che permette di prelevare una cellula "originale" del topo e una tumorale e fonderle insieme, quindi una plasmacellula viene resa tumorale e acquisisce la capacità di sopravvivere, allo stesso tempo la cellula tumorale acquisisce la capacità di produrre Ab, mentre tutte quelle che non si fondono muoiono. Il vantaggio è che si possono congelare e scongelare, anche più volte.

In generale nella clonazione si isola una singola plasmacellula e se ne fanno crescere altre tutte uguali.

Cross-reattività: molecole simili possono avere epitopi uguali o simili e quindi essere riconosciute dallo stesso anticorpo. La cross-reattività dipende dall'accuratezza del test. Gli Ag per quanto siano diversi hanno delle parti che possono essere simili o uguali, vale per qualsiasi Ag e aptene; ad esempio gli ormoni steroidei hanno tutti una struttura derivante dal colesterolo, funzioni diverse e reagiscono su molecole diverse, nonostante questo però hanno delle parti della struttura uguali, quindi un Ab riconosce quella parte e si ha cross-reattività. Gli ormoni che possono dare cross-reattività sono steroidei (es estradiolo e testosterone), glicoproteici ipofisari (TSH, LH e FSH hanno la stessa subunità α), GH e PRL della stessa specie animale.

Quando un Ab riconosce il suo Ag si lega con un legame non covalente (H, forze di coulomb, forze di Van der Waals), il quale si forma tra i residui amminoacidici nelle regioni ipervariabili dell'Ab e i gruppi chimici dell'Ag nell'epitopo. La forza con cui si lega un Ag a un Ab può essere quantificata, quindi si può sapere l'affinità di legame Ag-Ab grazie alle costanti di associazione (K_a) e dissociazione (K_d): $Ab + Ag \rightleftharpoons Ab-Ag$, in condizioni fisiologiche si può sapere quanto è spostata verso destra la reazione, più è spostata, più si forma il complesso Ag-Ab e più sono affini. K_a e K_d sono calcolate facendo il rapporto all'equilibrio tra la concentrazione dei reattivi che hanno reagito (complessi Ag-Ab formati) e quelli liberi (Ab e Ag): $K_a = 1/K_d = [Ab-Ag]/[Ag][Ab]$ (moli/litro). Maggiore è l'affinità tra Ab e Ag, maggiore è la concentrazione del complesso Ag-Ab (la reazione è spostata verso destra), maggiore è la K_a e minore la K_d . Gli Ab monoclonali usati nelle tecniche immunochimiche hanno K_d tra 10^{-6} e 10^{-10} M, quindi la quantità di Ab e Ag liberi è molto bassa.

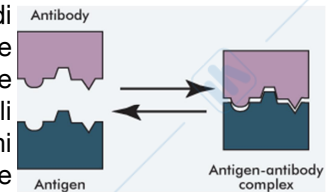
La forza di legame Ag-Ab, quindi quanto la reazione è spostata verso destra, dipende da:

-complementarietà tra Ab e Ag;

-temperatura, pH e concentrazione ionica totale del mezzo nel quale avviene l'interazione.

Per ogni Ab c'è una K_d che indica una maggiore affinità del complesso Ag-Ab; se l'epitopo è uguale, l'Ab ha la stessa K_d per i due Ag. Nella cross-reattività l'Ab riconosce Ag di molecole simili, ma si lega con affinità diversa (K_d diversa), quindi la cross-reattività dipende dall'affinità di legame Ag-Ab (anche se è diversa, si formano comunque i complessi Ag-Ab). Il numero dei complessi Ag-Ab che si creano dipende sia dall'affinità dell'anticorpo per i diversi antigeni sia dalle concentrazioni degli Ag; mantenendo fissa la concentrazione di un anticorpo posso ottenere lo stesso numero di complessi Ag-Ab con due antigeni diversi aumentando la concentrazione dell'antigene che ha meno affinità. In una soluzione nella quale è presente un Ab e Ag simili, si formano complessi Ag-Ab in concentrazione proporzionale sia all'affinità di legame tra l'Ab e i vari Ag sia alla concentrazione dei vari Ag.

L'attitudine di un Ab di riconoscere la molecola studiata in dosaggi immunochimici si esprime come percentuale di cross-reattività (calcolata con il test ELISA). La cross-reattività nei test immunochimici è un problema perché un Ab può riconoscere Ag simili e gli Ag potrebbero essere in concentrazioni particolari; riguarda tutte le molecole, sia proteiche che non.



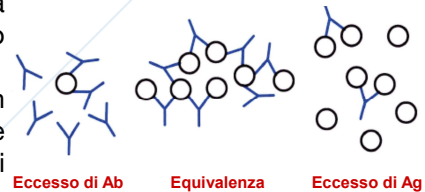
Oltre alla cross-reattività tra proteine, c'è anche il problema della specie-specificità: la stessa proteina in specie diverse ha sequenze amminoacidiche diverse, quindi un Ab che riconosce una proteina non è detto che riconosca la stessa proteina di un'altra specie. Un Ab può avere Kd diverse e quindi reattività diversa per la stessa proteina di specie diverse: se riconosce un epitopo che è uguale nelle diverse specie ha la stessa Kd, se riconosce epitopi diversi tra le specie ha Kd diverse, se l'epitopo è completamente diverso tra le specie l'Ab lo riconosce in una specie ma non nell'altra. L'attitudine di un Ab di riconoscere la stessa proteina di specie diverse si esprime come percentuale di specie-specificità.

La specificità di metodi immunochimici e degli anticorpi utilizzati per il dosaggio di proteine è espressa con valori di: cross-reattività (reattività con proteine simili della stessa specie) e specie-specificità (reattività con la stessa proteina in specie diverse).

Ad esempio per dosare il GH del suino si usa l'Ab preso dal cane, perché GH di suino e cane hanno la stessa sequenza amminoacidica.

Il problema dell'utilizzo di sostanze specie-specifiche o no dipende dalla natura della sostanza (se sono proteine o no); quindi se si usano proteine nei test immunochimici si deve considerare la specie.

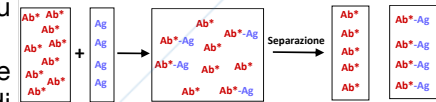
Classificazione dei metodi immunochimici: lo scopo è mettere in evidenza la formazione di complessi Ag-Ab in modo da poter rivelare e quantificare una delle due molecole. Ci sono due grosse categorie di test:



-test che usano Ab e Ab non marcati→ si usano Ab o Ag semplici senza legare niente di artificiale, vengono messi insieme e si vede se si forma il complesso. Lo svantaggio è che sono semplici, hanno un limite di rilevabilità molto basso; l'unica eccezione è il test della immunonefelometria che permette di rilevare Ag e Ab anche a concentrazioni molto basse.

Spesso si usano i test non marcati solo per cercare Ab, mentre gli Ag sono in concentrazioni troppo basse per essere rilevati. Di questi test fa parte l'immunodiffusione in gel di agar. I test che usano Ag o Ab non marcati si basano sulla immunoprecipitazione, la quale si basa sul principio che ogni Ab ha due siti di legame per l'Ag e può quindi legare due Ag contemporaneamente (non se Ab è monoclonale o troppo piccolo e gli epitopi non sono sufficientemente lontani). Tra un Ab e il suo Ag esiste uno specifico rapporto di concentrazioni reciproche (equivalenza) al quale si forma un "reticolo" di grosse dimensioni, che precipita; sopra e sotto a questo rapporto di equivalenza c'è un eccesso di Ab o Ag che non permette la formazione di un aggregato con dimensioni sufficienti per precipitare. L'immunoprecipitazione può avvenire solo con Ag con più epitopi e di dimensioni sufficienti a legare più anticorpi contemporaneamente e solo con Ab policlonali.

Nell'immunodiffusione in gel di agar (immunoprecipitazione in fase solida) le soluzioni di Ab e/o Ag sono messe in un sottile strato di gel di



agarosio diluito in tampone fisiologico e solidificato su una piastra petri o su un vetrino; nel punto in cui le concentrazioni di Ab e Ag sono all'equivalenza si forma una netta linea di precipitazione.

-test che usano Ab e Ag marcati→ sono molto sensibili e hanno limiti di rilevabilità molto buoni. Con questi test è facile rilevare gli Ag; vengono usati per quantificare sia Ag che Ab. Si sviluppa un colore in conseguenza alla marcatura. Di questi fanno parte RIA, IRNA, EIA, ELISA.

Nei test con Ag o Ab marcati si unisce la specificità della reazione immunologica con la sensibilità delle tecniche di rivelazione della marcatura, quindi non si vede il complesso Ag-Ab ma la conseguenza. Prevedono (tranne eccezioni) un passaggio di separazione tra Ag e Ab che non hanno reagito e complessi Ag-Ab. Sono classificati a seconda del tipo di "separazione" e a seconda della marcatura e "dell'architettura" del test (indiretta, competitiva, sandwich o sandwich con amplificazione). In tutti i test si aggiunge un Ag o un Ab marcato e si va a quantificare il segnale emesso solo dal complesso Ag-Ab. I sistemi eterogenei richiedono la separazione tra frazione libera e legata prima della misurazione del segnale emesso da Ag-Ab; l'eccezione è rappresentata dai sistemi omogenei, in cui il segnale emesso dal complesso Ag-Ab viene misurato senza la separazione tra frazione libera e legata.

Metodi di separazione dei test con Ab e Ag marcati: nei metodi eterogenei la separazione dei complessi Ag-Ab dagli Ab e Ag liberi può avvenire in fase liquida o in fase solida (più utilizzate). Nelle separazioni in fase liquida si hanno delle soluzioni, queste separazioni si basano essenzialmente sul fatto che i complessi Ag-Ab hanno dimensioni diverse rispetto ad Ab e Ag non legati. Nelle separazioni in fase solida uno dei due reattivi è legato fisicamente a qualcosa di solido, ad esempio provette, piastre, stick, palline; in questo caso la separazione tra complesso Ag-Ab e Ab e Ag liberi viene fatta ad esempio svuotando la provetta.

Un'altra differenziazione dei sistemi eterogenei riguarda cosa marcano: ci sono sistemi che marcano enzimi (EIA, ELISA), altri marcano sostanze fluorescenti (FIA; es europio è un atomo molto piccolo, si può legare all'Ab o Ag senza interferire con essi), altri ancora sostanze chemiluminescenti o sostanze radioattive. I più utilizzati sono gli enzimi, seguiti dalle sostanze fluorescenti.

Il metodo più utilizzato è il test ELISA, che ha separazione in fase solida.

Dosaggi immunoenzimatici (EIA): Ag o Ab sono marcati con un enzima, mediante un legame covalente tra residui aminoacidici dell'enzima e gruppi chimici dell'Ag o Ab; è importante che l'enzima ci sia solo se si è formato il complesso Ag-Ab. Il complesso Ag-Ab è evidenziato misurando l'attività enzimatica: si aggiunge il substrato specifico dell'enzima e si misura la quantità di prodotto che si forma; la quantità di prodotto della reazione enzimatica è proporzionale a quella dell'Ag-Ab.

Gli enzimi che vengono legati all'Ab o Ag nel test ELISA e quindi vengono usati maggiormente in laboratorio sono: -perossidasi di rafano (HRP)→ la perossidasi è un enzima che si trova nei mitocondri, serve per togliere la H_2O_2 che si forma quando si ha la riduzione dell' O_2 a H_2O . La HRP è un enzima usato in laboratorio, che ha come substrato la H_2O_2 , ma cambia il donatore di e^- , perché nel mitocondrio i donatori sono NAD e FAD ridotto, glutatione ridotto, mentre in questo caso i donatori sono sostanze chimiche ridotte (ABTS diventa verde a λ 405 quando cede gli e^- ; OPD diventa arancione a λ 490; luminolo emette luce). Si misura l'ABS e da essa si risale alla concentrazione.

-fosfatasi alcalina (AP)→ il substrato è l'acido BCIP che quando viene defosforilato diventa azzurro; si misura l'ABS a 490, più è alta più la concentrazione è maggiore. Può essere fatta anche in luminescenza.

Il prodotto della reazione enzimatica è quantificato con metodiche basate sull'energia radiante e a seconda dell'enzima utilizzato per la marcatura e del substrato formato si usano calorimetria, luminometria, spettroscopia di riflettanza o fluorimetria.

A seconda dell'architettura possiamo distinguere tre tipi più comuni di test: -per quantificare Ab→ ELISA con Ab-anti-Ab (ELISA indiretto);

-per quantificare Ag→ ELISA competitivo o ELISA a doppio Ab (sandwich).

ELISA con Ab-anti-Ab per quantificare Ab (ELISA indiretto): l'Ag è legato alla fase solida, poi si aggiunge il siero da testare e si lascia incubare per 1-12h (dipende dall'attività dei reattivi). La reazione deve avvenire in condizioni ideali, quindi si usano soluzioni tampone in cui vengono controllati concentrazione salina, pH e temperatura.

Una volta aggiunto il campione e lasciato incubare, gli Ab si legano al fondo della provetta e per fare la separazione tra Ab legati e non legati si fa un lavaggio, quindi si aggiunge il tampone con dentro del sapone e si fanno 2-3 lavaggi in modo che tutto quello che non si è legato in modo forte e con alta affinità venga eliminato. Per rivelare il complesso Ag-Ab si utilizza un Ab anti-Ab (reattivo chiave) specie-specifico marcato con enzima. L'Ab anti-Ab riconosce gli Ab di uno o più isotipi (IgG, IgM, IgE, IgD, IgA) di una specie animale indipendentemente dalla loro specificità antigenica, quindi è possibile utilizzare lo stesso Ab marcato per diverse patologie nella stessa specie, ma è necessario avere Ab specifici per la stessa patologia in specie diverse. L'Ab anti-Ab è specifico per una certa specie e per un determinato isotipo o per più isotipi.

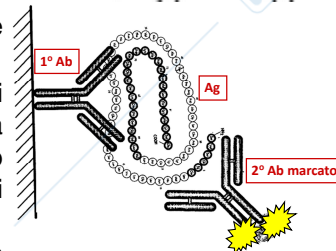
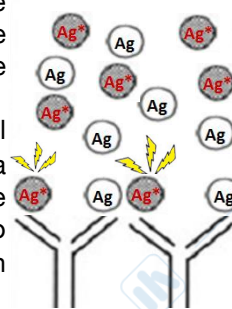
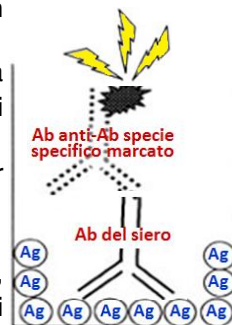
Dopo un lavaggio che elimina gli Ab marcati che non si sono legati in modo specifico ai complessi Ag-Ab sulla fase solida si aggiunge il substrato dell'enzima. La concentrazione degli Ab nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto della reazione enzimatica (risposta del test).

ELISA competitivo per quantificare Ag: è usato per dosare qualsiasi tipo di Ag, qualunque sia il PM, però spesso si usa per gli Ag a basso PM che non possono legare contemporaneamente due o più Ab (anche se hanno più epitopi) e nel caso di alcune eccezioni, come l'insulina (PM 7000).

L'Ab specifico per l'Ag che si vuole dosare è legato alla fase solida, si aggiunge il campione di plasma da testare e contemporaneamente si aggiunge una quantità nota dello stesso Ag marcato con un enzima. Si ha quindi una competizione tra l'Ag presente nel campione (libero) e l'Ag marcato aggiunto al campione per il legame con un Ab legato alla fase solida. Con un lavaggio si eliminano le molecole (Ag) che non si sono legate in modo specifico all'Ab. Per rivelare i complessi Ag-Ab si aggiunge il substrato dell'enzima. La concentrazione dell'Ag nel campione è inversamente proporzionale alla risposta dell'enzima (test competitivo).

ELISA sandwich per quantificare Ag: ELISA a doppio Ab si può usare solo per gli Ag che hanno un $PM > 3000$ Da, quindi essenzialmente per le proteine. Se l'Ag ha un $PM > 3000$, ha due epitopi ed è in grado di legare più Ab contemporaneamente, si usa sempre questo metodo, mentre in tutti gli altri casi si usa il competitivo.

Un primo Ab specifico per l'Ag è legato alla fase solida, si aggiunge il campione di plasma/siero da testare, con un lavaggio si eliminano le molecole (Ag) che non si sono legate in modo specifico all'Ab. Poi si aggiunge un secondo Ab marcato specifico per l'Ag che si vuole dosare e che si è eventualmente legato al primo Ab. L'Ag da determinare fa da ponte tra il primo Ab legato alla fase solida e il



secondo Ab marcato (si forma un sandwich). Con un secondo lavaggio si eliminano tutte le molecole (Ab marcati) che non si sono legate in modo specifico all'Ag legato al primo Ab. Per rivelare i complessi Ab-Ag-Ab si aggiunge il substrato dell'enzima. La concentrazione dell'Ag è direttamente proporzionale alla risposta del test.

I due Ab (quello legato alla fase solida e il marcato) devono legare due epitopi diversi (policlonali oppure monoclonali diversi); se si usa un siero policlonale si usa sempre lo stesso reattivo, se è monoclonale si deve fare attenzione che i due monoclonali siano diversi.

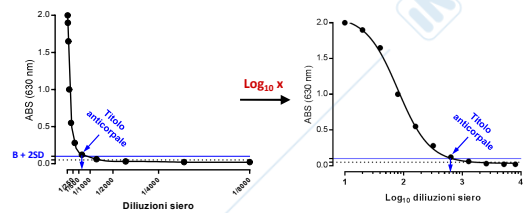
Sistemi di amplificazione del segnale: esistono molti sistemi in cui Ab o Ag non sono legati direttamente all'enzima, ma a un'altra molecola, e questi sistemi prevedono un'amplificazione. Un esempio è il test ELISA sandwich con amplificazione biotina-avidina: la biotina è una vitamina coinvolta nelle reazioni di decarbossilazione, nel test si prende la biotina e si lega all'Ab o Ag e il vantaggio è che per ogni Ab si riescono ad attaccare 30-40 biotine, quindi l'Ab o Ag è biotunilato. I passaggi successivi sono come nel test ELISA sandwich, però in particolare si aggiunge un enzima in grado di riconoscere la biotina, ovvero l'avidina perossidasi. L'avidina è una sostanza molto affine alla biotina, quindi se si aggiunge a una provetta con un Ab legato alla biotina queste si legano e visto che l'avidina è legata alla perossidasi, si lega l'enzima (sistema amplificato: per ogni Ag si hanno 10 perossidasi).

Dal risultato strumentale di un test immunochimico alla quantificazione dell'analita: si usa uno strumento che dà dei valori, i quali vengono usati per costruire una curva dose-risposta e con la curva con l'equazione si può confrontare il risultato con i valori presenti.

Nel dosaggio degli Ag con i test ELISA si ottiene la quantità di Ag sotto forma di concentrazione (mM).

Nel dosaggio degli Ab si usa l'ELISA con Ab-anti-Ab e in questo caso la quantità di Ab in un plasma o siero non viene espressa come un valore assoluto di concentrazione, ma in *titolo anticorpale*, che è un numero relativo. Quando si ha un titolo anticorpale bisogna sempre scrivere con che metodo si è svolto il test, perché cambiando il metodo cambia il risultato.

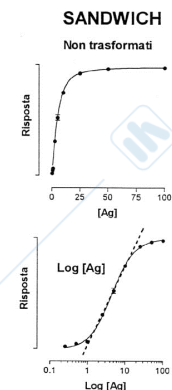
Per ottenere il titolo anticorpale si deve prendere il test immunochimico e diluire serialmente i campioni di siero, quindi ad esempio lo stesso campione si dosa 5 volte con diluizioni seriali (1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) e si ottengono campioni con colori da scuri a chiari. Il titolo anticorpale è l'ultima diluizione del campione che dà un valore diverso dal bianco (reattività significativamente diversa dal bianco), cioè diverso da 0, con una specifica metodica; quindi se si ha tanto Ab si deve diluire tanto prima che scompaia il segnale, mentre se è poco si diluisce bene. Un animale malato ha un titolo anticorpale alto (es 1/5000). Il valore del titolo anticorpale dipende sia dalla concentrazione degli anticorpi nel plasma sia dalla metodica immunochimica utilizzata (metodo di dosaggio) per rilevare gli anticorpi; migliore è il limite di rilevabilità della metodica, più sarà alto il titolo anticorpale determinato per uno stesso siero. NB: se cambio metodo, cambia il risultato!



Per capire qual è l'ultima diluizione diversa dal bianco si può guardare il campione o si possono misurare i valori in ABS (all'aumentare della diluizione diminuisce l'ABS), quindi si trasformano in un grafico e si va a vedere qual è l'ultima diluizione diversa dal bianco. La curva dose risposta è composta da dose rappresentata dalle diluizioni e risposta rappresentata dall'ABS. Il titolo anticorpale è il segnale superiore a quello della media dei valori del bianco con l'aggiunta di 2DS (deviazione standard). Il problema degli ELISA è che l'aumento della diluizione non è lineare, ma è di tipo iperbolico, quindi per trasformarla in una curva sigmoide si fa il logaritmo delle diluizioni. Per trovare il valore del titolo anticorpale si prende il valore del bianco, il punto sull'asse delle y e si va a vedere dove incrocia la curva; quindi per calcolare il titolo anticorpale dose (diluizioni) e risposta (ABS) vengono messe su un grafico cartesiano e si individua l'intercetta con la linea del bianco (media dei valori del bianco + 2DS).

Per la quantificazione degli antigeni in un plasma o un siero si usano degli standard; le soluzioni presentano una concentrazione nota dell'Ag, si prende lo standard, si dosa tot volte a tot concentrazioni diverse e si ottiene un grafico dose-risposta con risposta del test sull'asse delle y e concentrazioni degli standard sull'asse delle x. Si deve ottenere una retta, quindi si fanno delle trasformazioni del risultato ottenuto dal test ELISA. Il risultato ottenuto dal dosaggio del campione presente nella curva dose-risposta si deve confrontare con i valori dei campioni standard. Nel test sandwich all'aumentare della dose, la risposta aumenta; nel competitivo all'aumentare della concentrazione dell'Ag, la risposta cala, perché c'è una dose fissa di Ag marcato.

Nel test immunochimico sandwich ci sono una serie di diluizioni standard a concentrazioni note, si vede come l'ABS scende. Spesso i campioni e gli standard vengono fatti in doppio o triplicato, cioè vengono dosati in due o tre provette, per vedere se sono corretti.



Si hanno dei valori di ABS e standard, si fanno le medie di ABS1 e ABS2 rispetto alla concentrazione standard. All'aumentare della concentrazione aumenta l'ABS in modo iperbolico, quindi si costruisce una curva dose-risposta iperbolica e agli estremi perde di proporzionalità; per trasformare la curva iperbolica in lineare si deve fare il logaritmo (si ha il log sia alla x che alla y); il vantaggio della trasformazione è capire quali sono i punti con una risposta lineare. Quindi si fa la retta di regressione e si ottiene un risultato log della concentrazione dell'Ag. In laboratorio si deve controllare la parte lineare della retta e se cambia la retta, cambia il risultato.

Nel test immunochimico competitivo ci sono sempre degli standard, ma il procedimento è diverso, perché sull'asse delle y la risposta non viene espressa con valori assoluti ma con valori in percentuale rispetto al valore massimo possibile (concentrazione zero dell'Ag libero); inoltre, al diminuire della concentrazione il segnale aumenta, quindi al diminuire della concentrazione, l'ABS aumenta. Ci sono sempre 1, 2 o 3 provette indicate come B0, che è il campione standard che presenta solo l'Ag marcato (lettura massima), B0 è il valore massimo (concentrazione 0 dell'Ag libero), poi da esso il valore può solo scendere. Si riporta lo standard su un grafico: sull'asse delle y si mette una trasformazione dell'ABS (non l'ABS), ovvero un valore che indica quanto è in % la lettura dei campioni o standard rispetto a B0, quindi si fa $B/B_0 \times 100$; B è la lettura strumentale ottenuta sugli standard contenenti l'Ag libero da quantificare. Sull'asse x si mette il logaritmo della concentrazione, sull'asse y $B/B_0\%$; all'aumentare della concentrazione, B/B_0 diminuisce, come l'ABS però in %. La trasformazione in $B/B_0\%$ della risposta del test garantisce una migliore riproducibilità del risultato, perché il risultato dipende da quanto è marcato l'Ag, e facilita il confronto tra le letture strumentali ottenute con la stessa metodica ma in tempi diversi.

La curva dose-risposta è sempre iperbolica e agli estremi perde di proporzionalità; si fa il logaritmo dei valori delle concentrazioni (asse delle x) per trasformare la curva che interpola i punti dose-risposta degli standard da iperbolica a sigmoide, poi si scelgono i punti lineari e su questi si calcola una retta di regressione, si mettono i valori dei campioni e si confrontano campioni e standard.

Ci sono ELISA che non usano l'ABS, ma fluorescenza o luminescenza, comunque il metodo è lo stesso.

Lateral flow immunoassay: esistono test immunochimici di tipo qualitativo, come il test lateral flow immunoassay. Per interpretare il dato in modo corretto ci sono due diversi sistemi: -con Ag o Ab legati a particelle solide colorate (latex)→ le particelle solide danno il colore ad Ag o Ab.

-con Ag o Ab coniugati con enzima→ reattivi marcati con un enzima.

Tutti si basano sui concetti di sandwich e competitivo, come l'ELISA, quindi ci sono reattivi marcati per Ag o Ab.

Per la ricerca di Ag sono usati test su Filariasi, cortisolo, T4, FeLV, Parvovirus, Giardia e Cimurro; per il dosaggio degli Ab sono usati test su FIV, Leishmaniosi, Tubercolosi, Anaplasmosi, Borreliosi ed Ehrlichiosi, sono test evoluti, si può vedere in contemporanea se ci sono più Ag o anche un Ab.

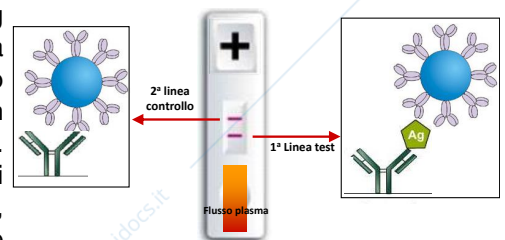
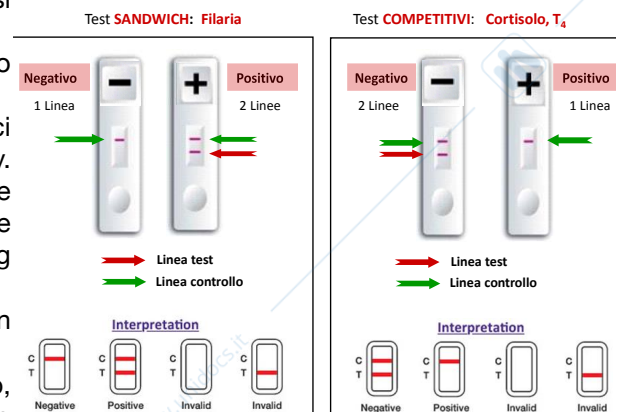
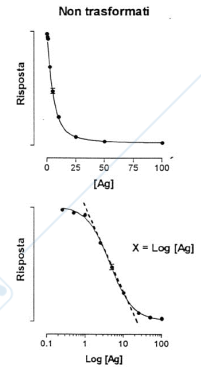
Nei sistemi lateral flow per la ricerca di Ag con particelle colorate si usano test sandwich quando gli Ag sono grossi, ad esempio nella Filariasi l'Ag ha un alto PM, invece si usano test competitivi per gli Ag che hanno un PM minore, come la T4; il risultato dei due test è diverso.

Il test sandwich per la Filariasi prevede un risultato positivo se c'è segnale e si hanno 2 linee, mentre se è negativo si ha 1 linea; il test competitivo per la T4 o il cortisolo prevede un risultato positivo dato da una linea, invece il negativo è dato da 2 linee. La linea del test è presente se è sandwich, assente se competitivo; la seconda linea è di controllo e deve essere sempre presente, se no il test non viene considerato valido.

Nei sistemi lateral flow con particelle colorate per la ricerca di Ag si ha un foglietto di carta assorbente, in cui è presente una zona in cui viene messa la goccia del prodotto da misurare e poi quello che c'è dentro inizia a fluire, per capillarità si trasferisce e va in un'altra zona in cui sono presenti i reattivi dei test immunochimici.

I reattivi rimangono attaccati a questa zona fino al momento in cui arriva un liquido, poi si ha un mescolamento di latex e plasma, quindi le particelle solide si staccano. Sia nel test sandwich che nel competitivo le particelle solide colorate sono rivestite di Ab specifici per l'Ag cercato e quando arriva il liquido se c'è l'Ag, le particelle si attaccano.

COMPETITIVO



In entrambi i test la zona di controllo è posta dopo la zona test, quindi le particelle scrono e si fermano solo quando c'è l'Ab contro l'Ag, quindi quando riconoscono l'epitopo diverso da quello che è già stato riconosciuto; sulla linea C sono immobilizzati degli Ab anti-Ab specie-specifici per gli Ab legati alle particelle colorate.

Nel test sandwich per la ricerca di Ag sulla linea test sono immobilizzati Ab specifici per gli Ag cercati. Se è presente l'Ag, fa da ponte tra l'Ab immobilizzato sulla linea e quello sulle palline (sandwich) e compare una linea colorata; sulla linea controllo (si deve formare sempre, anche se non c'è l'Ag) sono immobilizzati degli Ab anti-Ab specie-specifici che riconoscono gli Ab legati alle particelle colorate. Se il flusso del campione di plasma è stato regolare, compare sempre una linea colorata. Esistono test sandwich per *Filaria*, LH e HCG nel cane e nel gatto.

Nel test competitivo il risultato è al contrario: sulla linea T sono immobilizzati Ag uguali a quelli cercati, sulla linea controllo sono immobilizzati Ab anti-Ab. L'Ag nel plasma, se presente, satura gli Ab sulle palline e impedisce il loro legame con gli Ag immobilizzati sulla linea, quindi la linea si forma solo in assenza di Ag nel campione. Se il flusso del plasma è stato regolare, compare sempre una linea colorata.

Nei *lateral flow per la ricerca di Ab con particelle colorate* si cerca se ci sono gli Ab, quindi se c'è la risposta immunitaria. Ci sono diversi tipi di test, il più comune è quello in cui il risultato positivo è dato da 2 bande, il negativo 1, si basa sempre sull'interazione Ag-Ab. Ci sono particelle colorate rivestite dall'Ag specifico per l'Ab cercato; sulla linea test sono immobilizzati gli Ag specifici per l'Ab cercato, sulla linea controllo sono immobilizzati degli Ab specifici per l'Ag di cui è rivestita la particella. Se c'è l'Ab (un Ab lega 2 Ag), quando arriva alla linea test si lega all'Ag e compare la banda, invece se non è presente, non compare.

Per quanto riguarda i *sistemi lateral flow con reagenti coniugati con enzima* i risultati non sono linee, ma macchie e il vantaggio di questi test è il limite di rilevabilità basso, quindi si rilevano Ag o Ab anche quando la concentrazione è bassa, e in più si può combinare la ricerca di diversi Ab o Ag.

Per gli Ag i test sono su: -*Filaria*, Parvovirus, *Giardia*, FeLV, Lipasi→ sandwich (più epitopi);

-T4, Cortisolo, acidi biliari→ competitivi (un epitopo).

Per gli Ab i test sono su FIV, Tubercolosi, Anaplasmosi, Borreliosi, Erlichiosi.

Sono usati anche per la ricerca di antibiotici, aflatossine negli alimenti; esistono dei limiti di rilevabilità dei diversi test e anche i livelli di sicurezza per legge sono diversi.

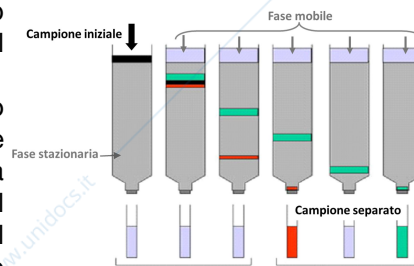
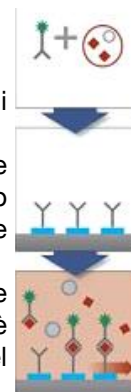
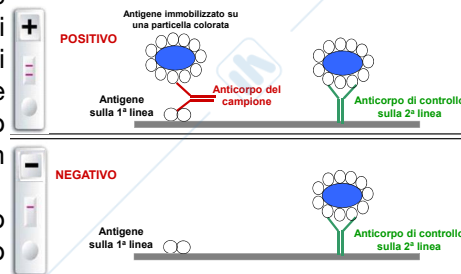
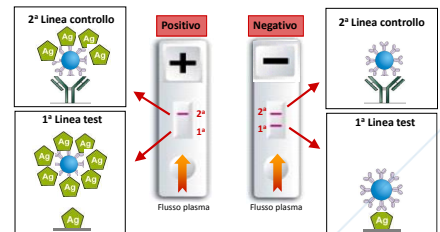
Quando i test misurano diversi Ab o Ag c'è la sigla Dx con un numero che indica quanti ne differenzia, ad esempio c'è un test (Canine SNAP 4Dx) in grado di cercare l'Ag per la *Filaria*, l'Ab per l'Anaplasmosi, l'Ab per la *Borrelia* e l'Ab per l'Erlichia. In tutti questi test c'è sempre qualcosa che deve venire positivo, come la banda di controllo dei test con particelle colorate.

Nel test sandwich con Ab coniugati con enzima per la determinazione di Ag ci sono due macchie, una del test (test spot) e una di controllo (control spot), se appaiono entrambe il test è positivo, se no è negativo. Nel test spot sono immobilizzati Ab specifici per l'Ag ricercato; nel control spot sono immobilizzati Ab anti-Ab che legano l'Ab marcato con enzima.

L'Ag presente nel campione si lega all'Ab specifico marcato con l'enzima, la striscia di nitrocellulosa è rivestita in un punto determinato con Ab specifici per l'Ag ricercato. Il complesso Ab marcato-Ag si lega all'Ab presente sulla matrice formando un tipico "sandwich". Il sistema viene attivato e una soluzione di lavaggio elimina l'Ab coniugato con l'enzima che non si è legato e i componenti del campione che non hanno reagito (fase di separazione). Il substrato dell'enzima attraversa la matrice dopo il lavaggio e reagisce con l'enzima con sviluppo di un prodotto colorato insolubile di colore blu chiaro. L'area del controllo positivo è rivestita con Ab anti-Ab che riconoscono l'Ab marcato.

Nel test competitivo con Ab coniugati con enzima per la determinazione di Ag il risultato positivo è dato da una sola macchia, il negativo da entrambe le macchie; nel test spot sono immobilizzati Ag uguali a quelli cercati, nel control spot sono immobilizzati Ab anti-Ab che legano l'Ab marcato con enzima. Il processo del lavaggio avviene come nel sandwich.

I *lateral flow per la ricerca di Ab con uso di Ag marcati con enzima* sono usati per la ricerca di Ab contro FIV, FeLV, Anaplasmosi, Borreliosi e Erlichiosi. Si hanno Ag marcati con enzima e se c'è l'Ab si viene a creare un ponte tra la macchia in cui c'è l'Ag e l'Ab marcato; si fa il lavaggio, si introduce il substrato che attraversa la matrice dopo il lavaggio e reagisce con l'enzima, quindi si forma il segnale e il risultato è positivo. L'area di controllo positivo è rivestita con Ab anti-Ab.



Metodi cromatografici: è un metodo di separazione e si può usare per qualsiasi molecola, è molto usato in analisi chimiche, tossicologiche, degli alimenti, viene usato anche per purificare una sostanza dai diversi componenti, quindi ha un'applicazione sia analitica che preparatoria. La cromatografia è una metodica che separa i componenti di una miscela per interazione selettiva tra fase mobile (liquida o gassosa) e fase stazionaria (solida). Nella cromatografia liquida (LC) la fase mobile è un liquido, mentre nella gas cromatografia (GC) la fase mobile è un gas.

Si mette il campione nell'iniettore, passa in una colonna, interagisce con una sostanza e i componenti escono separati (una va più veloce e l'altra più piano); da questa analisi si ottiene un grafico (cromatogramma, con asse y risposta e asse x tempo).

La cromatografia su colonna è quella usata più frequentemente, in questo caso la fase stazionaria è attaccata a una matrice (supporto inerte e insolubile, microparticelle) ed è dentro una colonna, mentre la fase mobile passa nella colonna e interagisce con la fase stazionaria; all'uscita dalla colonna c'è un detector che trasforma i dati del campione separato. Le colonne possono essere di diversi tipi, ad esempio acciaio o plastica, possono avere diametro e lunghezza variabili. Le matrici per la fase stazionaria possono essere di diversi materiali, come agarosio, cellulosa, poliacrilamide. Il sistema di trasporto della fase mobile nella cromatografia liquida può essere a bassa (LC, 1-5 bar) o alta (HPLC, >50 bar) pressione; in quelli ad alta pressione si possono usare colonne molto più selettive. Migliore è la risoluzione della colonna, più sostanze si mettono dentro e più si separano meglio.

Un'altra distinzione tra un sistema cromatografico e un altro si basa sul tipo di rilevazione che fanno:

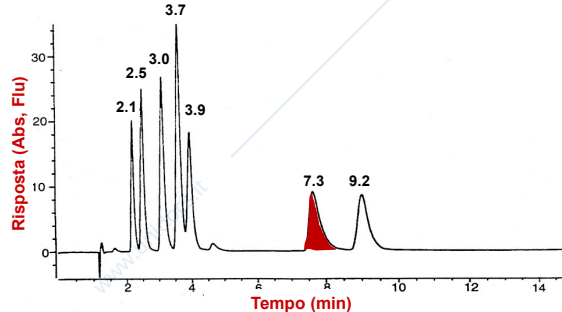
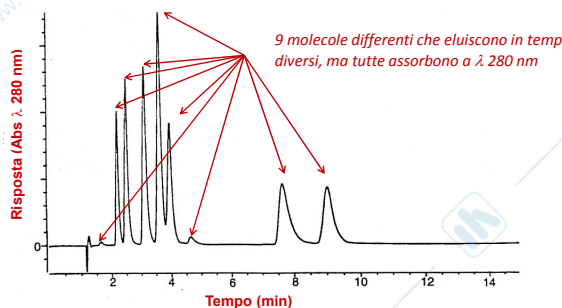
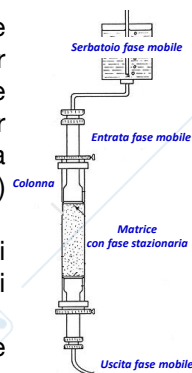
- ABS→ si sceglie la lunghezza d'onda. Lo spettrofotometro misura a una specifica lunghezza d'onda quante onde elettromagnetiche vengono assorbite. Lo spettrofotometro può avere una sensibilità molto alta (0,001ABS). Esistono altri strumenti che sono in grado di registrare l'ABS a tutte le lunghezze d'onda in un tempo di 0,01s;
- fluorescenza→ fluorimetri;
- molecole elettrochimiche→ rilevatori elettrochimici;
- PM→ spettrometro di massa dice il PM della molecola che sta passando.

Il **cromatogramma** è la rappresentazione grafica del risultato di un rilevatore: sull'asse delle y può esserci l'ABS (o altre misure) e sull'asse delle x c'è il tempo (min) o il volume di eluizione (flusso ml/min). Le sostanze sono tutte lette alla stessa lunghezza d'onda, ma vengono separate, escono in tempi diversi, quindi interagiscono con la matrice in modo diverso, e sul grafico ogni singola analita viene rappresentato con un picco. Il picco a 15 è sempre presente, perché quando si fanno le cromatografie ci sono sostanze sempre presenti nella fase mobile sia negli standard che nei campioni biologici.

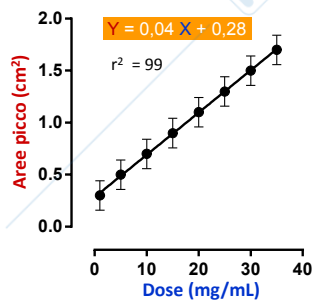
Il tempo di ritenzione è il tempo in cui un analita viene trattenuto (retention time, t_r) dalla fase stazionaria (tempo in cui esce dalla colonna) e dipende solo dalla natura chimica dell'analita e dalle caratteristiche della fase stazionaria; permette di capire quali sostanze ci sono, perché ogni sostanza esce a un tempo di ritenzione ben definito.

Quindi si prendono lo standard e il campione e si confrontano i cromatogrammi, a seconda che compaia o no un certo picco si può dire se c'è o meno una sostanza.

Per quantificare gli analiti si può calcolare l'area di ogni picco; l'importante non è l'altezza del picco, quindi



l'ABS massima, ma l'area del picco. Per sapere quanto è l'area del picco, quindi la concentrazione dell'analita, si confronta l'area del picco dell'analita nel campione con le aree ottenute analizzando campioni



Area picco nel campione = 1.22 cm²

$$y = bx + a \rightarrow y = 0.04x + 0.28$$

$$1.22 = 0.04x + 0.28$$

$$x = \frac{1.22 - 0.28}{0.04}$$

$$x = 23.5 \text{ mg/mL}$$

standard a concentrazione crescente. I risultati delle analisi sugli standard si utilizzano per costruire un grafico con sull'asse delle x la concentrazione dello standard e sull'asse delle y l'area dei picchi. Si costruisce una retta di regressione con cui si calcola la concentrazione dell'analita del quale si conosce solo l'area.

Esistono diversi tipi di cromatografia, che separano le molecole in funzione di diverse caratteristiche:

-dimensioni→ cromatografia a esclusione. Sfrutta le proprietà di setaccio molecolare di materiali porosi e la separazione degli analiti avviene in funzione della dimensione e forma. La fase stazionaria presenta composti organici polimerici con una rete tridimensionale di pori; la fase mobile è un tampone che mantiene in soluzione l'analita. La colonna è un setaccio molecolare, le sostanze grosse non entrano nei pori, quindi escono più velocemente e appaiono prima, mentre le piccole vengono trattenute, hanno velocità minore e appaiono per ultime. Nel cromatogramma le prime sono molecole grandi, le ultime sono piccole. Le sostanze rimangono dentro in funzione della dimensione e della forma, per questo si parla di esclusione.

Il flusso è continuo e il tampone non viene mai cambiato, le condizioni rimangono le stesse.

Esistono diversi tipi di setacci molecolari con diversi intervalli di frazionamento.

-polarità→ cromatografia a fase inversa. La separazione avviene in funzione di idrofobicità e polarità delle molecole.

Per la fase stazionaria si usano colonne apolari, si crea una matrice idrofobica, cioè acidi grassi a 4, 8 o 18 atomi di carbonio (tanto è più lunga la catena, tanto più idrofobica sarà la catena). La fase mobile è una miscela di acqua e solventi organici apolari; proporzioni diverse di solvente e acqua permettono di modulare la polarità della fase mobile.

Le sostanze poco solubili si legano alla fase stazionaria, quindi se le sostanze sono idrofobiche rimangono nella colonna, invece se sono idrosolubili passano e non si fermano.

Per staccare le sostanze idrofobiche si usano come solventi dei grassi gli alcol, quindi si aumenta la quantità di alcol nella fase mobile, fino a quando le sostanze escono ed escono in tempi diversi a seconda dell'idrofobicità.

-carica→ cromatografia a scambio ionico. Come la precedente, ma nella fase stazionaria ci sono particelle con cariche positive o negative, quindi le sostanze che hanno carica opposta si legano, mentre le altre passano.

La fase stazionaria è uno scambiatore ionico, in particolare è cationico se le cariche sono negative e attraggono cationi, è anionico se le cariche sono positive e attraggono anioni.

La fase mobile è un tampone con un pH superiore o inferiore di un'unità rispetto al punto isoionico dei composti che devono essere separati.

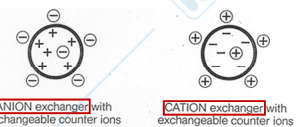
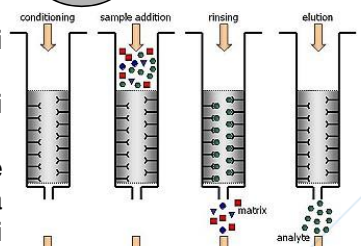
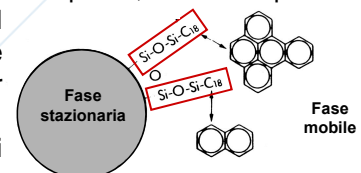
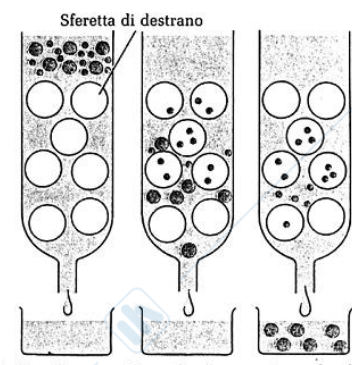
La separazione avviene a seconda della carica dell'analita (pKa del composto o pI della proteina), maggiore è la carica complessiva della molecola ionizzata, più la molecola si lega in modo forte allo scambiatore. La carica della sostanza dipende dalla proteina, la quale dipende da pI e pH, quindi ci sono cariche positive o negative a seconda della sostanza che si mette.

Per cambiare la carica si può cambiare il pH, quindi si ha il distacco e la sostanza esce. Un altro modo per staccare le sostanze è aumentare tantissimo le concentrazioni dei sali, quindi le molecole per competizione si staccano.

-attività biologica→ cromatografia di affinità, spesso usata come preparatoria a molte analisi, ad esempio quando una sostanza è molto poco concentrata, es aflatossine del latte. La separazione avviene in funzione di specifiche di interazioni biologiche.

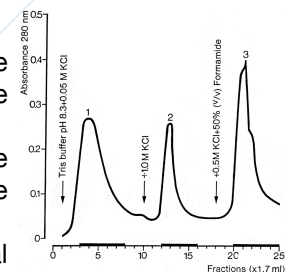
La fase stazionaria è un ligando immobilizzato, come Ab-Ag (legame non covalente), enzima-substrato, ormone-recettore, proteina A-Ab, lectina-zucchero. La fase mobile è un tampone ideale per favorire l'interazione. Il distacco della molecola adsorbita alla fase stazionaria si ottiene con una variazione pH e/o forza ionica del tampone. La forza di legame tra due molecole dipende da: complementarità tra ligando e ligante, temperatura, pH e concentrazione ionica del mezzo nel quale avviene l'interazione.

$Ab+Ag \rightleftharpoons Ab-Ag$, la reazione viene favorita verso destra nella prima fase e verso sinistra nella seconda. In questo caso il cromatogramma è un picco solo.



ANION exchange with exchangeable counter ions

CATION exchange with exchangeable counter ions



Metodi elettrochimici: sono metodi di analisi diretta, usati per misurare gli ioni di interesse clinico; si può fare sia un'analisi diretta che un'analisi indiretta. Sono molto usati in biochimica clinica per l'emogasanalisi (per sapere la concentrazione di O_2 e CO_2), per sapere le concentrazioni elettrolitiche (H^+ , Na, K, Cl, Ca, NH_4) e per la concentrazione dei metaboliti (glucosio, lattato); spesso si usano strumenti meccanizzati, che si basano sui principi teorici della cella galvanica (potenziometria) e della cella elettrolitica (voltametria o amperometria), molte volte gli strumenti sono combinati (sia cella galvanica che elettrolitica). I metodi elettrochimici si basano su reazioni elettriche e chimiche messe insieme, in particolare si hanno ossidoriduzioni che avvengono all'interno delle celle elettrochimiche, composte da due elettrodi metallici immersi in soluzioni, contenenti composti ossidabili/riducibili e connessi da un cavo, infine il circuito è chiuso da un ponte salino. Ci sono due tipi di celle:

-cella galvanica→ si basa su ossidoriduzioni spontanee, una reazione chimica che dà elettricità (es batteria-pila al litio), quindi l'energia chimica viene convertita in elettrica; il metodo potenziometrico è usato in biochimica clinica per la misurazione degli H^+ , degli ioni selettivi per Na, K, Ca, Cl e NH_4 e della concentrazione di CO_2 (emogasanalisi; la CO_2 viene trasportata nel sangue come acido carbonico, quindi in pratica si misurano le variazioni di pH).

-cella elettrolitica→ si basa su ossidoriduzioni per applicazione di un potenziale esterno, viene data la corrente, si induce una reazione chimica, quindi l'energia elettrica viene convertita in chimica; il metodo amperometrico è usato per la misurazione della pO_2 e nei biosensori per quantificare glucosio e lattato.

Misura potenziometrica con elettrodi ionosensibili: questi strumenti misurano il potenziale di membrana di ciò che si sta valutando. Il potenziale di membrana (cariche diverse ai due lati della membrana) si viene a creare perché la membrana è semipermeabile, cioè permette il passaggio selettivo solo di specifiche molecole.

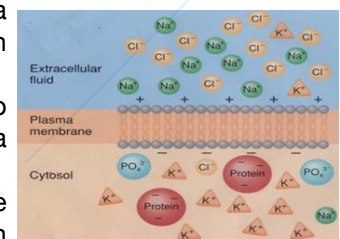
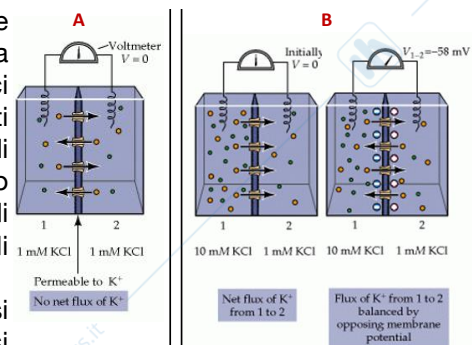
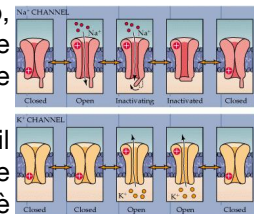
Quindi lo strumento presenta una membrana semipermeabile (a ciò che si vuole) che permette il passaggio solo di alcune molecole. Attraverso la membrana possono passare solo le sostanze idrofobiche, tutte le sostanze grosse non passano e nemmeno gli ioni passano perché sono carichi. All'interno della membrana ci sono, però, delle proteine: una grossa componente delle proteine transmembrana sono i canali, che fanno passare alcuni ioni (spesso gli anestetici vanno a modificare il funzionamento di queste proteine); questi canali sono selettivi, quindi scelgono quale ione fare passare. Negli strumenti i canali sono sempre aperti, nella cellula possono aprirsi o chiudersi in funzione di alcune situazioni, perché i potenziali di membrana nella cellula cambiano, negli strumenti no. Quindi esistono membrane che selezionano che ioni far passare.

Nel metodo elettrochimico quando si ha il trasferimento di ioni si vengono a creare differenze di cariche. L'equilibrio elettrochimico si crea tra il gradiente di concentrazione e il gradiente elettrico (che si oppone al passaggio di molecole dovuto al gradiente di concentrazione).

Esempio: due comparti (1 e 2) contengono la stessa concentrazione di KCl e sono separati da una membrana permeabile solo al K. Se si ha concentrazione uguale di K e Cl da entrambe le parti, non c'è gradiente di concentrazione e non c'è flusso di ioni K tra i due comparti ($v=0mV$). Successivamente si aumenta la concentrazione di KCl nel comparto 1 da 1mM a 10mM e si ha un movimento di ioni K verso il comparto 2, ma il Cl non passa (non permeabile); le molecole che passano al comparto 2 non condizionano la concentrazione dalle due parti della membrana, ma condizionano il potenziale di membrana. Il passaggio di K si arresta subito a causa del gradiente elettrico opposto che agisce sugli ioni K che bilancia il gradiente di concentrazione. Quindi la concentrazione degli ioni rimane uguale perché si contrappone una disposizione di carica: per ogni K che passa, rimane una carica negativa nel comparto 1 e questo si oppone al passaggio della carica successiva, di conseguenza si crea una differenza di potenziale; a causa del gradiente elettrico opposto si crea un equilibrio elettrochimico (potenziale -58mV). L'esterno della cellula è il punto convenzionale di riferimento (potenziale zero), quindi quando la concentrazione di ioni K è più alta all'interno che all'esterno si registra un potenziale con interno negativo.

La carica dipende dalla permeabilità della membrana (es permeabile al K -58 o al Cl +58), dalla concentrazione degli ioni ai due lati della membrana e dalla carica degli ioni.

Il potenziale di equilibrio può essere calcolato con l'equazione di Nernst, che appunto dice il voltaggio che si viene a creare ai due lati di una membrana in determinate situazioni. L'equazione di Nernst a temperatura ambiente e sostituendo il logaritmo naturale con il logaritmo in base 10 diventa $V = (58/Z) \log(C_2/C_1)$, V =potenziale di



equilibrio per uno ione, Z =valenza ione, C =concentrazioni ioniche; se la membrana è permeabile a Cl si ha -58, se è permeabile a Na +58.

In condizioni fisiologiche si ha un potenziale di -70mV. La membrana di una cellula a riposo è permeabile al K, quindi il potenziale di membrana è negativo (140mM intracellulare e 5mM extracellulare); poi quando arriva lo stimolo nervoso la permeabilità cambia, si aprono i canali Na, quindi il potenziale di membrana diventa positivo. In generale la permeabilità relativa del doppio strato di fosfolipidi della membrana citosolica è diversa in funzione delle differenti classi di molecole; più le molecole sono piccole, idrofobiche e meno fortemente associate all'acqua, più rapidamente possono diffondere attraverso la membrana citoplasmatica.

In laboratorio l'equazione di Nernst si usa per ottenere la concentrazione degli ioni nei diversi compartimenti. Lo strumento ha una membrana semipermeabile a ciò che si vuole. Nel pHmetro c'è una membrana semipermeabile agli H^+ , invece in uno strumento ionosensibile a un altro ione la membrana è permeabile a quello specifico ione, quindi si può decidere a quale ione la membrana sia permeabile. Gli elettrodi ionosensibili sono costituiti da un involucro che racchiude un elettrodo metallico immerso in una soluzione di uno specifico ione a concentrazione nota. La parte sensibile è costituita da una membrana tra le cui interfacce si stabilisce una differenza di potenziale dovuta alla differenza di concentrazione esistente tra la soluzione di riferimento e quella contenente l'analita e nelle quali è immerso l'elettrodo a membrana; il funzionamento dell'elettrodo ionoselettivo è descritto dall'equazione di Nernst.

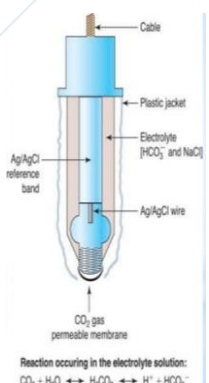
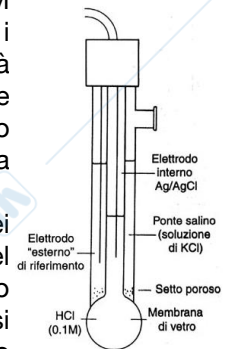
La parte attiva è un bulbo di vetro molto sottile permeabile agli ioni H^+ . All'interno del bulbo con una soluzione a pH noto, quando il bulbo è immerso in una soluzione si crea una differenza di potenziale fra le due soluzioni il cui valore dipende dal pH della soluzione esterna. La differenza di potenziale può essere misurata collegando le due soluzioni mediante due elettrodi di riferimento: uno interno e uno esterno. Gli elettrodi sono combinati: il riferimento esterno è assemblato, immerso in una soluzione di KCl e in comunicazione con la soluzione in analisi mediante un setto poroso; l'altro elettrodo risente della concentrazione della soluzione. L'elettrodo a vetro e quello di riferimento sono progettati per dare un potenziale nullo a pH=7; la taratura richiede l'uso di una soluzione a pH=7, una a pH=4 e una a pH=9. Il potenziale generato dipende dalla temperatura, il cui effetto può essere compensato; più ci si allontana dal pH=7 (punto isopotenziale), più l'effetto della temperatura aumenta e più si deve applicare la compensazione. Quando la concentrazione degli ioni è uguale dentro e fuori si ha pH 7.

Per il sangue sono sufficienti 20-50 μ l e termostato a 37°C; la precisione è nell'ordine di 0.001 unità di pH.

Negli elettrodi ionosensibili la membrana degli elettrodi è permeabile a uno ione specifico, quindi ci sono elettrodi ionoselettivi come il pHmetro che misurano gli H^+ e altri che misurano altri ioni, quindi la selettività riguarda altri ioni, ma il metodo è lo stesso. La membrana dell'elettrodo è permeabile a specifici ioni, la risposta dell'elettrodo è funzione logaritmica della concentrazione di un certo ione. In biochimica clinica sono utilizzati per la determinazione del Na e K, Cl e Ca nel siero e nel sangue. Ci sono anche strumenti per la misurazione di ioni di interesse tossicologico. In generale si possono misurare ioni e qualsiasi molecola che è in grado di creare un potenziale.

Misura potenziometrica con elettrodi gas-sensibili: vengono usati per la misurazione della pCO_2 . Lo strumento è come un pHmetro, ma in questo caso il pH è condizionato dalla concentrazione della CO_2 . La CO_2 viene trasportata nel sangue in diversi modi: 10% disciolta, 20% legata all'emoglobina al gruppo NH_2 terminale, 70% sotto forma di HCO_3^- (l'anidrasi carbonica è un enzima presente nei globuli rossi che è in grado di trasformare CO_2+H_2O in $H^++HCO_3^-$). HCO_3^- condiziona il pH del plasma: per misurare la CO_2 in un liquido si va a vedere quanto HCO_3^- si forma in una soluzione. Quindi si prende un pHmetro e si mette in una soluzione con solo CO_2 . C'è una membrana di teflon permeabile a CO_2 , la CO_2 passa, viene a contatto con una soluzione di $NaHCO_3/NaCl$, reagisce con l'acqua e si forma H_2CO_3 , che si dissocia in $H^++HCO_3^-$ e abbassa il pH, di conseguenza il pHmetro misura quanta CO_2 c'è in funzione di quanto HCO_3^- si forma; se c'è tanta CO_2 , il pH è basso, se è poca, il pH è alto.

Metodi di amperometria: quando tra due elettrodi viene applicata una differenza di potenziale, misurata in Volt (V), si genera una corrente elettrica (flusso di cariche elettriche attraverso un materiale conduttore). La quantità di carica che scorre nell'unità di tempo è l'intensità di corrente (I), misurata in Ampere (A). Quindi questi metodi misurano gli Ampere, cioè quanti elettroni passano (non differenza di potenziale, ma flusso di elettroni!). Quindi si chiama amperometria perché si va a vedere come varia un certo numero di Ampere in funzione della reazione. I metodi di amperometria si usano per misurare la pO_2 : se si riduce con 4 elettroni, per ogni molecola di O_2 si forma una molecola di H_2O . Ci sono sistemi in grado di estrarre elettroni anche da altre molecole e sono usati per quantificare glucosio e lattato.



Reaction occurring in the electrolyte solution:
 $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$

Nell'elettrodo a ossigeno di Clark ci sono due elettrodi, anodo e catodo, e il flusso di elettroni dipende da quanto ossigeno viene a crearsi. Anodo e catodo sono immersi in una soluzione di KCl e sono separati dal campione di sangue da una membrana di polipropene o teflon sottile e permeabile all'O₂. Agli elettrodi si applica una tensione di polarizzazione di 650 mV (0.5-0.8 V): il catodo di platino diventa negativo (O₂+4H⁺+4e⁻→2H₂O, riduzione) e l'anodo d'argento diventa positivo (4Ag+4Cl⁻→4AgCl+4e⁻, ossidazione). Per ogni molecola di O₂ che diffonde sono necessari 4e⁻, quindi misurando il flusso di e⁻ che c'è tra due elettrodi in cui l'unico in grado di sottrarre e⁻ è l'O₂, si può dire quanto O₂ c'è. A tensione costante (650mV) la corrente è proporzionale alla pO₂ del campione (misura amperometrica).

Per quanto riguarda il metabolismo ossidativo esistono strumenti che possono misurare la glicemia o la concentrazione dell'acido lattico, in base alla reazione elettrica che si viene a creare. Questi strumenti analitici sono i biosensori e trasformano un segnale biochimico (enzimatico) in un segnale elettrico.

In generale si ha una membrana al di sopra della quale viene immobilizzato un enzima, che ha come substrato il glucosio o il lattato. Nei biosensori sensibili al glucosio viene immobilizzata la glucosio ossidasi e in presenza di H₂O e O₂ si formano acido gluconico e H₂O₂, quindi si può andare a vedere l'abbassamento del pH (il glucosio nel sangue abbassa il pH perché forma acido gluconico; come l'elettrodo di Clark) e attraverso uno strumento di rilevazione del pH si può risalire alla glicemia oppure si possono misurare gli Ampere a 700mV in funzione di quante molecole di H₂O₂ si formano.

Invece, in presenza di lattato, O₂ e lattato deidrogenasi si formano piruvato e H₂O₂, quindi si può andare a vedere il consumo di O₂ (elettrodo di Clark) o la produzione di H₂O₂.

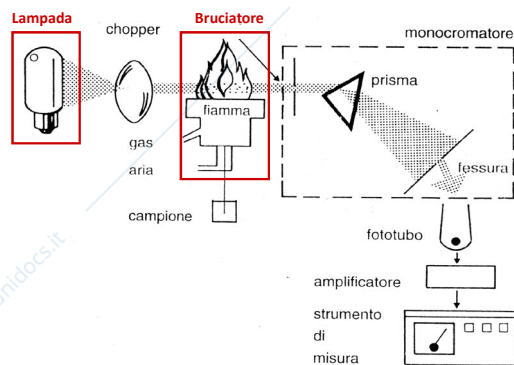
Sono sistemi enzimatici in cui la reazione enzimatica viene misurata con un metodo elettrochimico.

Fotometria atomica: fa parte dei metodi di analisi diretta; è una fotometria di assorbimento/emissione atomica usata per misurare ioni di interesse clinico, quindi si va a vedere se lo ione assorbe o emette specifiche lunghezze d'onda. Quindi ci sono due categorie: -fotometria di assorbimento→ si va a vedere quanto lo ione assorbe e in base a questo si hanno diverse colorazioni. Quasi tutti gli ioni possono essere misurati con questo metodo, in particolare cationi di interesse clinico (Ca, Mg, Na, K, Li), oligoelementi di interesse biologico (Fe, Co, Zn, Cr, Mn) e tossicologico (Pb, Hg, Cd).

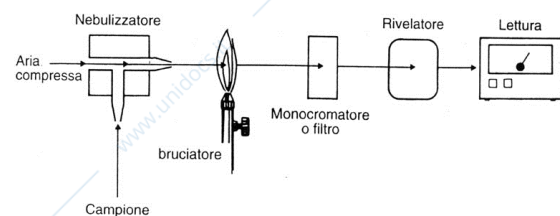
-fotometria di emissione→ si emettono onde elettromagnetiche diverse. Solo Na e K possono misurati anche in emissione atomica.

È valida la legge di Lambert-Beer: $C = A / \epsilon b$, ϵ =coefficiente spettrale di assorbimento atomico.

Il fotometro di assorbimento atomico è un bruciatore, quindi sia nell'emissione che nell'assorbimento il campione viene bruciato.



Fotometro a fiamma

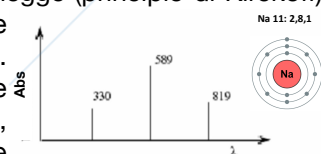


Assorbimento atomico: si mette il campione e viene bruciato, poi attraverso l'onda elettromagnetica si vanno a vedere i singoli atomi che vengono assorbiti. Una delle righe di ABS deve essere tra 200 e 1000nm, proprio per questo non si possono misurare H, N, O, S perché non hanno onde di assorbimento in questo range, hanno uno spettro di assorbimento <200nm, quindi non si può dal punto di vista strumentale. Dall'ABS che si legge a una specifica lunghezza d'onda si può risalire alla concentrazione dello ione.

Il bruciatore può essere a fiamma o forno elettrico a 1500-2500 °C, serve perché l'elemento deve essere dissociato termicamente e trasformato in atomi (gas atomico).

La fonte di onde elettromagnetiche è monocromatica (lampada monocromatica, a spettro discontinuo), quindi ad esempio se si vuole andare a misurare il Ca si emette l'onda elettromagnetica specifica per il Ca. Le lampade emettono l'onda elettromagnetica che assorbe l'atomo: esiste una legge (principio di Kirckoff) che dice che un atomo assorbe le stesse radiazioni elettromagnetiche che emette quando viene eccitato, quindi la lampada emette solo queste radiazioni.

Si usano lampade a elettrodo cavo, contenenti l'elemento che si vuole misurare (ma non il campione); quando si attacca la corrente, si accende l'elemento, quindi la lampada emette le onde elettromagnetiche che servono (perché sono le stesse che assorbono). È possibile analizzare singoli elementi per ogni lampada (lampade a singolo



elemento) o analizzare più elementi in contemporanea (lampade a multielemento; versatili ma si ha una diminuzione della sensibilità dell'analisi e danno origine a problemi di sovrapposizione delle righe spettrali). Lo strumento, quindi, ha due particolarità: brucia e la sorgente luminosa è a spettro discontinuo. Lo spettro di assorbimento è caratteristico di ogni sostanza fotoassorbente. A seconda della geometria dell'atomo, della fonte del fotone, sarà prodotta una linea di assorbimento. Le linee d'assorbimento sono estremamente atomo-specifiche e sono usate per identificare la composizione chimica dei mezzi che la luce può attraversare.

Emissione atomica: Na e K sono misurati in emissione, in quanto più sensibile. Si utilizza per elementi che hanno basso livello di eccitazione, per cui è sufficiente l'energia di una fiamma. Si prende il campione e si brucia, poi si vanno a vedere le onde elettromagnetiche emesse (Na 589nm; K 766,5nm). Per calcolare la concentrazione di Na e K si usa uno standard interno: i campioni vengono diluiti in soluzione con concentrazione nota di sali di Li (cloruro o nitrato), poi si misura contemporaneamente con tre rivelatori l'intensità di emissione dei tre elementi e i segnali di Na e K sono rapportati a quello del Li. L'intensità di emissione è proporzionale alla concentrazione della sostanza.

È un metodo molto rapido e semplice, anche automatizzato.

Variabilità pre-analitica e analitica e controllo di qualità

Lo scopo di un'analisi è quello di ottenere un valore (valore analitico) che fornisca una stima il più possibile fedele del valore reale di una grandezza in un campione biologico. L'esattezza della stima dipende da variabilità pre-analitica e variabilità analitica e il valore che si deve stimare dipende dalla variabilità biologica.

Variabilità pre-analitica: la correttezza del risultato analitico dipende dal mantenimento delle caratteristiche chimiche, biologiche e morfologiche del campione.

Innanzitutto le analisi biochimico-cliniche vengono fatte su campioni di plasma o siero, quindi si preleva o la parte liquida del sangue (plasma) o la parte liquida senza fattori di coagulazione (siero). Per evitare errori bisogna stare già attenti a dove si mette il materiale prelevato.

Per ottenere il siero si lascia coagulare il sangue in una provetta di vetro senza anticoagulanti (tappo rosso, o eventualmente giallo) per minimo 30 minuti a temperatura ambiente (più tempo se in plastica o a 4°C, meno tempo se presenti attivatori della coagulazione), poi si centrifuga 5 min a 3000 rpm (3500g) e in questo modo le due parti si separano molto bene, perché le provette contengono un gel, che ha una densità intermedia tra il siero e le cellule, quindi si interpone tra essi.

Per ottenere il plasma si usano provette di vetro o plastica con anticoagulanti (tappi diversi a seconda dell'anticoagulante) e si centrifuga 5 min a 3000 rpm (3500g). Ci sono diversi **anticoagulanti:**

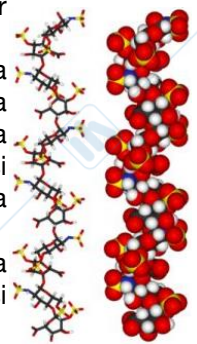
-eparina→ provetta con tappo verde, in cui viene sempre scritto che sale di eparina si aggiunge; è la più utilizzata. L'eparina è un anticoagulante naturale, viene estratto dal plasma di suino; non è specie-specifica (non inibisce la coagulazione). È un polisaccaride, appartiene alla famiglia dei glicosamminoglicani solforati, è formata da unità disaccaridiche unite da legami α 1-4 glicosidici e ha PM tra 6.000 e 40.000; la più comune unità disaccaridica è composta da acido iduronico 2-solfato e glucosamina-6-solfato. L'eparina è una molecola con attività anticoagulante naturale prodotta da basofili e mastociti; si lega e attiva l'antitrombina III, un enzima che inattiva la trombina (fattore IIa) e altri fattori della coagulazione prevenendo la conversione del fibrinogeno a fibrina, quindi è un inibitore enzimatico.

In generale viene usata in tutte le analisi biochimiche, con sali di Na, K, Li e NH_4^+ , ma non per le analisi citologiche, quindi non viene usata per l'esame emocromocitometrico (aggregati leucocitari e piastrinici alterati dai sali).

-EDTA→ è il più utilizzato insieme all'eparina; la provetta ha il tappo viola. È acido di-ammin-tetracetico, ha quattro gruppi carbossilici, che a pH fisiologico sono dissociati (COO^-). Questi quattro gruppi carbossilici chelano il calcio, quindi hanno un'alta affinità per questo ione; il calcio viene sequestrato ed eventualmente anche gli enzimi che lo legano. Il Ca è un cofattore fondamentale per il funzionamento delle proteine della cascata della coagulazione e quando viene sequestrato la sua attività viene inibita. L'EDTA non è un inibitore enzimatico diretto, ma indiretto perché blocca il cofattore; viene usato come anticoagulante per l'esame emocromocitometrico. Nella provetta è un sale di EDTA, ci sono sali di Na e K, che alterano la determinazione del Ca e degli enzimi che hanno come cofattore, quindi non viene usato per la misurazione di questo ione nel campione di siero.

-citrato o acido citrico→ provetta con tappo azzurro/blu sempre con sali di Na. Il citrato presenta gruppi carbossilici che chelano il Ca, impedendo la coagulazione. Questo anticoagulante non è tossico, viene usato nel sangue destinato alle trasfusioni. Abbassa il pH e può influire sulle colorazioni su cartine.

-glicostatici→ provette con fluoruro di Na (NaF) e litio-mono-iodoacetato. Sono sali che bloccano gli enzimi della glicolisi nelle cellule del sangue, che dopo il prelievo consuma il 3-5% del glucosio del sangue ogni



ora e può continuare fino a 24-48h dopo il prelievo; quindi permettono di mantenere nel campione la concentrazione di glucosio che c'è inizialmente nell'animale. Oltre alla concentrazione di glucosio, potrebbe aumentare l'acido lattico, per evitarlo si può mettere la provetta in frigorifero.

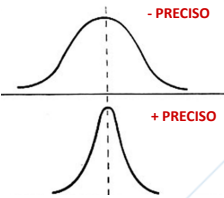
Il problema dei glicostatici è che, oltre a bloccare gli enzimi glicolitici, alterano anche la pompa Na-K e la permeabilità della membrana, quindi il K aumenta (10 volte rispetto all'esterno della cellula), si aprono i canali e si ha una fuoriuscita di K dalle cellule, che altera la determinazione di questo ione nel campione.

Le analisi possono essere alterate in caso di **emolisi**. La lisi dei globuli rossi nel sangue provoca un aumento delle proteine, degli enzimi, in particolare LDH, del K, dell'Hb (la presenza di Hb permette di capire se c'è stata emolisi). L'Hb nel plasma causa errori nelle analisi colorimetriche in quanto ha picchi di ABS a 405 e 550-575 nm; inibisce le reazioni di diazotazione (es determinazione bilirubina). L'emolisi diventa visibile quando la concentrazione di Hb supera i 20 mg/dl, però la liberazione delle sostanze contenute all'interno degli eritrociti si ha anche se si rompono pochi globuli rossi.

Le cause più frequenti di emolisi sono di natura osmotica o chimica (presenza di acqua, di alcool, di detergenti), meccanica (eccessiva pressione o depressione sullo stantuffo della siringa), fisica (riscaldamento, congelamento). In caso di emolisi si deve fare di nuovo il campione.

Variabilità analitica: quando si fa un'analisi è inevitabile fare un errore, avere il numero esatto della concentrazione potrebbe essere impossibile. In realtà non tutte le volte è necessario avere un valore estremamente accurato e preciso, ad esempio nella misurazione della glicemia con una variazione di 0,5mg/dl la diagnosi può essere fatta lo stesso, invece se è necessario avere un valore più accurato e preciso (es per la concentrazione Na) si usano altri metodi.

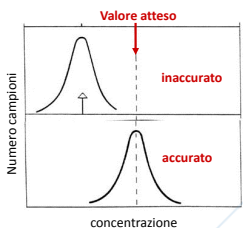
Per ogni analisi c'è un foglietto illustrativo con dei numeri che dicono quanto è vicino al valore analitico quello che si trova. L'esattezza della stima della concentrazione di un analita in un campione biologico dipende da cinque parametri che caratterizzano ogni metodo analitico e che ne definiscono l'attendibilità (reliability o performance); i **criteri di attendibilità** sono: precisione, accuratezza, limite di determinabilità, sensibilità, specificità. Limite di determinabilità, sensibilità e specificità dipendono solo dal metodo; precisione e accuratezza dipendono sia dal metodo sia dall'esecuzione.



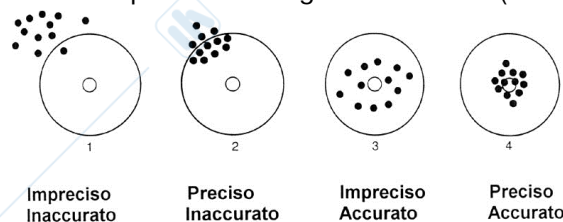
Precisione: indica la sovrapposibilità dei valori ottenuti da analisi ripetute molte volte di un determinato parametro nello stesso campione con lo stesso metodo. Numericamente la precisione è espressa come valore della deviazione standard (DS) delle repliche delle analisi. La DS è un indice statistico che consente di misurare la dispersione delle singole osservazioni intorno alla media aritmetica. Maggiore è la DS, più il metodo commette errori ed è impreciso. La precisione è meglio espressa come coefficiente di variabilità (CV), cioè valore della DS espresso in percentuale rispetto alla media: $CV = (DS/mediana) \times 100$. Il CV permette il confronto tra misure su campioni con concentrazioni di analita diverse e facilita il confronto tra metodi analitici indipendentemente dal valore della media misurata.

La precisione è espressa con due valori: -intra-assay (ripetibilità, CV entro la serie) → dipende solo dal singolo esperimento. Misura della deviazione dal valore medio in un'unica serie analitica; -inter-assay (riproducibilità, CV tra le serie) → misura della deviazione dal valore medio tra serie ripetute nel tempo da diversi operatori, con diverse soluzioni standard. Ha % più alte rispetto alla ripetibilità.

La precisione analitica dipende da tanti fattori. L'imprecisione totale permette di capire quanto deve essere preciso un metodo, perché non per tutti gli analiti si devono usare metodi precisi al 100%, per gli analiti che variano molto ci si può permettere una precisione più bassa. Per capire quanto deve essere preciso il metodo per uno specifico analita si deve prendere in considerazione l'imprecisione totale e la si deve confrontare con la variabilità biologica; più varia il metodo, maggiore può essere l'imprecisione.



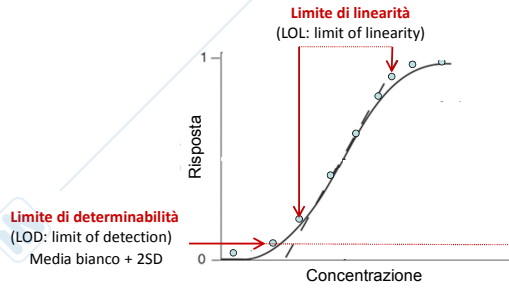
Nel kit di analisi per la precisione viene riportato un range di valori in % (es 1.40 e 1.90),



perché la precisione dipende anche dalla concentrazione del valore, quindi si fanno i calcoli su un campione a bassa e ad alta concentrazione e i range indicano la variabilità; l'imprecisione del metodo può variare in quel range in funzione della concentrazione del campione.

Accuratezza: è la concordanza tra valore vero e valori ottenuti in una serie di misure sullo stesso campione con lo stesso metodo. Numericamente si esprime come differenza tra il valore medio misurato e il valore vero: $media\ misurata - valore\ atteso$. Minore è la differenza (bias), migliore è l'accuratezza; il valore è migliore

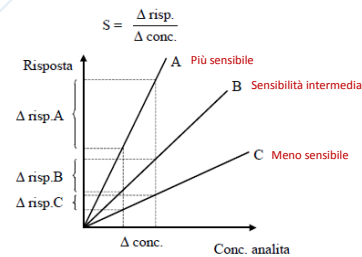
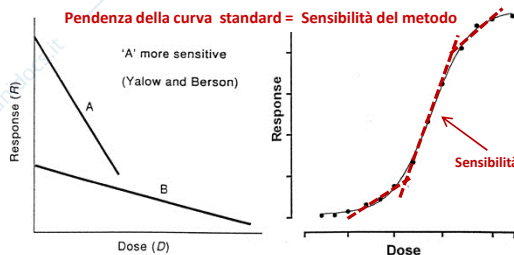
quanto più si avvicina allo zero. Per permettere il confronto tra misure su campioni con concentrazioni di analita diverse, la bias è espressa in percentuale: $BIAS = [(media\ misurata - valore\ atteso) / valore\ atteso] \times 100$;



BIAS 0% vuol dire che l'accuratezza è massima.

Limite di determinabilità o rilevabilità (LOD): è la minima quantità di analita misurabile dal metodo. Numericamente si esprime con il valore di concentrazione corrispondente alla media dei valori del bianco (concentrazione 0 dell'analita)+2DS.

I limiti di linearità (LOL) sono le concentrazioni minima e massima tra le quali la relazione tra dose e risposta



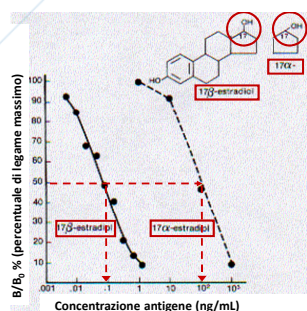
è lineare; il valore LOL è leggermente più alto rispetto al LOD. I limiti di quantificazione (LOQ) rappresentano l'ultima concentrazione che dà uno spostamento appena inizia a salire la retta; cambiando dose cambia la risposta, ma non so determinare la quantità (metodo con limite di determinabilità alto determina poco).

Sensibilità: è la variazione della risposta per unità di reagente. Indica la risposta del test a cambi di dose della sostanza misurata. Numericamente si esprime con il valore del coefficiente angolare della retta (pendenza della retta standard, $y = bx + c$); più la retta è pendente, più l'analisi è sensibile. La sensibilità di un metodo può diminuire agli estremi della curva dose risposta.

A parità di Δ risposta e Δ concentrazione, l'analisi è più o meno sensibile.

Specificità: rappresenta il grado con cui il metodo può determinare un certo analita in una miscela complessa senza subire interferenze da parte di altri componenti presenti nella miscela; se un metodo non distingue tra la molecola di interesse e altre molecole presenti nel campione biologico (non specifico o cross-reattivo), la misura dell'analita di interesse si discosta da quella vera.

La specificità è simile all'accuratezza, quindi quando si ha bassa specificità si ha anche bassa accuratezza, ma non viene espressa con un valore numerico, tranne nei metodi immunochimici dove è espressa con i valori della cross-reattività (considerata per tutti gli antigeni, sia molecole proteiche che non proteiche, ed espressa in %). Nei metodi immunochimici la cross-reattività indica la specificità del metodo e dipende dall'affinità di un Ab per molecole simili (sia proteiche che non) che hanno epitopi simili o uguali. Il legame Ab-Ag si realizza per la formazione di legami non covalenti (idrogeno, forze di coulomb e di Van der Waals) tra le catene laterali degli aminoacidi nelle regioni ipervariabili dell'Ab e i gruppi chimici dell'Ag nell'epitopo, la forza di legame dipende dalla complementarietà tra catene di Ab e gruppi chimici di Ag e da temperatura, pH e concentrazione ionica totale del mezzo nel quale avviene l'interazione; la specificità antigenica di una molecola risiede in aree ristrette, ovvero gli epitopi (parte di Ag che lega l'Ab). L'affinità di legame di un Ab per diversi Ag è diversa, ma possono formarsi comunque complessi Ab-Ag; K_a e K_d indicano l'affinità di legame. Il numero dei complessi Ab-Ag che si creano dipende sia dall'affinità dell'Ab per i diversi Ag sia dalle concentrazioni degli Ag; in base a questo numero si ottiene un determinato colore. In una soluzione nella quale è presente un Ab e Ag simili, si formano complessi Ab-Ag in concentrazione proporzionale sia all'affinità di legame tra l'Ab e i vari Ag sia alla concentrazione dei vari Ag.



Test ELISA competitivo con anticorpo anti 17β-estradiolo

ED_{50} 17β-Estradiolo = 0.1 ng/ml

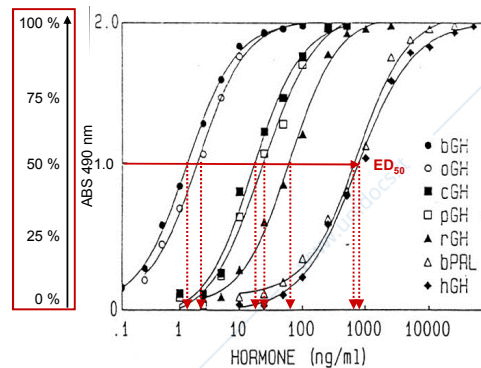
ED_{50} 17α-Estradiolo = 100 ng/ml

$$Cross\text{-reattività} = \frac{ED_{50}\ 17\beta\text{-estradiolo}}{ED_{50}\ 17\alpha\text{-estradiolo}} \times 100$$

$$Cross\text{-reattività} = \frac{0.1\ ng/ml}{100\ ng/ml} \times 100 = 0.1\ \%$$

La cross-reattività dipende dall'affinità di un Ab per molecole simili (sia proteiche che non) che hanno epitopi simili o uguali e si esprime in modo relativo attraverso le percentuali (reattività dell'Ab per una molecola rispetto alla reattività per un'altra molecola); minore è la cross-reattività di un Ab verso molecole simili, maggiore è la specificità del metodo che lo utilizza, viceversa maggiore è la cross-reattività dell'Ab, minore è la specificità del metodo. La cross reattività è espressa come il rapporto in percentuale tra le ED50 di un Ab verso molecole diverse; ED50 è la concentrazione di un Ag che dà 50% della risposta massima. Ad esempio in un test ELISA competitivo con un Ab anti- β estradiolo, si ha ED50 β estradiolo 0,1ng/ml, ED50 α estradiolo 100ng/ml, quindi la cross-reattività è data da $(ED50 \beta\text{estradiolo} / \alpha\text{estr.}) \times 100 = (0,1/100) \times 100 = 0,1\%$. All'aumentare della dose, la risposta diminuisce.

La cross-reattività è un parametro che quantifica la specificità dei dosaggi immunochimici di tutte le molecole, sia proteiche che non. Per gli Ag proteici si deve prendere in considerazione anche la specie-specificità, che è un parametro solo dei dosaggi immunochimici di proteine; nei dosaggi di proteine si ha



quindi sia cross-reattività sia specie-specificità (stesse proteine con sequenze amminoacidiche diverse). L'attitudine di un Ab di riconoscere la stessa proteina di specie diverse si esprime come percentuale di specie-specificità. Un Ab può avere Kd diverse e quindi reattività diversa per la stessa proteina di specie diverse. La specificità dei metodi immunochimici e degli Ab utilizzati per il dosaggio di proteine è espressa con valori di: -cross-reattività→ reattività con proteine simili (omologhe) della stessa specie;

-specie-specificità→ reattività con la stessa proteina in specie diverse.

La cross reattività è espressa come il rapporto in percentuale tra le ED50 di un Ab verso la stessa proteina in specie diverse. Ad esempio per l'ormone della crescita si può usare un Ab anti-bGH e si ottengono diversi valori di cross-reattività per le diverse specie, cioè per il bovino è 100%, per il cane 6,9%, per l'ovino 73,7%. All'aumentare della dose, la risposta aumenta.

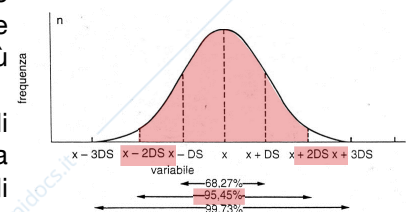
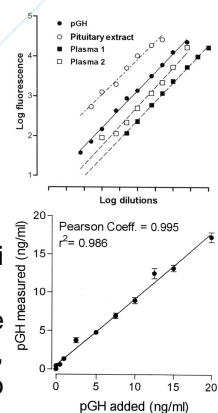
La cross-reattività indica la specificità di un metodo immunochimico, in tutti gli altri metodi si fa riferimento anche all'accuratezza.

I **test** usati per il controllo di specificità e accuratezza sono: -test delle diluizioni scalari→ è il più semplice. Le concentrazioni misurate in un campione dosato in diluizioni scalari (1/2, 1/4, 1/8, ecc) moltiplicate per il fattore di diluizione devono dare sempre lo stesso risultato.

-test del parallelismo→ le diluizioni scalari del campione biologico devono dare concentrazioni che in grafico sono interpolate da una retta che è parallela a quella standard (ottenuta con quantità crescenti dello standard); più si diluisce, più il valore scende, deve diminuire come la retta standard. Sono test di linearità che si fanno per testare l'effetto matrice; la matrice è ciò che c'è nel campione oltre all'analita che si misura.

-test dei recuperi→ non si può sempre fare, perché l'analita deve essere puro; si fa una valutazione di tipo statistico. Si misurano le concentrazioni delle molecole dopo l'aggiunta di quantità note della stessa molecola al campione biologico (plasma, urine, latte, ecc); la quantità misurata deve risultare uguale a quella aggiunta. In un grafico con su un asse la dose di Ag aggiunto e sull'altro quella misurata si valuta sia il coefficiente di Pearson (valore statistico dipendente dal coefficiente angolare), che deve essere più possibile vicino a 1, sia l' R^2 della retta di regressione ottenuta.

Obiettivi per gli errori analitici: è necessario un bilanciamento fra gli obiettivi diagnostici e l'optimum di performance di una metodica analitica (precisione, accuratezza, sensibilità e specificità) e la facilità di uso, di reperimento e dei costi dei reattivi. Il risultato analitico ha valore in quanto contribuisce a comprendere la probabilità che un individuo sia affetto da una determinata malattia. Esistono obiettivi per gli errori analitici dei test che sono calcolati in base alla variabilità biologica



dell'analita misurato; maggiore è la variabilità biologica di un analita, maggiore è l'errore analitico (variabilità analitica) ammesso per la determinazione di quell'analita senza compromettere il valore diagnostico del dato ottenuto dall'analisi.

La variabilità biologica è quanto varia quell'analita in una popolazione: se tra gli individui normali i valori di un analita hanno variazioni casuali compatibili con la normale variabilità tra soggetti, questi valori seguiranno una distribuzione Gaussiana. La variabilità biologica può essere espressa come coefficiente di variabilità biologica (CVb): $CVb = (DS/mediana) \times 100$. L'intervallo tra due valori nel quale rientra il 95% dei valori del parametro ($\pm 2DS$) misurato su una popolazione di riferimento è detto intervallo di riferimento. Ad esempio l'intervallo del glucosio nel cane è 80-120.

La variabilità biologica può essere intra-individuale (nello stesso individuo) o inter-individuale (più individui); la variabilità biologica totale è data da $CVb = \sqrt{CVb^2 \text{ intra} + CVb^2 \text{ inter}}$.

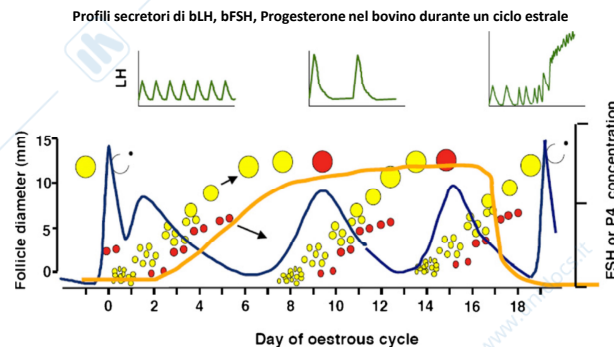
La variabilità biologica cambia in funzione della popolazione di riferimento, quindi in relazione a:

-genetica → specie, razza, linea genetica, sesso;

-fisiologica a lungo termine → età, stato nutrizionale, tipo di allevamento, localizzazione geografica, allevamento, gravidanza, stagione;

-fisiologica a breve termine → veglia-sonno, ora, movimento, altitudine, postura, stress, ciclo estrale.

Per ogni analita c'è un coefficiente di variabilità, che dipende da quanto è distribuita la popolazione per quell'analita. Per ogni analita misurabile esistono formule che mettono in relazione la variabilità analitica del metodo di misura con la variabilità biologica di quel parametro; per ogni analita ci sono valori di precisione (quanto sono sparpagliati) e di accuratezza (quanto sono vicini). Per quanto riguarda il traguardo di precisione l'imprecisione analitica non deve superare la metà della variabilità biologica intra-individuale, quindi CV analitica tra le serie < 1/2 CV biologica intra-individuale. Per quanto riguarda il traguardo di accuratezza l'inaccuratezza analitica non deve superare 1/4 della variabilità biologica totale della popolazione, quindi Bias < 1/4 CV biologica totale. Si può anche fare un calcolo sull'errore analitico totale (ETa), dato da $ETa = [\text{imprecisione (CVa \%)} \times 1,65] + \text{inaccuratezza (bias \%)}$; c'è anche una formula che indica l'ETa ottimale $ETa \text{ ottimale} = (1/4 \text{ range riferimento}) / \text{media valori riferimento} \times 100$, ad esempio la glicemia nel bovino ha un intervallo di riferimento 40-80mg/dL (CVb 33%), l'ETa ottimale è $[(80+40)/4]/$



$(80+40/2) \times 100 = 16,6\%$.

È inutile cercare di abbassare a ogni costo l'imprecisione (CVa) e l'accuratezza (bias) di un metodo analitico: il risultato deve essere clinicamente utile. Precisione e accuratezza devono essere "dosati" rispetto alla variabilità biologica di una popolazione.

Sempre per quanto riguarda la variabilità biologica è importante sapere che alcuni parametri variano nel tempo, quindi quando si valuta la concentrazione delle sostanze si deve tenere conto che varia nel tempo, es ormoni ipofisari, FSH, LH, PRL nei bovini, ormone della crescita (varia nel tempo e anche in modo individuale), cortisolo. Per avere dei dati sui parametri che variano nel tempo si possono fare o prelievi ripetuti nel tempo, quindi per un periodo più lungo, e si fanno grafici (es prelievi ogni 15' per 6h consecutive) o test di stimolazione del rilascio dell'ormone (si va a vedere quanto la ghiandola è in grado di secernere).

Controllo di qualità interno ed esterno: quando si effettua una determinazione si fanno errori, che possono variare nel tempo. In qualsiasi laboratorio di analisi è bene che vengano tenuti sotto controllo i metodi, quindi si deve vedere se nel tempo il metodo mantiene le sue caratteristiche; si monitora tutto quello che viene usato in laboratorio per verificare che errori vengono fatti, in particolare vengono valutati precisione e accuratezza dell'esecuzione in laboratorio: in un campione che viene dosato tutte le volte, ogni giorno o eventualmente in ogni analisi fatta sul campione, si mette dentro il campione di controllo e si va a vedere se il risultato viene sempre uguale (se viene uguale, va bene, invece se viene diverso c'è qualcosa che non va bene). Quindi si basa sulla misurazione di uno o più standard con concentrazione nota di un determinato analita. I materiali devono avere caratteristiche chimico-fisiche il più possibile simili ai campioni dei pazienti; l'uso dei materiali a matrice della specie animale su cui si fanno le analisi è auspicabile in quanto rende più probabile l'ottenimento di questa caratteristica.

Ci sono 2 tipi di controllo di qualità:

-interno→ si valutano precisione e accuratezza delle analisi che vengono effettuate dal laboratorio nel tempo;

-esterno→ effettuato normalmente a livello regionale (ASL), quindi la regione manda a tutti i laboratori che vogliono o devono essere certificati un campione e i laboratori devono determinare nel campione gli enzimi, il colesterolo ecc, successivamente i risultati vengono mandati all'ASL, che fa un'analisi statistica di tutti i dati ottenuti e si ottengono le carte di controllo. È un controllo di precisione e accuratezza di una metodica di analisi in confronto con laboratori esterni.

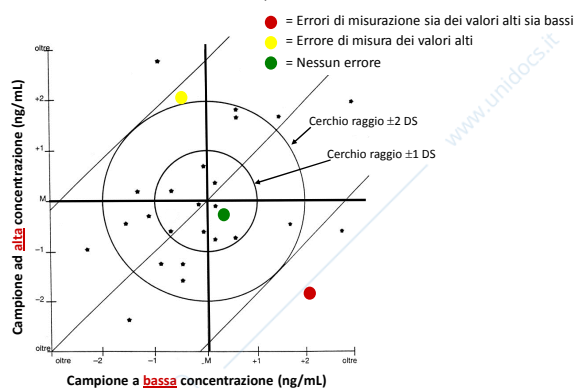
Controllo di qualità interno: operazione di controllo della qualità analitica che ciascun laboratorio attua indipendentemente. Il controllo di qualità interno si attua inserendo fra le analisi uno o più standard ogni volta che si esamina una nuova serie di campioni sconosciuti (serie analitica). La concentrazione misurata nei campioni di controllo deve essere simile o uguale al valore atteso; in caso contrario anche le concentrazioni misurate in tutti i campioni biologici testati in quella stessa serie analitica sono inaccurati e imprecisi.

Le concentrazioni misurate nei campioni di controllo sono riportate su carte di controllo, che descrivono la precisione e accuratezza dell'esecuzione delle analisi che vengono effettuate dal laboratorio nel tempo; in questo modo si hanno dei grafici che permettono di vedere come i dati variano nel tempo. Un metodo usato per creare le carte di controllo è lo Shewart-Levey-Jannings.

Metodo di Shewart-Levey-Jannings: si prende il campione di controllo e si dosa quando il metodo è sotto controllo e si fa molte volte, quindi si prende il campione standard, si dosa un po' di volte e si calcolano media e DS. Si riportano in un grafico (asse x concentrazioni, asse y tempo) media e DS e si ottengono le carte di controllo su cui vengono riportati i valori ottenuti dalle analisi degli altri campioni nel tempo. Le concentrazioni misurate nei campioni di controllo nel tempo sono confrontati con i limiti di allarme ($\pm 2SD$) e di intervento ($\pm 3SD$) rispetto alla media di controllo. Spesso le variazioni iniziano lentamente, quindi è più difficile accorgersene.

Il vantaggio delle carte di controllo è vedere come i valori variano nel tempo, in modo da potersi accorgere se variano in modo casuale o meno.

Controllo di qualità esterno: si ha un campione che arriva dall'esterno, quindi è l'analisi da parte di diversi laboratori su campioni standard inviati dall'esterno. I risultati delle analisi ottenuti dai singoli laboratori sui diversi campioni vengono inviati alla sede centrale, che restituisce delle tabelle/istogrammi che indicano

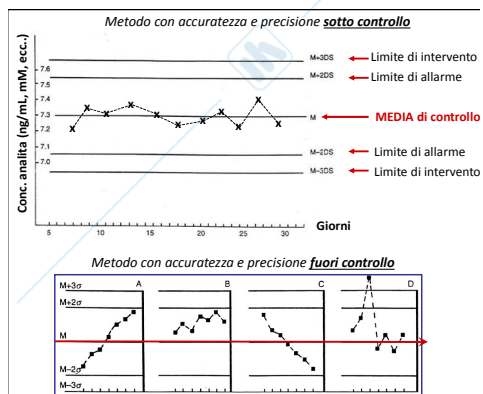


dove si posiziona il laboratorio rispetto agli altri, quindi le misurazioni ottenute rispetto agli altri laboratori. Ci sono 3 diversi tipi di grafici: -tabella→ istogramma di distribuzione della determinazione di un analita in un programma di controllo.

-diagramma→ ogni puntino è il risultato di ogni parametro delle analisi per ogni laboratorio

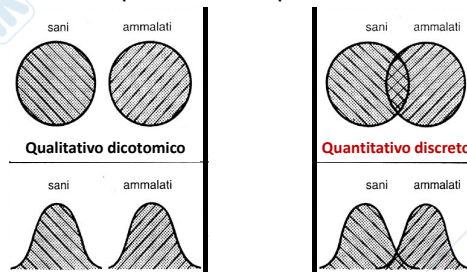
-diagramma di Youden→ dà precisione e accuratezza sia per i valori bassi che per i valori alti. Si basa sulla variazione dei risultati di un'analisi ottenute dai laboratori su due campioni di diversa concentrazione (alta e bassa). I risultati vengono messi su un grafico: su un asse vengono messe la concentrazione del campione a bassa concentrazione, la media e le DS, sull'altro asse viene messo il campione ad alta concentrazione. Verde=nessun errore; giallo=vicino ai bassi, ma fuori dagli alti. Se i valori sono all'interno dei cerchi va bene, se sono fuori vuol dire che il metodo non è sotto controllo.

Interpretazione dell'analisi di laboratorio ai fini diagnostici

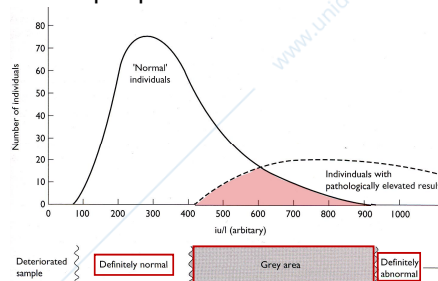


Il **test diagnostico** è una qualsiasi misurazione che sia effettuata con uno strumento di misura e che possa fornire informazioni su un particolare problema clinico, come esami di laboratorio (es glicemia, cretinemia), auscultazione cardiaca, percussione polmonare, esame della mucosa congiuntivale, domande di un questionario. Il test diagnostico viene eseguito su animali ammalati, cioè che mostrano sintomi clinici che fanno sospettare la presenza di una malattia. Il **test di screening**, invece, si esegue su tutti gli individui di una determinata popolazione, indipendentemente dal loro stato di salute.

Un'altra distinzione che si può fare è tra **test patognomonico** e **non patognomonico**: il primo, se positivo, indica con sicurezza la presenza del carattere ricercato, l'analita in condizioni non patologiche è assente, questo test non genera mai risultati falsi-positivi, ma può fornire risultati falsi-negativi; il secondo non



fornisce un risultato certo, ma soltanto probabile, tra i risultati positivi ci sono falsi-positivi e tra i risultati negativi ci sono dei falsi-negativi. Ad esempio per l'individuazione di bovine infette da brucellosi:



-il test patognomonico→ viene usato nell'esame colturale del latte. Non ci sono falsi-positivi (se la bovina risulta positiva è sicuramente infetta, il batterio non è né ubiquitario né commensale), però possono esserci falsi-negativi (prelievo effettuato in un momento nel quale le brucelle non vengono eliminate-le brucelle sono eliminate con il latte in maniera intermittente);

-il test non patognomonico→ viene usato nel test sierologico per la presenza di Ab specifici. Possono esserci falsi-positivi (animali infettati da microrganismi antigenicamente simili, es Yersinia enterocolitica tipo IX) e anche falsi-negativi (bovini infettati di recente che non hanno ancora prodotto Ab).

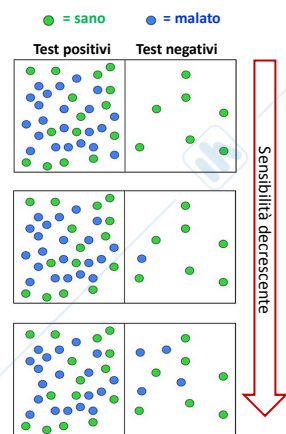
Per i test quantitativi la distribuzione delle popolazioni "malata" e "sana" hanno di solito parametri la cui concentrazione presenta delle aree di sovrapposizione.

La distribuzione dei risultati di un dosaggio di un enzima nel siero è una distribuzione asimmetrica dei valori normali.

Se non c'è una distinzione tra individui sani e malati per il parametro considerato, si devono fare considerazioni su base statistica (valore predittivo del test). Il **valore predittivo del test** è una formula che indica la percentuale di animali che sono correttamente classificati in base al risultato del test; è la somma di sensibilità e specificità diagnostica del test e prevalenza della malattia, quindi dipende da questi tre fattori.

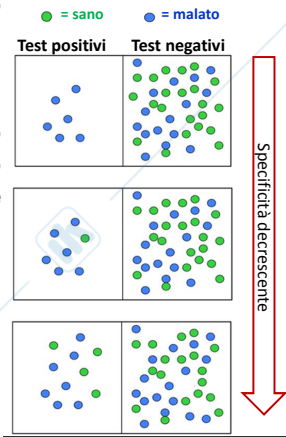
Sensibilità e specificità diagnostica sono diverse dalle analitiche, indicano la capacità di un test diagnostico di individuare in una popolazione gli individui provvisti del carattere ricercato e quelli che ne sono privi; sono caratteri propri del test, noti prima dell'applicazione del test e per kit analitici spesso dichiarati dal produttore, sono probabilità pre-test. In termini di probabilità reali si deve però tenere conto anche la prevalenza: $VPP \% = \frac{\text{sensibilità} \times \text{prevalenza}}{(\text{prevalenza} \times \text{sensibilità}) + (1 - \text{specificità})(1 - \text{prevalenza})}$; $VPN \% = \frac{\text{specificità} \times \text{prevalenza}}{(\text{specificità} \times \text{prevalenza}) + (1 - \text{sensibilità})(\text{prevalenza})}$. Ad esempio vengono usati per i test per FIV, Leishmaniosi (sensibilità 91%, specificità 99%), Filariosi cardiopolmonare nel cane e nel gatto (sensibilità 99%, specificità 100%); i risultati per la ricerca degli Ag indicano la presenza sia di falsi positivi che di falsi negativi.

La **sensibilità diagnostica** è l'attendibilità del risultato negativo, è la capacità di un test di identificare correttamente gli animali malati; più è sensibile, minore è il numero dei malati classificati come sani (falsi negativi). Si ha una sensibilità 100% (0% FN) quando se il test è negativo, l'animale ha il 0% di probabilità di essere malato; si ha sensibilità 98% (2% FN) quando se il test è negativo, l'animale ha il



2% di probabilità di essere malato; si ha sensibilità 60% (40% FN) quando se il test negativo, l'animale ha il 40% di probabilità di essere malato.

La sensibilità diagnostica statisticamente è la probabilità che un animale malato risulti positivo al test, quindi la percentuale di animali malati che risultano positivi al test; diminuisce all'aumentare dei falsi negativi, man mano che aumentano i falsi negativi diminuisce la sensibilità: $\text{Sensibilità} = \frac{VP}{VP+FN} \times 100$, VP veri positivi, FN falsi negativi, (VP+FN) totalità dei malati, si ottiene la % di animali malati che sono positivi al test (es 89% sensibilità, vuol dire che 11% di animali negativi possono essere positivi e malati). Minore è la sensibilità, più sono gli animali malati che sfuggono alla diagnosi. Ad esempio per la Filariosi cardiopolmonare nel cane e nel gatto si possono usare diversi test: nel test a goccia spesso la sensibilità è del 60%, quindi se il test è negativo c'è il 40% di probabilità che l'animale sia malato; nel test di Knott la sensibilità è del 80%, quindi se il test è negativo c'è il 20% di probabilità che l'animale sia malato; nel test con l'Ag la sensibilità è del 99%, quindi se il test è negativo c'è l'1% di probabilità che l'animale sia malato.



La specificità diagnostica è l'attendibilità del risultato positivo, è la capacità di un test di identificare correttamente gli animali sani; più è specifico, minore è il numero dei sani classificati come malati (falsi positivi). Se la specificità è 100%, l'animale è malato, quindi se il test è positivo c'è lo 0% di possibilità che l'animale sia sano (test patognomiconico); se la specificità è 98% e il test è positivo, c'è il 2% di possibilità che l'animale sia sano; se la specificità è del 60% e il test è positivo, c'è il 40% di possibilità che l'animale sia sano.

La specificità diagnostica statisticamente è la probabilità che un animale sano risulti negativo al test, quindi è la percentuale di animali sani che risultano negativi al test. L'attendibilità del risultato positivo diminuisce all'aumentare dei falsi positivi (FP); minore è la specificità di un test diagnostico, maggiore è il rischio di falsi positivi. $\text{Specificità} = \frac{VN}{VN+FP} \times 100$; indica la % di animali sani che sono negativi al test. Ad esempio nella Filariosi cardiopolmonare nel cane e nel gatto per quanto riguarda i diversi test la specificità è: 0% nel test goccia spesso (si diagnosi di filaria, ma non si differenziano i vari tipi); 100% nel Knott test, quindi se il test è positivo, l'animale ha lo 0% di probabilità di essere sano; 100% nel test con l'Ag.

Nei test quantitativi occorre stabilire un valore critico o soglia o cut-off, che rappresenta il limite di separazione tra positività e negatività del test, che separi gli ammalati dai sani (questo vale per qualsiasi tipo di analisi). La sensibilità e la specificità diagnostiche cambiano variando il cut-off; la scelta del valore critico è di estrema importanza. Sensibilità e specificità diagnostiche sono interdipendenti per i parametri continui: aumentando la sensibilità si diminuisce la specificità e viceversa. Si possono variare sensibilità e specificità modificando i livelli soglia: -riducendo il livello- aumenta la sensibilità e diminuisce la specificità, aumentano i falsi positivi;

-aumentando il livello- diminuisce la sensibilità e aumenta la specificità, aumentano i falsi negativi.

Un *test sensibile* dovrebbe essere scelto se le conseguenze di una mancata diagnosi sono gravi (es malattie a esito mortale, ma curabili); sono utili all'inizio del processo diagnostico (diagnosi differenziale) e in tal caso il test sensibile ha lo scopo di escludere una o più malattie. Un test sensibile è di maggior aiuto al clinico quando fornisce un risultato negativo.

Un *test specifico* è utile per malattie molto diffuse e per confermare una diagnosi già effettuata con altri mezzi: un test specifico raramente è positivo in assenza della malattia. I test molto specifici sono utili quando un risultato falso positivo è dannoso (sotto l'aspetto organico, emotivo, finanziario ecc). Un test specifico è di maggior aiuto al clinico quando fornisce un risultato positivo.

Più è rara la malattia, più specifico dovrà essere il test per essere clinicamente utile. Più è diffusa la malattia, più sensibile dovrà essere il test per essere clinicamente utile.

Ad esempio il test per la BSE (encefalopatia spongiforme bovina) usato nel 2002 era molto specifico (100% test patognomiconico): su 750 mila animali testati solo 34 sono risultati positivi; se si fosse utilizzato un test con specificità anche solo del 99%, l'1% dei bovini sani saggati sarebbe risultato positivo (FP), ossia ben 7.500 animali.

Un altro esempio è il test effettuato sui donatori di sangue che deve essere estremamente sensibile, perché è indispensabile tutelare chi riceve la donazione e non si può rischiare di trasfondere sangue infetto (risultato falsamente negativo ai test di sicurezza); su questa base diventa tollerabile la distruzione di una certa quota di campioni non infetti (risultati falsamente positivi ai test di sicurezza).

La prevalenza della malattia è la percentuale pre-test che l'animale possa essere malato, ovvero quanto è diffusa la malattia (1% malattia poco diffusa, 50% molto diffusa), questo valore ha un'influenza notevole sulla diagnosi della malattia. In termini di probabilità reali una risposta può venire dalla conoscenza del valore predittivo di un test diagnostico, cioè percentuale di animali che sono correttamente classificati in base al risultato del test e dipende anche dalla prevalenza. La prevalenza è la probabilità a priori della presenza di una malattia nella popolazione studiata. Statisticamente è la frequenza della malattia in una

popolazione di 100.000 animali: Prevalenza= tot animali/tot popolazione x100. Considerando la prevalenza della malattia nella popolazione si può ottenere un significativo miglioramento della predittività statistica in base al risultato (positivo o negativo) del test. Si possono usare le formule di VPP e VPN: VPP % di animali con risultati positivi da considerare malati, probabilità che un animale con test positivo sia malato; VPN % di animali con risultati negativi da considerare sani, probabilità che un animale con test negativo sia sano. VPP e VPN dipendono dalla sensibilità e specificità diagnostiche del test: aumentano con l'aumentare di questi due parametri.

Test ELISA per la FeLV nel gatto: popolazione con bassa prevalenza (1%) senza sintomi di malattia e senza esposizione nota al virus; per popolazioni a molto bassa prevalenza la sensibilità del test è ininfluente sul risultato. Sensibilità 0% vuol dire che il 100% dei gatti malati risulta negativo (FN), essendo 1 solo gatto malato, i test falsi negativi saranno lo 1% (100% di 1) delle analisi effettuate, quindi il 99% dei test negativi è giusto. Sensibilità 90% vuol dire che il 10% dei gatti malati risulta negativo (FN), essendo 1 solo gatto malato, i test falsi negativi saranno lo 0.1% (10% di 1) delle analisi effettuate, quindi il 99,90% dei test negativi è giusto. Sensibilità 98% vuol dire che il 2% dei gatti malati risulta negativo (FN), su un totale di 100 gatti, essendo 1 solo gatto malato (prevalenza 1%), i test falsi negativi saranno lo 0.02% (2% di 1) delle analisi effettuate, quindi il 99,98% dei test negativi è giusto.

Per quanto riguarda la specificità perché il test abbia significato diagnostico, la specificità deve essere molto elevata (> 99,5%). Specificità 98% vuol dire che il 2% dei gatti sani risulta positivo (FP), su un totale di 100 gatti ho 3 test positivi, quindi 1 VP (prevalenza 1%) e 2 FP (specificità 98%), cioè 2 su 3 (67%) sono sbagliati. Specificità 95% vuol dire che il 5% dei gatti sani risulta positivo (FP), sul totale di 100 gatti ho 6 test positivi, quindi 1 VP (prevalenza 1%) e 5 FP (specificità 95%), cioè 5 su 6 (83%) sono sbagliati.

Nel caso di alta prevalenza (30%) nella popolazione specificità 98% vuol dire che il 2% dei gatti sani risulta positivo (FP), su un totale di 100 gatti ho 32 test positivi: 30 VP (prevalenza 30%) e 2 FP (specificità 98%), quindi 30 su 32 (93%) sono giusti. Specificità 95% vuol dire che il 5% dei gatti sani risulta positivo (FP), sul totale di 100 gatti ho 35 test positivi: 30 VP (prevalenza 30%) e 5 FP (specificità 95%), quindi 30 su 35 (85%) sono giusti.

Se troviamo positivo al test della FeLV un gatto che non ha una specifica storia di contatto con il virus ci sono altissime probabilità che sia un falso positivo.

A parità di specificità e sensibilità, la prevalenza ha un ruolo determinante per i risultati predittivi diagnostici; il VPP diminuisce con il diminuire della prevalenza. Per prevalenze molto basse il VPP si avvicina a zero (inutilità diagnostica). L'influenza della prevalenza sul valore predittivo è proporzionale al decrescere della sensibilità e specificità.

Test ELISA per l'HIV nell'uomo: questi test hanno sensibilità 99,9% e specificità 99,99%. La prevalenza di infezione da virus HIV su 10.000 persone non tossicodipendenti senza comportamenti sessuali a rischio è dello 0.01% (1 su 10.000). La sensibilità del test per l'HIV è 99,9%; su 10.000 persone non a rischio 1 ha l'HIV (0.01%) e risulterà positiva al 99,9% (0.1% FN). La specificità del test per l'HIV è 99,99%; su 10.000 persone 9.999 persone non hanno l'HIV, ma quasi sicuramente una di queste (lo 0.01% di 9.999 = 0,9999) risulterà falsamente positiva. Quindi su 10mila persone 2 risulteranno positive: una ha il virus l'altra no. Se risultato positivo al test e non sono a rischio ho il 50% di possibilità di essere sano.

Ormoni nella pratica clinica veterinaria (seminario)

Gli ormoni proteici che vengono usati e dosati in veterinaria sono specie-specifici. Gli ormoni che vengono misurati, dosati nella pratica clinica veterinaria sono: -ormoni per valutare la funzionalità della tiroide→ TSH, T3 e T4. TRH è uguale in tutte le specie, anche T3 e T4 non sono specie-specifici.

-ormoni per valutare la funzionalità del surrene→ ACTH (uguale in tutte le specie e ha la stessa attività biologica), cortisolo e aldosterone;

-ormoni della riproduzione→ diagnosi di gravidanza (progesterone-cane, ECG-cavallo);

-diabete→ insulina, ADH;

-disturbi della crescita o doping→ ormone della crescita, ormone PTH (legato anche a patologie renali e cardiache);

-disturbi di comportamento→ vasopressina.

A volte si somministrano gli ormoni (stimoli) per scopi diagnostici, soprattutto nei casi in cui il dosaggio dell'ormone non dà informazioni perché varia in funzione di altre cose, es per vedere se la tiroide funziona (si somministra TRH) o per la diagnosi di Cushing.

Esistono anche ormoni che vengono somministrati anche per scopi terapeutici, ad esempio l'ossitocina viene somministrata per stimolare il parto, o anche per migliorare delle prestazioni, ad esempio eritropoietina-doping o ormone della crescita (somministrazione vietata in Europa).

È importante sapere la struttura degli ormoni (steroli-es vitamina D, piccole molecole organiche-es ossido nitrico, acetilcolina, proteine, amminoacidi) e come sono classificati (a seconda del tessuto/ghiandola che li produce oppure in base alla loro struttura); gli ormoni sono tutti diversi, li accomuna solo la loro attività,

ovvero il trasferimento delle informazioni. Tutte le volte che si dosa un ormone bisogna tenere presente le sue caratteristiche.

Tutte le proteine sono diverse nelle diverse specie, ad esempio l'insulina è molto diversa tra le specie (in uomo e maiale si differenzia per un solo aa); ci sono casi particolari, ad esempio l'ormone della crescita è uguale in cane e maiale. Per sapere se una proteina è uguale o diversa si vanno a vedere le sequenze amminoacidiche. Il fatto che gli ormoni proteici sono diversi nelle diverse specie nel dosaggio determina cross-reattività (% di cross-reattività).

Il trattamento con gli ormoni si fa con ormoni proteici o non proteici; nel caso degli ormoni proteici c'è un problema di somministrazione, perché gli ormoni per agire sugli organi bersaglio si legano ai recettori, che sono proteine, quindi si ha un'interazione ormone-recettore come l'interazione Ab-Ag (bisogna controllare la concentrazione dell'ormone somministrato). Ad esempio se si hanno due ormoni che interagiscono sul recettore in modo diverso, il numero di recettori che si formano è minore e di conseguenza anche l'effetto biologico; per avere lo stesso numero di recettori si deve aumentare la dose dell'ormone.

Prostaglandine e ormoni steroidi non sono proteine, però molti degli ormoni che vengono somministrati sono di tipo proteico, es ormone GH (frode commerciale se viene somministrato in Europa). Il problema in medicina veterinaria è che viene prodotto un GH con una forma ricombinante che viene usato per aumentare la produzione degli animali del 10-15% a parità di potenziale genetico e la qualità della carne nei bovini e non ha nessun potere reattivo sull'animale, nessun effetto sulla salute dell'animale e nemmeno del consumatore, perché il GH è specie-specifico; è vietata la sua somministrazione nell'UE (divieto commerciale). Il GH ha un recettore particolare composto da due subunità e l'ormone si lega in mezzo ai due estremi, quindi il recettore riconosce due parti dell'ormone (sito 1 e sito 2). Le sequenze amminoacidiche dei siti 1 e 2 sono diverse nelle diverse specie, in particolare nel GH del bovino c'è un aa carico positivamente (istidina), nel GH dell'uomo c'è un aa carico negativamente (aspartato) e queste cariche condizionano il 98% della capacità della molecola di legarsi al recettore; il recettore è una arginina carica positivamente che lega l'aspartato, mentre se il recettore ha una carica opposta, recettore e ormone non si legano, la cross-reattività scende a 0,2%, di conseguenza se si dà il GH bovino all'uomo non ha nessun effetto biologico.

L'eritropoietina aumenta l'ematocrito, il cavallo trattato con eritropoietina diventa anemico; per vedere se è stata somministrata eritropoietina si fa il test anti-doping.

LH, FSH e altri ormoni presentano zuccheri e questi vengono prodotti dalle cellule dell'organismo, quindi la sequenza amminoacidica è uguale ma lo zucchero è diverso. LH e FSH sono molto diversi tra le diverse specie sia come proteine che come zuccheri, per la somministrazione si può dare il GnRH, che è uguale in tutte le specie, quindi si può somministrare GnRH per fare dei trattamenti; ci sono anche analoghi sintetici del GnRH che funzionano sui recettori del GnRH.