

StuDocu.com

Appunti, tutte le lezioni - Biochimica clinica - a.a. 2015/2016

Biochimica clinica (Università degli Studi di Milano)

BIOCHIMICA CLINICA

METODOLOGIE BIOCHIMICHE IMPIEGATE NEL LABORATORIO BIOMEDICO VETERINARIO

I metodi per ottenere il risultato di un'analisi di laboratorio si dividono in:

1. **Analisi indiretta:** metodi che rilevano e quantificano analiti dopo reazioni e/o dopo separazione dagli altri componenti del campione. All'interno dell'analisi diretta posso classificare le reazioni come chimiche, enzimatiche o immunochimiche. La separazione avviene con elettroforesi o cromatografia.
2. **Analisi diretta:** metodi che rilevano e quantificano analiti di interesse biochimico clinico senza una separazione o una reazione chimica/biochimica. Abbiamo fotometria atomica o metodi elettrochimici come ad esempio la misurazione del pH.

Molto spesso le analisi richiedono diverse reazioni a catena che portano ad un risultato che dipende dai vari fattori che sono in analisi.

Energia radiante

Il risultato finale di un'analisi di laboratorio la maggior parte delle volte finisce con la misurazione di un'onda elettromagnetica o con colori o con strumenti che sono in grado di assegnare dei valori.

Moltissime analisi di laboratorio sia dirette che indirette prevedono per la rilevazione dell'analita o di suoi prodotti di reazione misure dell'energia radiante.

A proposito di queste esistono metodi di laboratorio di analisi del DNA anche tramite colorazione, il complesso DNA-EtBr è fluorescente alla luce UV per cui le bande di DNA sono visibili al buio.

Le informazioni sull'analita o di un suo prodotto di reazione sono ottenute misurando radiazioni elettromagnetiche, un'onda elettromagnetica è costituita da un campo elettrico (E) e un campo magnetico (B). Una radiazione elettromagnetica ha velocità, frequenza, ampiezza ma i due parametri a cui ci riferiamo sono **lunghezza d'onda** e **intensità**. La lunghezza d'onda è associata al colore, l'intensità è la quantità invece. La lunghezza d'onda (λ) è la distanza fra un punto di un ciclo e il punto corrispondente nel ciclo successivo, si misura in nm.

L'intensità è l'energia che passa attraverso un'area unitaria nell'unità di tempo e si misura in W/m^2 , è proporzionale al quadrato dell'ampiezza. È in particolare il numero di fotoni che attraversa una sezione unitaria di un campione nell'unità di tempo.

Per quanto riguarda la lunghezza d'onda abbiamo detto che si misura in nm, lo spettro elettromagnetico è costituito dall'insieme delle onde e può essere diviso in regioni caratteristiche a seconda delle lunghezze d'onda

-400-430 nm violetto

-430-485 nm blu

-485-560 nm verde

-560-574 nm giallo

-575-625 nm arancio

-625-700 nm rosso

dai 100 ai 300 nm si hanno onde in laboratorio e sono gli UV, al di sotto ancora ci sono i raggi X che si utilizzano per le radiografie in diagnostica e infine i raggi gamma utilizzati anche questi in laboratorio nei dosaggi immunologici.

Le onde elettromagnetiche nei metodi sia diretti che indiretti vengono utilizzate nel passaggio finale dell'analisi, posso misurare diverse cose:

-Trasmesse/assorbite: quante onde sono trasmesse e quante assorbite, le metodiche che utilizzano questo concetto sono fotometria e spettrofotometria di assorbimento

- Rifratte/difratte**: se nel metodo indiretto ho generato dei corpuscoli, un esempio è il dosaggio delle lipasi del sangue vedendo nel tempo quantosi schiarisce il campione a causa della scomparsa della rifrazione. Utilizzate in rifrattometria e turbidimetri
- riflesse**: spettroscopia di riflettanza
- Prodotte**: in fluorimetria, luminometria e spettroscopia di emissione atomica

Metodi basati sulla misura di radiazioni assorbite

Quando un'onda elettromagnetica colpisce una sostanza l'energia elettromagnetica viene trasferita agli atomi/molecole che lo costituiscono e la radiazione viene quindi assorbita, questo avviene se la lunghezza d'onda è tale da garantire una quantità di energia che permette il passaggio di un elettrone nell'atomo al livello successivo. Perché si abbia assorbimento della radiazione da parte di un sistema atomico/molecolare l'energia del fotone eccitante deve essere uguale alla differenza di energia tra i suoi diversi stati elettronici. La transizione tra livelli energetici non sono limitate agli elettroni, i legami chimici nelle molecole possono andare incontro ad una varietà di livelli vibrazionali e atomi connessi da legami covalenti possono ruotare uno rispetto all'altro. Ogni atomo/molecole allo stato di riposo assorbe onde a lunghezza caratteristica. Gli strumenti che si utilizzano colorimetri e spettrofotometri che generano un numero, c'è una sorgente luminosa e un selettore di lunghezza d'onda, abbiamo un campione in una provetta chiamata cuvetta e si osserva quante onde attraversa.

Le cuvette sono comuni da 3mL o da 1 mL, possono essere di quarzo, di plastica e devono avere sempre uno spessore di 1cm.

Ogni molecola è in grado di assorbire una specifica lunghezza d'onda, lo **spettro di assorbimento** è il range di lunghezze d'onda in cui le onde vengono fermate. Nel sodio solo le onde a 330, 589 e 819 nm vengono assorbite, Nelle molecole più complesse come la bilirubina l'assorbimento invece è continuo in un intervallo, ovviamente avrò una lunghezza d'onda con assorbimento maggiore.

La carne cambia colore perché sono diversi gli stati di ossidazione della mioglobina in quanto con stati di ossidazione diversa si hanno spettri di assorbimento diversi. Nella carne fresca il colore è dato dall'equilibrio metamioglobina (bruno)/MbO₂ (Rosso vivo)/Mb (porpora).

Metodi basati sulle onde elettromagnetiche rifratte o difratte

Negli ambulatori l'applicazione più frequente di questo tipo di onde è uno strumento che misura il peso specifico delle urine. La **rifrazione** è il classico fenomeno che si ha nel passaggio di due sostanze a diversa densità, la rifrattometria si basa sulla determinazione degli indici di rifrazione cioè quante onde elettromagnetiche vengono deviate dal mio campione. La misura dell'angolo di rifrazione in un liquido è effettuata dai rifrattometri che possono avere una lampadina al loro interno oppure possono essere guardati alla finestra. il grado rifrattometrico è proporzionale alla concentrazione di tutte le sostanze solde disciolte, inorganiche e organiche, dagli zuccheri ai sali, dagli acidi organici alle proteine.

Altri metodi sono **torbidimetria** e **nefelometria**. La torbidimetria applicata per misurare precipitati in soluzione con particelle di diametro superiore al micrometro, quando l'assorbimento prevale sulla rifrazione. e la nefelometria che è per particelle inferiori al nanometro ed è quando la rifrazione prevale sull'assorbimento.

Metodi basati sulla riflessione delle onde

Le onde elettromagnetiche di un fascio policromatico possono essere riflesse da corpi non trasparenti. Lo strumento in questione è il riflettometro, posso fare un'analisi quantitativa su quante onde sono state riflesse oppure utilizzo il riflettometro che fornisce un valore che andremo ad analizzare. La tecnica è definita **spettroscopia di riflettanza**.

Metodi basati sull'energia radiante prodotta

In ogni caso si ha emissione di onde a seguito dell'eccitazione di un elettrone che torna a riposo ed emette allora un altro fotone, L'onda elettromagnetica che eccita è la stessa che si assorbe. Se per eccitare una molecola utilizzo il calore si parla di spettroscopia di emissione atomica, la **fluorimetria** è quando eccito una sostanza come un'altra onda elettromagnetica, La **luminometria** è quando l'eccitazione di una molecola è fatta facendo avvenire una reazione chimica/biochimica.

Dalla lettura strumentale alla concentrazione dell'analita

Gli strumenti che analizzano l'energia radiante rilevano l'intensità delle onde elettromagnetiche trasmesse, assorbite, rifratte, difratte, riflesse o emesse dagli analiti o dei prodotti dalle reazioni nelle quali sono stati coinvolti. L'intensità di queste onde elettromagnetiche è proporzionale alla concentrazione dell'analita.

L'unità di misura dell'intensità di un flusso luminoso è la **candela (cd)**, intensità luminosa di una sorgente di una radiazione a λ 555 nm e intensità di 1/683 di watt per steradiante. Il risultato della lettura strumentale dell'energia radiante è però espresso numericamente in unità relative:

- fotometria e spettrofotometria:** trasmittanza (T%) e assorbanza (ABS)
- Nefelometria:** unità di torbidità nefelometrica (NTU)
- Turbidimetria:** turbidanza (S)
- Onde riflesse:** riflettanza

altri

Da questi valori per risalire alla concentrazione si utilizzano degli standard, soluzioni a concentrazione nota del metabolita che vengono analizzate con la stessa metodica utilizzata per il campione biologico a concentrazione sconosciuta. Il risultato strumentale ottenuto sul campione viene confrontato con quello degli standard

$$\text{lettura dello standard: } \text{lettura campione} = \text{conc std} : \text{conc campione}$$

$$C \text{ analita} = (\text{lett strum campione} / \text{lett strum std}) * \text{conc std}$$

Concentrazione standard = 80 μM e Abs standard = 0,54

Concentrazione campione ? μM e Abs campione = 0.32

$80:0.54 = x:0.32$ Concentrazione campione = 47.4 μM

In alcune analisi abbiamo un solo standard, il più delle volte però abbiamo una **s**, ho perciò ad esempio 10 standard e mille campioni, molte volte si utilizzano più standard per ottenere un'equazione di una retta che mi permette di risalire alla concentrazione. Ho una serie di soluzioni standard a concentrazione nota con cui si costruisce una curva della risposta rispetto alla concentrazione e dalla quale si ottiene un'equazione che interpreta il variare della risposta rispetto alla dose in quel particolare test analitico.

Le risposte al test vengono riportate su un grafico e si ottiene una curva dose-risposta, possibilmente una retta. Se la curva dose risposta è lineare si può effettuare una regressione lineare e utilizzare l'equazione della retta di regressione per risalire alla concentrazione ($y = bX + a$) b è la pendenza e a è dove interseca, in pratica prendo i risultati analitici concentrazione/risposta, li faccio diventare lineari e vi faccio passare una retta di regressione, il computer comunica l'equazione di quella retta che avrà un valore di b e di a . Conosco poi la y del campione, a questo punto faccio:

$$\text{Conc camp} = (\text{risp camp} - a) / b$$

Esempio: misuro il campione e ho un valore di abs 1.22, devo trovare la concentrazione.

ho una scala di standard (0.2 è 1 mg/ml; 0.4 è 5 mg/ml; 0.6 è 10 mg/ml; 1.2 è 25 mg/ml....), gli standard li metti sul grafico e il computer mi dice che la retta ha equazione $y=0,04x + 0,28$.

A questo punto conosco b ed a quindi posso trovare la concentrazione che corrisponde a 1.22:

$$(1.22 - 0,28) / 0.04.$$

Un passaggio fondamentale è interpolare i dati, se ho nel grafico un punto molto sballato lo elimino e creo una retta il più affidabile possibile, per valutare se la retta è buona si utilizza il coefficiente di regressione lineare (r^2) che deve essere maggiore di 0.9.

LOL=limit of linearity (dove il grafico diventa lineare)

LOD=limit of detection (dove inizia la risposta).

Trasmittanza e assorbanza

Dagli strumenti che sfruttano un fascio luminoso ottengo dei valori relativi, dallo strumento ottengo un valore di **trasmittanza T%** che è il rapporto fra l'intensità del flusso luminoso trasmesso (i) e l'intensità di quello incidente (i0). Zero trasmittanza significa che tutte le onde sono state assorbite, se passano tutte è uguale a 1. $T = i/i_0$. Viene solitamente espresso in percentuale. Successivamente tuttavia la trasmittanza viene trasformata in **assorbanza (ABS)** che è il $\log(1/T)$ cioè è il logaritmo in base 10 del reciproco della trasmittanza quindi nel momento in cui uso il valore percentuale di trasmittanza l'assorbanza sarà:

$$ABS = \log_{10} 100/T\%$$

Tanto più è scuro il campione tanto è alto il valore di assorbanza.

La trasmittanza di una molecola fotoassorbente in soluzione è inversamente proporzionale alla concentrazione, funzione ESPONENZIALE (iperbolica) della concentrazione.

L'assorbanza di una molecola fotoassorbente in soluzione è direttamente proporzionale alla concentrazione ed è funzione sigmoide della concentrazione.

L'utilizzo dell'assorbanza permette facilmente di evidenziare dove la curva dose risposta perde la proporzionalità (range di linearità del dosaggio).

L'intensità della luce trasmessa da una soluzione dipende non solo dalla concentrazione ma anche:

- Intensità della luce incidente
- Lunghezza d'onda della luce incidente
- spessore attraversato (cammino ottico)
- Natura chimica della sostanza assorbente
- Concentrazione del soluto

Dall'assorbanza alla concentrazione senza utilizzo di uno standard

Questo concetto si basa sulla **legge di Lambert-Beer** che dice che la concentrazione dell'analita può essere calcolata senza utilizzo di uno standard dalla legge di Lambert-Beer se si conosce **coefficiente di estinzione molare (epsilon)** della sostanza a quella specifica lunghezza d'onda:

$$A = \epsilon * b * c \rightarrow c = \frac{A}{\epsilon * b}$$

Il coefficiente di estinzione molare è un numero che viene trovato in tabella che è uno standard virtuale, è l'assorbanza che ha una soluzione con concentrazione 1M ad una specifica lunghezza d'onda. Per la tirosina è 1.405, vuol dire che una soluzione 1M di tirosina in una cuvetta da 1cm assorbe a λ 274.25 nm: 1.405. Per sapere poi la concentrazione lo utilizzo nella formula di prima.

Importante è quello del $\text{NADH}+\text{H}^+$ che ha epsilon a λ 340 nm: 6300. A quella lunghezza d'onda il NAD^+ non assorbe mentre $\text{NADH}+\text{H}^+$ assorbe, sia la forma ossidata sia quella ridotta assorbono a 260nm, quando il NAD^+ si riduce perde la natura aromatica dell'anello piridinico formando un composto similchinonico che ha una forte assorbanza nel vicino ultravioletto.

Metodo uv per quantificare il glucosio

- 1) $\text{atp}+\text{glucosio} \rightarrow (\text{esochinasi}) \text{ adp} + \text{g6p}$
- 2) $\text{g6p} + \text{NAD}^+ \rightarrow (\text{g6PDH}) \text{ glucono-lattone-6-P} + \text{NADH} + \text{H}^+$

Si forma tanto nad ridotto quante molecole di glucosio c'erano nella provetta, devo fare questa misurazione a 340 perchè questa λ differenzia le due molecole in base alle loro capacità di assorbimento.

La quantità di glucosio nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di nad ridotto che si forma.

Metodi chimici

Sono **metodi indiretti**, si fa avvenire una reazione di tipo chimico quindi reagenti non strettamente biologici. Sono metodi di analisi indiretti e a seguito della reazione misuro. Gli analiti dosati con metodi chimici sono

-Bilirubina -Potassio -Urobilogeno -Creatinina (metodo chimico meno accurato di altri) - Proteine totali -Emoglobina -Corpi chetonici -Fosfati inorganici -Sodio -Magnesio -Fosforo - Ferro -Zinco -Calcio

Per quando riguarda il gruppo finale dai fosfati si possono dosare anche con metodi elettrochimici.

Il concetto generale è far avvenire una reazione chimica, il tipo di reattivo discrimina le analisi dei diversi analiti. Questa sostanza chimica cambia spettro di assorbimento e quindi lo posso poi misurare misurando le onde elettromagnetiche, si va a misurare o le onde elettromagnetiche assorbite o trasmesse oppure quelle riflesse. Non esistono metodi chimici su cui si misurano onde difratte o rifratte.

Prendiamo nel dettaglio quattro degli analiti prima visti:

- 1) **Bilirubina:** esistono due tipi di bilirubina, si utilizza il termine di bilirubina totale e bilirubina diretta (forma coniugata) il cui nome fa riferimento al metodo di analisi infatti reagisce direttamente con il reagente. Quando l'emoglobina viene tolta dai globuli rossi, degradata la parte proteica, il gruppo eme viene catabolizzato e da origine alla bilirubina. Il catabolita dell'eme viene rilasciato in circolo come bilirubina unita all'albumina (forma indiretta, non coniugata), raggiunge il fegato dove viene coniugata. Per essere escreta deve passare dal fegato dove viene trasformata in bilirubina diretta (forma coniugata) e da luogo ad un glucoronide della bilirubina. Se aumenta la bilirubina totale, quella coniugata o tutte e due danno luogo a diversi tipi di ittero. La bilirubina si dosa con un reagente chimico, a seconda del pH si hanno dei colori diversi, si tende a farli a pH alcalini. Si chiama reattivo di Ehrlich che è in grado di reagire direttamente con la bilirubina glucoronata (coniugata). Se non è coniugata non reagisce. La bilirubina indiretta è legata all'albumina e per reagire con il reattivo di Ehrlich deve essere preventivamente separata dall'albumina con alcool metilico, acetato di sodio-cafeina o dimetilsolfossido. La quantità di bilirubina nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto verde-azzurro che si forma, l'aumento dell'assorbanza misurato viene confrontato con quello di uno standard.
- 2) **Creatinina:** La concentrazione plasmatica di origine muscolare e/o alimentare è mantenuta costante nel plasma in quanto eliminata con le urine. La sua concentrazione nel plasma è un indice della filtrazione glomerulare. La creatinina con metodo chimico si dosa con il metodo di Jaffe, la creatinina reagisce con picrato alcalino dando un colore arancione-rosso la cui intensità dipende da quanta

creatinina c'è. Spesso i metodi chimici sono influenzati da diversi fattori a differenza del metodo enzimatico, per la creatinina esiste anche un metodo enzimatico. Come prima confronto l'assorbanza contenuta con uno std.

- 3) **Proteine totali:** le principali cause di alterazione della concentrazione delle proteine nel plasma sono variazioni del volume del plasma o aumento/diminuzione di alcune proteine plasmatiche ad esempio l'albumina che è la più presente. Il dosaggio delle proteine è anche necessario prima dell'analisi qualitativa delle proteine in campioni biologici in elettroforesi. Gli stessi metodi possono essere impiegati per il dosaggio di proteine in altri fluidi biologici. Esistono diversi metodi che differiscono le sostanze e i limiti di rilevabilità cioè quell'intervallo in cui ho una corrispondenza tra dose e risposta: Metodo del biuretto (colore porpora, limite tra 1 e 60 mg/mL) Metodo di Lowry (limite tra 10 a 500 microg/mL, per proteine molto poco concentrate), metodo di Bradford (limite tra 2 e 20 microg/mL). Si rende necessaria spesso una diluizione per rientrare in quei limiti.
- 4) **Emoglobina:** Determinata sul sangue intero diluito in soluzione litica ipotonica. La lisi dei globuli rossi è facilitata da un detergente anionico. La concentrazione è calcolata dall'assorbimento della soluzione di emoglobina o di un suo derivato. Il metodo più usato converte l'emoglobina in cianometemoglobina mediante cianuro di potassio e ferricianuro di potassio e misura dell'assorbanza a 540nm. P.Sesso utilizzati sistemi di chimica secca e rilevazione riflettanza. esistono dei sistemi per misurare l'emoglobina anche senza dover rompere i globuli rossi, l'emoglobina può essere determinata direttamente misurando l'assorbimento a 548,5 nm che è la lunghezza d'onda in cui assorbono sia ossiemoglobina che deossiemoglobina. L'utilizzo contemporaneo di 6 diverse lunghezze d'onda permette la misurazione contemporanea di emoglobina, ossiemoglobina, carbossiemoglobina, metaemoglobina e emoglobina ridotta sfruttando il diverso spettro di assorbimento e dire quindi quanto ce ne è in percentuale uno rispetto all'altro. Uno strumento invece chiamato pulsiossimetro è costituito da due diodi tra cui passano due onde elettromagnetiche nei campi del rosso e dell'infrarosso e da qui si risale alla percentuale di emoglobina ossigenata e non ossigenata, nell'uomo si fa sul dito mentre negli animali l'unico punto dove si raggiungono i capillari è sulla lingua.

Sempre all'interno dei dosaggi chimici molto spesso tutto questo si applica con le **multi reagent strips** che sono strisce, nei diversi punti della striscetta vengono immobilizzate sostanze diverse e avvengono reazioni diverse che oissi confrontare poi con una scala cromatica.

Metodi Enzimatici

Nei campioni biologici posso usare gli **enzimi per dosare gli analiti** (aggiungiamo un enzima al campione e questo trasforma solo il suo substrato) oppure per il dosaggio di enzimi. Gli analiti che si possono analizzare sono diversi.

La prima cosa che occorre ricordare è che è un **metodo a termine** ed è la grossa differenza rispetto al dosaggio dell'enzima, se voglio dosare un analita in un campione biologico devo mettere un enzima e aspettare la fine della reazione, dopo di che misuro la modificazione e non si misura la velocità della reazione perchè quello che importa è quanto prodotto si è formato. registro all'equilibrio la variazione complessiva del parametro misurato quando tutto il substrato è stato convertito in prodotto.

conc analita = variazione della concentrazione del substrato/prodotto/coenzima al termine della reazione

esempio: acido lattico, voglio sapere quanto lattato c'è, aggiungo la LDH (lattatto

deidrogenasi) che catalizza l'ossidazione del lattato a piruvato. Prendo il campione, lo metto in uno strimento che legge a 340, aggiungo LDH e dopo il tempo che so necessario per far finire la reazione misuro il dato. Non improta il tempo, mi interessa la differenza tra inizio e fine. L'assorbanza aumenterà fino a 340 perche si riduce.

I metodi a termine sono tempi brevi, la quantità di enzima aggiunto è tale da garantire una cinetica di primo ordne e tale da portare a termine la reazione, normalmente in 2-3 minuti. Il reagente limitante deve essere il substrato: la miscela deve avere tampone e pH ottimale, cofattori e coenzimi dell'enzima utilizzato. Non è così importante che la reazione avvenga ad una temperatura controllata perfettamente, ma ad una temperatura che nei tempo previsti porti comunque a termine la reazione (25-30 °C).

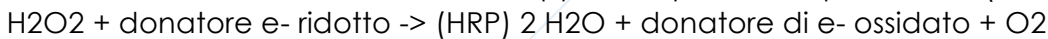
Per misurare poi il prodotto o il substrato uso metodi basati sull'energia radiante quindi differenza di assorbanza, rlu, rfu al termine della reazione.

Se è noto epsilon di uno dei reagenti:

$$\text{Concentrazione} = \frac{\Delta Abs}{\epsilon} * \frac{Vt}{Vc * n}$$

dove **Vt** è il volume della miscela di reazione, **Vc** è il volume del campione, **n** sono le molecole di cromoforo trasformate per molecola di metabolita da dosare.

Alcuni enzimi utilizzati in reazioni accoppiate: Il primo è la perossidasi (HRP):



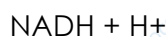
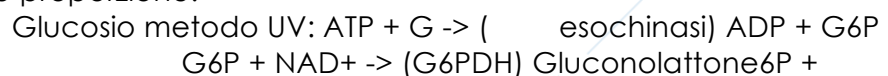
In laboratorio si utilizza una perossidasi di origine vegetale (dal rafano), il suo scopo è prendere una molecola di acqua ossigenata e ridurla ad acqua e ossigeno. La perossidasi per fare questo deve prendere gli elettroni da qualche parte, in laboratorio quello che si fa è utilizzare dei donatori di elettroni che quando cedono elettroni cambiano spettro di assorbimento. Esistono dei donatori di elettroni che cambiano quindi il loro spettro, i donatori di elettroni utilizzati che ossidati hanno assorbimento nel visibile sono ABTS (composto verde, assorbanza a lambda 405/436), OPD (composto arancio, assorbanza a lambda 490) o reattivo di Trinder (composto rosso, assorbanza a lambda 510). I donatori di elettroni utilizzati che ossidati emettono nello spettro del visibile sono: Luminolo (composto luminescente, emissione a lambda 425).

Oltre alla perossidasi abbiamo la luciferasi di lucciola (ATP indipendente) o di batteri (NAD dipendente), la luciferasi batterica è usata per dosare ossidoriduzioni NAD+ dipendenti, la luciferasi di batteri può essere utilizzata come reazione accoppiata di tutte le reazioni NAD+/NADH+H+ dipendenti. La luciferasi di lucciola per dosare attività enzimatiche ATP dipendenti.

Vediamo i metodi di analisi di vari analiti

- **Glucosio:** il glucosio si può dosare con vari metodi distinti per il passaggio finale, esiste un metodo colorimetrico quindi alla fine utilizzerò un'onda elettromagnetica nel visibile.
 - G + H₂O + O₂ → (glucosio ossidasi) acido gluconico + H₂O₂
 - 2 Vie: a) H₂O₂ + reattivo di trinder → (perossidasi) chinonimina (lambda 510)
 - b) H₂O₂ + ABTS → (perossidasi) H₂O + composto verde (lambda 436 nm)

La quantità di glucosio nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di prodotti ossidati colorati che si formano, la glicemia si ricava poi confrontando con uno standard tramite proporzione.



Il procedimento finale è $\text{conc} = (\Delta A / \epsilon * d) * (Vt / Vc * n)$

Metodi in luminescenza: luciferasi di Lucciole: ATP + glucosio → (esochinasi) adp + g6p
 Luciferina + atp + o2 → luciferasi di lucciola ossiluciferina + amp + co2 +

fotone Luciferasi batterica: 4 reazioni. Poi per il glucosio abbiamo il dosaggio su cartine e strip con lettura in riflettanza per dosaggio semiquantitativo. Esistono poi biosensori sensibili al glucosio che sfruttano quindi un segnale elettrico.

- Acido lattico: metodo UV: test con misurazione di aumento di assorbanza a 340 nm.
- Corpi chetonici:
- Fosfati: NBNBNBNBNBNB tutte queste reazioni studia in particolare solo uno di questi analiti.
- Colesterolo:
- TG

Visti i metodi di dosaggio degli analiti con metodi enzimatici ora vediamo i **metodi enzimatici per il dosaggio degli enzimi**, il nostro scopo è quindi sapere se c'è l'enzima. Esistono enzimi che sono indicatori di patologie. Un aumento della concentrazione di alcuni enzimi nei liquidi biologici può essere un indice preciso di un danno cellulare.

I meccanismi responsabili di un aumento degli enzimi nel plasma sono danno o necrosi, aumento di turnover, induzione enzimatica in cui aumenta la sintesi proteica dell'enzima e ostruzione dei dotti escretori di ghiandole esocrine.

Gli enzimi con significato biochimico clinico sono una decina, per non sbagliare su che enzima si sta facendo il dosaggio c'è un **numero specifico** che è ad esempio 2.7.1.1 che è un codice internazionale che identifica l'enzima. Gli enzimi principali sono alanina aminotransferasi (ALT) EC 2.3.2.2, aspartato aminotransferasi (AST) EC 2.6.1.1 o Creatin chinasi (CK) EC 2.7.3.2 e queste tre sono le transferasi; nel gruppo ossidoriduttasi c'è lattico deidrogenasi (LDH) EC 1.1.1.27 e alfa e beta idrossibutirrato deidrogenasi (HBDH); nel gruppo idrolasi c'è fosfatasi alcalina (ALP), amilasi (AMY), lipasi (LIP) e colinesterasi (ChE). Così come negli analiti sapere la teoria e poi delle prossime solo uno nel dettaglio come esempio.

Gli enzimi sappiamo che sono proteine, sono espressione del codice genetico e agiscono come biocatalizzatori ed accelerano la velocità di reazione senza modificarne la costante di equilibrio. La velocità di reazione è la quantità di substrato che viene convertita in prodotto nell'unità di tempo. 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. Nel dosaggio enzimatico si misura l'**attività catalitica** e non la concentrazione di uno specifico enzima, l'attività catalitica di un enzima è proporzionale alla concentrazione dell'enzima ma dipende anche da molti altri fattori che devono essere eliminati.

La quantità degli enzimi si esprime come **velocità della reazione catalizzata**: quantità di substrato trasformato in prodotto nell'unità di tempo. Nel SI l'unità di attività catalitica è il **Katal (kat)**, 1 katal è la quantità di enzima che trasforma una mole di substrato in prodotto in un secondo. Nel sistema tradizionale si utilizza l'unità (U). Normalmente si utilizzano dei sottomultipli. La velocità di una reazione però dipende anche da concentrazione dell'enzima, concentrazione del substrato, temperatura, pH e forza ionica della soluzione nella quale avviene. L'attività catalitica di un enzima è proporzionale alla concentrazione dell'enzima solo se il test è condotto in condizioni in cui l'unica variabile è l'enzima.

L'unica variabile della velocità di una reazione catalizzata è la quantità di enzima se si soddisfano le seguenti condizioni: temperatura costante, pH costante, concentrazione ionica costante, quantità di substrato cinetica di ordine zero. La velocità di una reazione è esponenzialmente correlata alla temperatura quindi anche piccole variazioni della temperatura fanno aumentare di molto la velocità che aumenta del 10% ogni °C e raddoppia per ogni aumento di 10 °C. **I dosaggi enzimatici vengono di norma fatti tra 30 e 37 °C.**

Il legame tra enzima e substrato comporta interazioni non covalenti come forze di van der Waals, legami a H e attrazioni elettrostatiche, a parità di quantità di enzima cambia la velocità di reazione. L'attività catalitica è correlata allo stato di ionizzazione degli amminoacidi del sito attivo. Il pH e la concentrazione di sali nel tampone nella miscela di reazione condizionano quindi la velocità della reazione enzimatica.

La velocità di una reazione catalizzata V_0 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:

$$V_0 = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]}$$

L'enzima per funzionare si deve combinare con il substrato, a bassa concentrazione di S la maggior parte dell'enzima è nella forma libera e la concentrazione di enzima e substrato dipende dalla concentrazione del substrato. In queste condizioni la V_0 è proporzionale alla concentrazione di S (cinetica di primo ordine). Ad alta concentrazione di S tutto l'enzima è in forma (enzima+substrato) e la velocità dipende dalla concentrazione dell'enzima (cinetica di ordine zero, di saturazione o allo stato stazionario).

I dosaggi enzimatici sono eseguiti in cinetica di saturazione (ordine zero), con una quantità di substrato vicina a quella che determina la V_{max} cioè quando il fattore limitante nella velocità di produzione del prodotto è la quantità dell'enzima. **K_m** è la quantità di substrato che dà metà della velocità massima, se diamo 100 volte la K_m si arriva al 99% della V_0 , è asintotico. La concentrazione di substrato deve essere 20-50 volte superiore alla K_m .

La K_m è la **costante di Michaelis-Menten**, è caratteristica dell'enzima per uno specifico substrato ed è la concentrazione del substrato alla quale la velocità iniziale è pari a metà della velocità massima.

Quindi abbiamo visto l'influenza di temperatura, pH, concentrazione di substrato. 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 è lineare nel tempo.

Dato che stiamo misurando una velocità si deve tenere conto di come il fenomeno avviene nel tempo alla velocità massima a cui riesco ad andare con quel campione, nel tempo posso misurare la concentrazione del substrato [S], del prodotto [P] oppure lo stato chimico di un coenzima.

$$\text{Velocità di reazione} = \frac{\text{variazione di substrato o prodotto}}{\Delta t}$$

Per valutare la variazione si utilizzano i metodi basati sull'energia radiante che già conosciamo. Se ci sono condizioni di cinetica di ordine zero, t, pH e forza ionica costanti la produzione di prodotto è lineare nel tempo:

Nel grafico prodotto/tempo vedo che la reazione all'inizio va alla velocità massima, ad un certo punto si arresta in quanto il prodotto finisce e quindi il grafico su y del prodotto formato non cambia più.

Ma come faccio a risalire al dato della macchina ai Katal? Io devo esprimere la variazione di assorbanza in un tempo, Posso farlo in due modi:

1. **A tempo fisso:** si ferma la reazione ad un certo punto e prima che si fermi per esaurimento della formazione del prodotto, si ferma in momenti predeterminati e si divide la misura della diminuzione del substrato o dell'aumento del prodotto per il tempo trascorso. Si utilizzano metodi ad un punto, a due punti o multipunto. Devo stare attento perchè quando lo faccio a tempo fisso c'è il rischio di effettuare la misurazione quando è già finita andando incontro così ad errori. Un altro svantaggio del tempo fisso sono la presenza di altre variabili ad esempio la velocità può cambiare perchè lo strumento si scalda o si raffredda, ne consegue un andamento non lineare, se lo faccio in tempo continuo posso scegliere di analizzare anche solo la porzione dove si osserva una linearità tra tempo e prodotto. Come abbiamo detto le misurazioni possono avvenire ad un punto (istante scelto, fermo la reazione, effettuo il calcolo dividendo il dato per il tempo), se sospetto un errore posso rifare il test e o lo faccio a più punti e verifico la linearità; oppure posso rifarlo ad un punto ma rifaccio il dosaggio con una quantità minore di enzima cioè se ho misurato 10 Kat con 10 microL, se metto 5 microL dovrò misurare la metà quindi 5 Kat
2. **In continuo:** Occorre uno strumento più complesso che da un lato mantiene le condizioni di temperatura costanti e dall'altro misura quello che succede in una provetta. Di fatto si registra la diminuzione del substrato o l'aumento del prodotto. Scelgo un intervallo di tempo e divido la misura della diminuzione del substrato o dell'aumento di prodotto per il tempo trascorso nel periodo selezionato.

Ci sono delle condizioni in cui nel campione ci sono sostanze che rallentano o favoriscono l'enzima, questo è un altro svantaggio delle misure a tempo fisso perchè non è possibile verificare la situazione a differenza del metodo continuo perchè nel grafico continuo osserverei variazioni nella pendenza.

Dalla misurazione devo poi risalire alle unità di misura degli enzimi quindi unità e Kat, l'attività enzimatica (Kat) è

$$\text{attività enzimatica} = \frac{\text{variazione substrato o prodotto}}{\Delta t} = \frac{\text{Variazione di ABS o RFU o RLU}}{\Delta t}$$

Per risalire dalla lettura strumentale alla concentrazione dell'analita nel campione si utilizzano gli std:

Attività campione (Kat/mL) : attività std (Kat/mL) = deltaR/t campione : deltaR/t std

Come prima se invece di avere un solo standard ne ho di più utilizzo la retta. Come nel dosaggio degli analiti si può arrivare alla concentrazione senza standard nelle reazioni di ossidoriduzioni NAD dipendenti

$$\text{conc} = \frac{\Delta \text{Abs}/t}{\epsilon d} * \frac{Vt}{Vc}$$

La differenza rispetto alla formula utilizzata nel dosaggio di analiti è che si introduce il tempo sulla variazione di assorbanza, **NB** questa differenza nel calcolo

della concentrazione dell'enzima che lo differenzia dal calcolo della concentrazione di un analita.

- 1) **Lattico deidrogenasi:** enzima ubiquitario (aumenta in processi di danneggiamento e necrosi di tutti i tessuti), simbolo LDH. Le cellule del sangue contengono LDH che può passare nel plasma anche prima di emolisi. EDTA e Ossalati inibiscono l'enzima. Piruvato + NADH + H⁺ -> (LDH) lattato + NAD⁺ essendo NAD dipendente posso utilizzare la formula senza utilizzo di uno standard. Ci sono sia dosaggi in UV che nel visibile. Nella reazione catalizzata da LDH prendo del piruvato, ne metterò una quantità sufficiente per essere in cinetica di ordine zero e aggiungo il campione, se c'è LDH nel campione si forma NAD⁺ per cui la variazione del NAD⁺ è proporzionale alla quantità dell'enzima. Nella formula devo ovviamente tenere conto del tempo come abbiamo visto. Posso poi farlo in luminometria: reazione da lattato a piruvato, luciferasi batterica utilizza FMNH₂ per ossidare aldeidi alifatiche.
- 2) **Beta-idrossibutirrato deidrogenasi:** anche questa è NAD dipendente quindi stesso apporcio ma devo cambiare che i microl del campione li metto in una provetta con alfa-chetobutirrato. Se c'è l'enzima si ha la formazione di NAD e misurando la variazione di assorbanza si risale al valore.
- 3) **Fosfatasi alcalina:** ubiquitario, ma presente soprattutto negli osteoblasti e nel fegato, nei giovani animali la fonte è l'osso poi soprattutto il fegato, epitelio dei dotti biliari molta ALP (fosfatasi alcalina), si usa un substrato che è 4 nitrofenolfosfato che con la fosfatasi da 4 nitrofenolo e fosfato, vado a vedere nel tempo quanto giallo si forma misurando l'assorbanza a 406nm (giallo). Risalgo all'attività catalitica con la solita formula ma epsilon non è 6300 che è del nad ma 18450 M. oppure confronto con uno standard.
- 4) **Amilasi:** enzima che catalizza l'idrolisi di legami alfa 1-4 omopolisaccaridi del glucosio. È un enzima pancreatico, aumenta nel plasma durante la pancreatite, nel cane l'attività dell'amilasi è 4-5 volte maggiore che in altre specie, non è riassorbito a livello di tubuli renali. L'amilasi si fa con test diretto con substrato sintetico CNPG3 a 405nm; oppure metodo indiretto in cui misuro sempre 405nm ma ho due reazioni e confronto con lo standard la variazione di assorbanza.
- 5) **Lipasi:** catalizza l'idrolisi di trigliceridi con preferenza alle posizioni 2 e 3, la sorgente è il pancreas esocrino. Lipasi idrolizza la trioleina in una emulsione acqua-olio (turbidimetria), la scomparsa della turbidità è proporzionale all'attività della lipasi (trioleina -> (LIP) ag + monogliceridi ; oppure in coloremimetria.
- 6) Colinesterasi: slide
- 7) Transaminasi: slide, alanina aminotransferasi e aspartato aminotransferasi.
- 8) CK e CPK
- 9) Isoenzimi

METODI IMMUNOCHEMICI

La quantità di sostanze che si possono dosare con questa metodologie sono numerosissime e quindi sono numerosissimi anche i test e di conseguenza i risultati. I più famosi sono i **test ELISA** in cui il passaggio finale è di nuovo la comparsa di qualcosa che quantifico con un numero come assorbanza o fluorimetria.

Un **metodo immunochimico** è quando faccio avvenire una reazione immunochimica (antigene-anticorpo), l'obbiettivo è quindi formare il complesso antigene anticorpo. Lo scopo poi è evidenziare questi complessi, antigeni e anticorpi sono utilizzati come reagenti di laboratorio.

Si definisce **anticorpo** o gammaglobuline o immunoglobuline sono sinonimi per un gruppo di glicoproteine presenti nel sangue, prodotte durante la risposta immunitaria umorale. Gli antigeni sono molecole immunogeniche capaci di stimolare la produzione di anticorpi e

di reagire con anticorpi. Un aptene è una molecola non immunogenica ma che reagisce specificatamente con anticorpi.

Esistono diversi tipi di anticorpi, la differenza delle diverse classi anticorpali sono le diverse catene amminoacidiche, sono quindi proteine diverse. In generale tutti gli anticorpi hanno un PM di 160.000 quindi circa 1500 amminoacidi, un anticorpo è un tetramero costituito da due catene pesanti e due catene leggere, pesanti e leggere sono termini relativi, Una catena leggera è circa 25000 Da come PM mentre la catena pesante è circa 50.000 Da. Sono proteine molto grandi quindi, abbiamo detto che sono glicoproteine quindi oltre agli aa ci sono degli zuccheri. Catene pesanti e leggere sono tenute insieme da legami disolfuro, esistono legami all'interno delle catene ma anche tra le diverse catene. Nelle catene si distinguono delle regioni costanti e delle regioni variabili, la **regione costante** è uguale negli anticorpi, la **regione variabile** ha una sequenza di amminoacidi che varia, questo per essere compatibili con diversi amminoacidi, la regione variabile ha una zona ristretta che varia, ci sono delle regioni intervareabili, nella regione variabile ci sono tre zone in cui la sequenza aa è molto corta, queste catene sono quelle che riconoscono gli amminoacidi. Abbiamo quindi una grossa proteina in cui la zona che riconosce gli antigeni sono 10-15aa, sono il sito di legame e sono contenute nelle regioni variabili. Sono le regioni che determinano la complementarietà con l'antigene, ne esistono 3 sulla regione variabile della catena leggera e 3 sulla catena pesante. Nella struttura tridimensionale le regioni intervareabili si presentano come tre anse random coil all'estremità di una intelaiatura di foglietti beta-ripiegati.

Antigene è il termine della molecola in toto, come piccola è la parte dell'anticorpo che riconosce l'antigene tanto piccola è la parte dell'antigene che riconosce l'anticorpo, si definisce **epitopo** (vedi immunologia). Esistono epitopi continui o discontinui (residui aa non in sequenza). Se un antigene è di grandi dimensioni (PM>3000 Da) avrà tanti epitopi e potrà legare più anticorpi contemporaneamente, per legare più anticorpi un epitopo deve essere così grande.

Esistono **anticorpi policlonali** (anticorpi prodotti spontaneamente nella risposta immunitaria in vivo, sono un gruppo di anticorpi tutti contro lo stesso antigene ma che riconoscono diversi epitopi) o **monoclonali** (prodotti in vitro, riconoscono lo stesso epitopo quindi sono specifici), per fare i policlonali si vaccina di fatto, se è un immunogeno lo somministro mentre se è un aptene lo devo far diventare immunogeno e ci sono diversi metodi. Esistono diversi fattori da considerare per l'immunizzazione come animale, la dose, la via di somministrazione e il numero dei trattamenti da effettuare. Una volta immunizzato devo far sì che produca tanti anticorpi, poi devo prendere il plasma o il siero e andare ad eliminare tutto quello che è presente nel plasma e non sono anticorpi. Lo svantaggio è che comunque bisogna utilizzare animali in vivo, ogni animale risponde in modo diverso, morto quell'animale è finito l'antigene.

Per la produzione di monoclonali si sfruttano i topi, a seguito della risposta immunitaria il topo va sacrificato perchè ho bisogno della milza e quindi delle cellule di quel topo, il vantaggio è che le cellule vanno avanti a produrre monoclonali per l'eternità. In vitro poi mischio le cellule del topo con cellule ad esempio del mieloma, poi devo separare il tutto con dei passaggi e arrivo ad ottenere delle bottiglie in cui ho tutti i discendenti della cellula da cui derivano e producono tutti anticorpi monoclonali.

Il legame antigene anticorpo si realizza per la formazione di legami non covalenti (idrogeni, forze di coulomb e di van der waals), tra le catene laterali degli aa nelle regioni ipervareabili dell'anticorpo e i gruppi chimici dell'antigene nell'epitopo. La forza con cui si legano può essere quantificata da un numero, l'affinità di legame è calcolata riferendosi all'equazione $Ab + Ag \rightarrow Ab-Ag$ man mano che l'affinità aumenta aumenta anche la concentrazione del complesso antigene anticorpo, posso spostare a destra e a sinistra la reazione ad esempio cambiando il pH ma posso regolare il legame, la K_a costante di

associazione e K_d di dissociazione sono calcolate facendo il rapporto all'equilibrio tra la concentrazione dei reattivi che hanno reagito e quelli liberi:

$$K_a = \frac{1}{K_d(K \text{ di dissociazione})} = \frac{[Ag - Ab]}{[Ag][Ab]}$$

(moli/litro)

Maggiore è l'affinità e maggiore è la concentrazione del complesso, maggiore è la K_a e minore è la K_d . Gli anticorpi monoclonali utilizzati in tecniche immunochimiche hanno K_d tra 10^{-6} e 10^{-10} M vuol dire che all'equilibrio le concentrazioni del complesso antigene anticorpo sono in numero elevato rispetto alle concentrazioni degli elementi dissociati. Il numero che si da all'affinità è la K_d quindi tanto più è piccolo il numero e più l'affinità è grande e spostata verso destra è la reazione.

La forza di legame tra anticorpo e antigene dipende sia dalla complementarietà per cui se lo riconosce bene si forma il complesso altrimenti no e dipende da come le catene laterali degli aa dell'anticorpo e i gruppo chimici dell'epitopo si interfacciano.

Temperatura, pH e concentrazione ionica totale del mezzo possono poi condizionare K_a e K_d .

Per quanto un anticorpo sia specifico per un antigene spesso un anticorpo può riconoscere anche diversi antigeni e bisogna saper controllare questo fenomeno chiamato **cross-reattività**, ad esempio cortisolo e testosterone che hanno funzione e formule totalmente diverse hanno delle parti comuni, un anticorpo che riconosce una parte del testosterone comune anche a cortisolo e progesterone riconosce anche quelli dando cross reattività, più gli epitopi sono diversi e peggio li riconosceranno. Il numero di complessi antigeni anticorpo che si creano dipende dall'affinità.

L'attitudine di un anticorpo di riconoscere la molecola studiata in dosaggi immunochimici si esprime come percentuale di cross-reattività. Se 100% vuol dire che il mio anticorpo ha massima affinità per ad esempio estradiolo, avrà anche 1% per testosterone però perchè le strutture sono simili. Nel momento in cui si parla di proteine c'è un doppio problema, c'è un problema di cross-reattività: la caseina ad esempio in pecora cane e bovino non sono la stessa molecola quindi devo sapere l'anticorpo quanto lega quella proteina di quella specie, un anticorpo specifico per una proteina di una specie potrebbe non saper riconoscere la stessa proteina in un'altra specie, la specificità dei metodi immunochimici avrà il valore di cross-reattività e poi un valore di specie specificità che dice quell'anticorpo nei confronti di un ormone come lo riconosce nelle diverse specie.

Tutte queste informazioni ci portano a capire come si misurano i complessi antigeni anticorpo in una provetta sia che io voglia dosare l'anticorpo o l'antigene, possiamo distinguere test che usano reattivi non marcati e test che usano reattivi marcati. Si utilizzano ancora entrambi.

- 1) **Test che utilizzano reattivi non marcati:** semplici e rapidi ma con limite di rilevabilità scarso (10^{-6} M), vanno bene per dosare gli anticorpi che ce ne sono tanti ma per gli ormoni che hanno concentrazioni basse non sono sufficienti. Sono classificati in metodi in fase solida o fase liquida. Il principio su cui si basano tutti i test che usano i reattivi non marcati è il principio dell'immunoprecipitazione: devo creare qualcosa di talmente grosso che precipita, è talmente grosso che lo posso vedere ad occhio nudo. L'immunoprecipitazione di basa sul principio che ogni anticorpo ha due siti di legame e può legare due antigeni contemporaneamente, si forma quindi un reticolo di grosse dimensioni che precipita. Può essere sfruttata solo con gli anticorpi policlonali quindi. Sia in eccesso di anticorpi che di antigeni l'immunoprecipitato non si forma perchè si forma solo all'equilibrio. L'immunoprecipitazione può avvenire in fase solida in gel agar, le soluzioni di ab e ag migrano 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

- 2) **Test che usano reattivi marcati:** tecniche molto sensibili con limite fino a $10^{-14}M$, ad esempio ELISA, RIA, IRMA, FIA... si unisce la specificità della reazione immunologica con la sensibilità delle tecniche di rivelazione della marcatura, largamente utilizzati in biochimica clinica per quantificare sia antigeni che anticorpi, prevedono 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. Esistono un test indiretto, competitivo, sandwich, sandwich con amplificazione. In tutti i test si aggiunge un antigene o un anticorpo marcato e si va a quantificare il segnale emesso dal complesso antigene-anticorpi. Esistono i cosiddetti sistemi eterogenei in cui devo separarli (reagiti e non reagiti) per misurare solo il segnale di quelli che hanno reagito, esistono poi i sistemi omogenei in cui la formazione del complesso modula il segnale emesso. La separazione può essere fatta in fase liquida (soluzione in provetta) oppure in fase solida (provette, piastre, stick, palline in polistirene, lego uno dei due reattivi ad un supporto solido, la separazione si fa svuotando la provetta).

Dosaggi immunoenzimatici

L'antigene o l'anticorpo sono marcati con un enzima, mediante un legame covalente tra residui amminoacidici dell'enzima e gruppi chimici dell'antigene o dell'anticorpo. 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 del complesso antigene-anticorpo. Nei metodi eterogenei la separazione dei complessi antigene-anticorpo dagli antigeni e anticorpi liberi può essere sia in fase liquida che in fase solida. Tra i più famosi troviamo **ELISA**:

Enzima Linked Immuno Sorbent Assay, tra gli enzimi più utilizzati ci sono perossidasi di rafano, fosfatasi alcalina e beta-galattosidasi. Il prodotto della reazione enzimatica è quantificato con metodiche basate sull'energia radiante, a seconda dell'enzima utilizzato per la marcatura e del substrato si usano colorimetria, luminometria, spettroscopia di riflettanza o fluorimetria.

1) Perossidasi di rafano:

I donatori di elettroni che ossidati hanno assorbimento nel visibile (colorimetria) sono ABTS che è un composto verde e quindi lettura a λ 405/436 oppure OPD che è un composto arancio e quindi lettura a 490. I donatori di elettroni che ossidati danno emissione di luce (luminometria):

2) **Fosfatasi alcalina:** catalizza la defosforilazione di substrati sintetici che defosforilati danno assorbimento nel visibile

3) **beta-galattosidasi:** catalizza l'idrolisi di beta-galattosidi in monosaccaridi.

Gli **ELISA** si classificano a seconda dell'architettura in tre tipi comuni di test: per quantificare anticorpi si ha l'ELISA con anticorpi-anti-anticorpi (indiretto), per quantificare antigeni possiamo avere ELISA competitivo o ELISA a doppio anticorpo (sandwich).

1. **ELISA con anticorpi-anti-anticorpi:** l'antigene è legato alla fase solida, si aggiunge il siero da testare e si lascia incubare per 1-12h. Con un lavaggio elimino tutte le

molecole che non si sono legate in modo specifico all'antigene. Per rivelare il complesso antigene-anticorpo utilizzo un anticorpo anti-anticorpo specie-specifico marcato con un enzima. L'anticorpo anti-anticorpo riconosce gli anticorpi di uno o più isotipi di una specie animale indipendentemente dalla loro specificità antigenica. È quindi possibile utilizzare lo stesso anticorpo marcato per diverse patologie nella stessa specie ma è necessario avere anticorpi specifici per la stessa patologia in diverse specie. Dopo un lavaggio che elimina gli anticorpi marcati che non si sono legati in modo specifico ai complessi antigeni-anticorpi sulla fase solida aggiungo il substrato dell'enzima. La concentrazione degli anticorpi nel campione è direttamente proporzionale alla quantità di prodotto della reazione enzimatica (risposta del test)

2. **ELISA competitivo per quantificare antigeni:** l'anticorpo specifico per l'antigene 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 antigene marcato con un enzima. Si verifica competizione tra l'antigene presente nel campione (libero) e l'antigene marcato aggiunto al campione per il legame con un anticorpo legato alla fase solida. Con un lavaggio elimino le molecole (Ag) che non si sono legate in modo specifico all'anticorpo, per rivelare i complessi antigene-anticorpo aggiungo il substrato dell'enzima e la concentrazione dell'antigene nel campione è inversamente proporzionale alla risposta del test (test competitivo). Questo test è utilizzabile per dosare qualsiasi tipo di antigene ma è unico per antigeni con basso peso molecolare (sotto i 1000) che non possono legare contemporaneamente due o più anticorpi. Antigeni di piccole dimensioni anche se hanno più epitopi possono legarsi ad un solo anticorpo. Antigeni di grandi dimensioni con più epitopi possono legare invece più anticorpi.
3. **ELISA sandwich per quantificare antigeni:** un primo anticorpo specifico per l'antigene è legato alla fase solida, si aggiunge il campione di plasma/siero da testare, con un lavaggio elimino le molecole (Ag) che non si sono legate in modo specifico all'anticorpo. Aggiungo un secondo anticorpo marcato specifico per l'antigene che si vuole dosare e che si è eventualmente legato al primo anticorpo, l'antigene da determinare fa da ponte tra il primo anticorpo legato alla fase solida e il secondo anticorpo marcati (si forma un sandwich); con un secondo lavaggio elimino tutte le molecole (anticorpi marcati) che non si sono legate in modo specifico all'antigene legato al primo anticorpo, per rivelare i complessi anticorpo-antigene-anticorpo aggiungo il substrato dell'enzima, la concentrazione dell'antigene è direttamente proporzionale alla risposta del test. L'antigene deve avere almeno 2 epitopi e una dimensione che garantisca una distanza sufficiente per legare contemporaneamente due anticorpi, i due anticorpi devono legare 2 epitopi diversi.

Dalla lettura strumentale alla concentrazione dell'analita nei test immunochimici

Nei test immunochimici abbiamo l'espressione del **titolo anticorpale**, troveremo sempre a fianco del titolo anticorpale il metodo in cui è stato fatto. Il titolo anticorpale dipende strettamente dal metodo che si usa.

Quantità di anticorpi presenti in un campione di plasma o siero degli animali non viene espressa come un valore assoluto di concentrazione ma con un valore relativo che è il **Titolo anticorpale**. Il titolo anticorpale è l'ultima diluizione del campione in cui si ha reattività significativamente diversa dal bianco con una specifica metodica. Si conduce il test immunochimico su campioni del siero diluiti serialmente, l'ultima diluizione in cui si ha reattività corrisponde al titolo anticorpale di quel siero con quella metodica. Il valore del

titolo anticorpale dipende dalla concentrazione degli anticorpi nel plasma sia dalla metodica.

Nel caso in cui si hanno metodi immunochimici con reattivi non marcati un esempio è la tecnica dell'immunodiffusione in gel di agar, si fanno dei pozzetti in un gel e si fanno diluizioni seriali nei pozzetti.

Se voglio dosare anticorpi posso utilizzare un'elisa indiretta, composta da una lettura a $\lambda 405$.

Nell'ultima fila delle diluizioni non ho messo anticorpi ed è quindi il limite. Praticamente il titolo anticorpale è dato ad esempio se nell'animale vedo che il colore verde non si vede più da 1/1600 allora quello è il suo titolo anticorpale. Per ogni pozzetto avrò un valore di assorbanza, faccio la media delle misurazioni di assorbanza. Il titolo anticorpale sarà quando il valore di assorbanza scende sotto 0,3 (valore misurato sulla fila di tutti bianchi, limite).

Costruisco delle curve, trasformo la curva discendente in una curva ad andamento sigmoidale facendo un grafico da ABS (Y) a diluizioni (X), un grafico dove sulle X ho il log in base 10 della diluizione. Calcolo la media dei bianchi e la Deviazione standard. Il titolo anticorpale è l'ultima diluizione che dà un segnale superiore a quello della media dei valori del bianco +2DS

Qui torniamo al concetto del confronto con uno o più standard, nel secondo caso costruisco un grafico dose risposta dove cerco di avere una relazione lineare così da avere l'equazione della retta.

Quantificazione di antigeni in plasma o siero

Si utilizzano degli **standard**, soluzioni a concentrazione nota dell'antigene. Si costruisce una curva della risposta del test (Y) rispetto alla concentrazione nota dello standard (X). Si costruisce ancora il grafico, all'aumentare della concentrazione l'assorbanza aumenta. Dobbiamo utilizzare però l'equazione di una retta, perciò non faccio altro che trasformare da una scala lineare ad una scala logaritmica ma in questo caso lo scopo è avere una zona lineare su cui calcolare la retta. Avrei potuto farlo anche per il titolo anticorpale ma lo facevo per vedere il limite. Quindi qui trasformo gli std in logaritmo, devo ora studiare le zone dove posso avere una retta quindi escludo i punti che non sono su una retta, faccio passare la retta di regressione tra questi e sarà la retta std che risolve il test. L'altro parametro è il r^2 che più è vicino all'uno e più i punti sono lineari. La concentrazione dell'antigene nel campione è calcolata facendo un'interpolazione nella regione lineare del grafico. Questo è il caso dell'elisa semplice, nell'elisa competitiva l'asse delle Y non viene messo in valore assoluto ma in valore percentuale rispetto al valore massimo possibile. $B/B_0 * 100$ dove B è la lettura strumentale ottenuta dai campioni std o ignoti contenenti l'antigene libero da quantificare e B_0 è la lettura strumentale ottenuta con un campione std nel quale c'è solo Ag marcato quindi concentrazione 0 dell'Ag libero (lettura massima). Questo garantisce maggiore riproducibilità del test e facilita il confronto tra le letture strumentali ottenute con la stessa metodica ma in tempi diversi. La trasformazione logaritmica dei valori delle concentrazioni trasforma la curva che interpola i punti dose-risposta degli standard da iperbolica a sigmoide. In una distribuzione sigmoide si possono facilmente individuare i punti standard in cui c'è proporzionalità tra dose e risposta, si scelgono i punti che hanno una relazione lineare

dose-risposta e su questi si calcola una retta di regressione della cui equazione si risale alla concentrazione del campione.

Lateral flow immunoassay

Riguardo questa tecnica possiamo avere sistemi con anticorpi o antigeni legati a particelle solide colorate (latex) o sistemi con anticorpi o antigene coniugati con un enzima.

1. **Sistemi lateral flow con particelle colorate per la ricerca di antigeni:** sia nei test sandwich che nei test competitivi per la ricerca di antigeni le particelle colorate sono rivestite di anticorpi specifici per l'antigene cercato. Inoltre in entrambi i tipi di test sulla linea di controllo sono immobilizzati degli anticorpi anti anticorpi specie-specifici per gli anticorpi legati alle particelle colorate. Nei test sandwich per la ricerca di antigeni sulla linea 1 (test) sono immobilizzati anticorpi specifici per gli antigeni cercati. L'antigene, se presente, fa da ponte tra l'anticorpo immobilizzato sulla linea e quello sulle palline (sandwich) e compare una linea colorata. Sulla linea 2 (controllo) sono immobilizzati degli anticorpi specie-specifici che riconoscono gli anticorpi legati alle particelle colorate. Se il flusso del campione di plasma è stato regolare compare sempre una linea colorata. Un altro tipo di test è quello competitivo per la ricerca di antigeni con particelle colorate, nel test competitivo sulla prima linea sono immobilizzati Antigeni uguali a quelli cercati. L'antigene nel plasma, se presente, satura gli anticorpi sulle palline e impedisce il loro legame con gli antigeni immobilizzati sulla linea e quindi la linea si forma solo in assenza di antigeni nel campione. Sulla seconda linea sono immobilizzati anticorpi anti-anticorpi. Se il flusso di plasma è stato regolare compare sempre una linea colorata
2. **Test con particelle colorate per la ricerca di anticorpi:** nei test per la ricerca di anticorpi le particelle colorate sono rivestite dall'antigene specifico per l'anticorpo cercato. Sulla prima linea sono immobilizzati gli antigeni specifici per l'anticorpo cercato, sulla seconda linea sono immobilizzati degli anticorpi specifici per l'antigene di cui è rivestita la particella.
3. **Sistemi lateral flow con reagenti coniugati ad un enzima:** abbiamo anche qui diversi tipi di test. Inanzitutto un test sandwich che serve per la ricerca di antigeni con più epitopi (filaria, felv, lipasi...). Sul test spot sono immobilizzati anticorpi specifici per l'antigene ricercato mentre sul control spot sono immobilizzati anticorpi anti-anticorpo che legano l'anticorpo marcato con enzima. L'antigene presente nel campione si lega all'anticorpo specifico marcato con l'enzima. La striscia di nitrocellulosa è rivestita in un punto determinato con anticorpi specifici per l'antigene ricercato, il complesso anticorpo marcato/antigene si lega all'anticorpo presente sulla matrice formando un tipico "sandwich", il sistema viene attivato e una soluzione di lavaggio elimina l'anticorpo 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 anticorpi anti-anticorpo che non riconoscono l'anticorpo marcato:

Altro tipo di test con anticorpi coniugati ad enzimi per la determinazione di antigeni è il test competitivo, sul test spot vengono immobilizzati antigeni uguali a quelli cercati mentre sul control spot sono immobilizzati anticorpi anti-anticorpo che legano l'anticorpo marcato con enzima.

METODI ELETTROFORETICI

L'**Elettroforesi** in medicina veterinaria viene applicata sia per l'analisi delle proteine (quantificazione delle frazioni proteiche nel siero, quantificazione delle frazioni proteiche nelle urine per patologie renali o extrarenali, quantificazione di isoenzimi e isoormoni nel plasma per antidoping ad esempio e caratterizzazione delle proteine nei tessuti per analisi per caratterizzazione di specie) ma anche per analisi del DNA e RNA (diagnostica malattie infettive, diagnostica malattie parassitarie, identificazione di specie degli alimenti di origine animale, identificazione OGM e clonaggio). Si distinguono due tipi di metodi elettroforetici di base:

L'**elettroforesi** consiste nella migrazione e 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:

La **velocità di migrazione** di uno ione in un campo elettrico dipende dall'equilibrio tra forza di spinta del campo elettrico, la carica netta dello ione e le forze frenanti del mezzo:

$$v = \frac{E * q}{f}$$

Dove **v** è la velocità della molecola, **E** è il gradiente di potenziale, **q** è la carica della molecola e **f** è il coefficiente frizionale.

Possiamo analizzare con elettroforesi solo le molecole che contengono gruppi ionizzabili quindi aminoacidi, peptidi, proteine, nucleotidi e acidi nucleici.

Elettroforesi delle proteine

La carica di una proteina è dovuta alla presenza di gruppi carbossilici e aminici, il pH della soluzione condiziona lo stato di ionizzazione dei gruppi aminici e carbossilici:

Sulla superficie di una proteina possono essere presenti contemporaneamente gruppi carichi positivamente e negativamente, un gruppo carico positivamente è l'amminico terminale, un gruppo carico negativamente è il carbossilico terminale e molti gruppi carichi positivamente e/o negativamente sono le catene laterali degli aminoacidi, il numero e la carica dipende quindi dalla sequenza amminoacidica della proteina.

Il **pH** della soluzione condiziona lo stato di ionizzazione dei gruppi aminici e carbossilici terminali di una proteina e anche delle catene laterali allo stesso modo, la carica di una proteina dipende quindi dal pH e anche dal suo punto **isoelettrico (pI)**, Il Punto Isoelettrico di una proteina è il pH al quale la proteina ha carica netta nulla: la somma delle cariche degli aminoacidi carichi positivamente è uguale a quella di quelli carichi negativamente. Il pI è una caratteristica specifica di ogni singola proteina e dipende dalla sequenza amminoacidica:

Ad influenzare la velocità che abbiamo prima visto ci sono diversi fattori:

- 1) **Campo elettrico**: quando tra due elettrodi viene applicata una differenza di potenziale, misurata in Volt, si genera una corrente elettrica (flusso di cariche attraverso un materiale conduttore), la quantità di carica che scorre nell'unità di

tempo è l'intensità di corrente misurata in Ampere, la carica elettrica che si muove nel conduttore svolge un lavoro e si genera una potenza (W) che viene dissipata come calore, la velocità di migrazione è direttamente proporzionale alla corrente: è possibile accelerare la migrazione aumentando il voltaggio applicato. Bisogna trovare un compromesso tra corrente, tempi di separazione e usare un sistema di refrigerazione. Importante è anche l'alimentatore, deve fornire corrente continua stabilizzata tra gli elettrodi e avere tensione e amperaggio regolabili.

- 2) **Tampone:** Serve per il trasporto della corrente, determinare e tamponare il pH della soluzione e determinare la carica netta delle molecole da separare. La direzione e la velocità di migrazione dipendono dal pH del tampone che è normalmente tra 2 e 10, un'alta forza ionica riduce la quota di corrente trasportata dal campione e quindi si ha minore velocità di migrazione.
- 3) **Supporto di migrazione:** la migrazione delle proteine sottoposte al campo elettrico avviene su un supporto solido, le proteine migrano in bande o zone, i supporti solidi sono acetato di cellulosa (il più utilizzato in biochimica clinica per le analisi delle sieroproteine con metodica basata su separazione in base alla carica netta, è inerte e quindi non contribuisce alla separazione), Gel di agarosio (molto utilizzato per le analisi di DNA e RNA, si solidifica oltre i 65 °C, è attivo e quindi contribuisce alla separazione per azione di setaccio molecolare) e Gel di poliaccrilamide PAGE (utilizzato per analisi delle proteine quando necessario alto potere di risoluzione, in biochimica clinica è utilizzato per l'analisi delle proteine nelle urine. È attivo e quindi contribuisce alla separazione per azione di setaccio molecolare, la porosità del gel dipende dalla percentuale di acrilamide-bisacrilamide).
- 4) **Natura chimica della molecola:** si parla di carica, dimensione e forma

Fissazione e colorazione delle proteine dopo elettroforesi

La **fissazione** serve per bloccare la diffusione delle proteine fuori dal supporto solido, per evidenziare poi le proteine dopo la separazione si utilizzano:

- a. **Metodiche non specifiche:** colorano tutte le proteine e sono Rosso Ponceau (nelle analisi delle sieroproteine dopo elettroforesi su acetato di cellulosa, le proteine assumono una colorazione rossa, sensibilità bassa, fissaggio con acido tricloroacetico 10%), Coomassie brilliant blue R-250 (in tutte le elettroforesi su gel di poliaccrilamide, fissaggio con acido acetico 10% e metanolo al 50%, le proteine assumono una colorazione blu/viola, metodo con alta sensibilità e quantitativo), Nitrate di argento (elettroforesi su gel, fissaggio come il brilliant blue, le proteine assumono colore blu-nero, sensibilità molto alta, non quantitativo).
- b. **Metodiche specifiche:** colorano solo alcune proteine, sono 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), colorazione mediante anticorpi (dopo blotting su membrana di nitrocellulosa si aggiunge una soluzione con un anticorpo marcato che si lega solo alla proteina presente in una banda. Il complesso antigene-anticorpo viene rivelato aggiungendo un substrato che trasformato in prodotto è misurabile)

Tipologie di elettroforesi per la separazione di proteine

- 1) **Separazione in base alla carica netta:** separazione in base alla velocità di migrazione della carica elettrica netta, è la più utilizzata in biochimica clinica per l'analisi e la quantificazione delle diverse frazioni delle proteine nel siero. all'anodo, al catodo e il supporto solido con una soluzione tampone a $\text{pH} > 8.6$. Le proteine del siero hanno pH minore a questo quindi a tali condizioni hanno tutte carica netta negativa e migrano all'anodo (+) (albumina $\text{pI} = 4.7$; alfa e beta globuline $\text{pI} = 5.0-5.5$; gamma globuline $\text{pI} = 6.0-7.3$). Si utilizza un supporto solido non selettivo come

acetato di cellulosa con poliacrilamide a bassa porosità. La separazione avviene in quanto le varie frazioni proteiche del siero avendo pI diversi a pH alcalino assumono cariche negative diverse. In un supporto solido che non pone resistenze migrano verso l'anodo con velocità diverse che dipendono solo dalla carica netta. La carica di una proteina abbiamo detto dal pH e dal punto isoelettrico:

Si seminano 1-2 microlitri di siero al catodo e si applicano 100-300V, dopo 15-20min si interrompe la corsa elettroforetica togliendo la corrente, dopo fissazione e colorazione con rosso Ponceau si evidenziano 4-6 bande

Per passare dalla lettura strumentale alla concentrazione si sfrutta proprio la rappresentazione grafica delle bande proteiche detta **elettroferogramma**. Il gel colorato è scansionato e si misura l'intensità di onde elettromagnetiche assorbite (ABS) da ogni banda proteica, si costruisce un grafico con sull'asse Y i valori di ABS e sull'asse X la distanza percorsa dalle proteine durante l'elettroforesi, ABS è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteine:

La quantità delle proteine nelle bande corrispondenti alle varie frazioni proteiche è prima calcolata in percentuale (si misura l'area di ogni picco e la si esprime in percentuale rispetto all'area totale sotto la curva dell'elettroferogramma), la concentrazione in g/dL di ogni frazione si ottiene moltiplicando la concentrazione delle proteine totali misurata nel siero per le % delle frazioni calcolate dall'elettroferogramma.

I metodi per quantificare le proteine totali sono principalmente tre e sono il **metodo del biuretto** (proteine formano un colore porpora con ioni di rame in soluzione alcalina. Il composto biuretto reagisce nella stessa maniera. L'intensità del viola è misurata a 540nm), **Metodo di Bradford** (si basa sull'azione del Coomassie blue G-250 che si lega specificatamente a residui di arg, trp, tyr... il CBBG si lega a questi residui in una forma anionica, con assorbanza massima a 595nm. Il colorante nella soluzione madre si trova in forma cationica che ha un massimo di assorbanza a 470nm.), **Metodo di Lowry** (in soluzione alcalina lo ione Cu^{2+} reagisce con il legame peptidico e si riduce a Cu^{1+} e forma un complesso blu. Nella seconda reazione il Cu^{1+} riduce il reagente di folin-ciocalteu che a pH 10-10.5 ha una massima assorbanza tra 500-750nm. Il reattivo di Folin si lega anche ai residui di tiroxina e triptofano.

2) **SDS-elettroforesi**: utilizzata per le analisi delle sieroproteine se si desidera maggiore risoluzione e delle proteine delle urine, all'anodo, al catodo e nel gel un tampone contenente sodio dodecil solfato (SDS) si lega alle proteine con interazioni idrofobiche. Le proteine assumono tutte la stessa carica negativa indipendentemente da loro pI e dal pH tampone. Il supporto solido selettivo è poliacrilamide, la separazione avviene in quanto proteine con dimensione diverse a parità di carica elettrica migrano con velocità diverse:

L'SDS elettroforesi può essere condotta in condizioni native o denaturanti. Parliamo quindi di Proteinuria, in relazione al peso molecolare delle proteine presenti nel campione d'analisi, la proteinuria potrà essere classificata in: proteinuria glomerulare (proteinuria ad alto peso molecolare, secondaria ad una disfunzione della barriera di filtrazione glomerulare, selettiva se caratterizza una lesione glomerulare precoce e reversibile con perdita di albumina e transferrina; non selettiva se indicativa di una lesione avanzata della membrana basale con

perdita della funzione di setaccio glomerulare), proteinuria glomerulare (proteinuria a basso peso molecolare, espressione di un mancato assorbimento proteico da parte del tb prossimale), proteinuria mista (coespressione di entrambe). Dopo l'elettroforesi dobbiamo quantificare le frazioni proteiche, la colorazione con colorante aspecifico quantitativo avviene con brilliant blue, il gel colorato è scansionato e si misura l'ABS da ogni banda proteica. Si costruisce l'elettroferogramma come prima, la quantità di proteine nelle bande corrispondente alle varie frazioni proteiche è prima calcolata in percentuale (si misura l'area di ogni picco e la si esprime in percentuale rispetto all'area totale sotto la curva dell'elettroferogramma. La concentrazione di ogni frazione si ottiene moltiplicando la concentrazione delle proteine totali misurata nel siero per le % delle frazioni calcolate dall'elettroferogramma.

3) **Focalizzazione isoelettrica (IEF)**: usata per le analisi di isoenzimi e isormoni e nell'ispezione degli alimenti per l'identificazione di specie ittiche in prodotti trasformati. Il supporto solido selettivo è il gradiente di pH dal catodo all'anodo, il tampone è all'anodo un acido forte mentre al catodo una base forte come NaOH. Le proteine si separano in base al pI: proteine con pI diverso raggiungono e si fermano in sottili bande stazionarie in punti diversi del gel (si focalizzano), una proteina migra fino a raggiungere il punto in cui il pH corrisponde al suo pI. Il gradiente di pH stabile tra anodo e catodo è ottenuto mettendo molecole anfotere nel gel prima della polimerizzazione (anfolti= acidi alifatici poliamino-policarbossilici di sintesi), anfolti con punto isoelettrico diversi sottoposti al campo elettrico migrano e si fermano quando assumono carica netta nulla. Nel punto in cui si arrestano si crea una zona a pH stabile e definito. Miscele di anfolti possono coprire range di pI ampio e stretto, usando un gradiente stretto di pH è possibile separare anche proteine che differiscono di sole 0.01 unità. Possiamo così dosare gli isoenzimi, sono proteine che catalizzano la stessa reazione ma espresse in tessuti diversi e con proprietà molecolari diverse, isoenzimi differiscono per Km, optimum di pH e modulatori. Isoenzimi di maggior interesse biochimico clinico in veterinaria sono lattato deidrogenasi e creatin chinasi. Per quanto riguarda il dosaggio degli isoenzimi si sfruttano sia metodi di inibizione selettiva (si misura l'attività enzimatica nel campione sia in presenza sia in assenza di uno specifico inibitore di isoenzima. Una differenza di attività tra prima e dopo l'aggiunta indica la presenza/assenza dello specifico isoenzima), che metodi elettroforetici (gli isoenzimi LDH e CK hanno pI differenti, dopo separazione si effettua una colorazione specifica, aggiungendo substrati ridotti precipitano in corrispondenza delle bande specifiche

METODI DI SEPARAZIONE

Il principale è la **cromatografia**, la cromatografia si inserisce nei metodi di separazione, un vantaggio della cromatografia rispetto all'elettroforesi è che possiamo ottenere le sostanze separate tramite cromatografia, ad esempio posso estrarre solo la molecola che mi interessa separando tutto il resto con la cromatografia.

Si distinguono due grossi capitoli: la **gas cromatografia** e la **cromatografia liquida**, quello che li differenzia è che nella cromatografia liquida il campione è in un liquido mentre la gas cromatografia ha applicazione nell'analisi degli alimenti, è il metodo per le sostanze volatili che diventano quindi gas. Nella cromatografia a gas c'è una bombola di gas mentre nella liquida delle bocce di liquidi, in entrambi i casi ci sono tubi che portano gas o il liquido nella colonna che è dove avviene la separazione. L'altra parte che hanno in comune è la parte di rilevazione, posso vedere e risalire a cosa c'era o addirittura raccogliere perché escono in momenti diverse. La rilevazione sfrutta il fatto che le

sostanze possono assorbire onde nel visibile, sostanze fluorescenti ecc.. Il tutto collegato ad un pc che mi da il risultato, il famoso **cromatogramma**.

La **fase stazionaria** è attaccata ad una **matrice** (supporto inerte e isolubile) che è dentro un tubo, la **colonna**. La **fase mobile** passa nella colonna e interagisce con la fase stazionaria. Prima della colonna c'è un sistema che permette di far andare nella colonna il liquido attraverso un sistema di pressione con sistemi di pompaggio, si distinguono quindi due tipi di cromatografia liquida:

- **Sistemi ad alta pressione**
- **Sistemi a bassa pressione**

Gli HPLC sono sistemi a cromatografia ad alta pressione (>50bar), in cui si utilizzano sistemi particolari di pompaggio di questi liquidi che arrivano a pressioni molto elevate e questo mi permette di separare in meno tempo ma soprattutto sostanze diverse tra loro.

Le colonne sono degli involucri all'interno dei quali metto la matrice e quindi la fase stazionaria, possono essere molto sottili e piccole, di acciaio o di vetro, più grandi, ci sono diversità perchè anche la geometria delle colonne condiziona il risultato. Nelle colonne ci sono delle microsfele di pochi micron di materiali diversi, polimeri sintetici, ma molto spesso anche le palline di silice.

I rilevatori quindi la parte che rileva cosa esce dalla colonna possono misurare a diverse lunghezze d'onda (voglio vedere le molecole che assorbono a tot lunghezza d'onda), fluorimetri, rilevatori elettrochimici, spettrometro di massa, dipende da che molecola devo rilevare.

Arriviamo quindi al risultato che è il **cromatogramma** che è un grafico in cui abbiamo su y la risposta come al solito, sull'asse x abbiamo il tempo. Da non confondere con l'elettroferogramma che era dell'elettroforesi, qui si misura quanto tempo ci ha messo ad uscire. Tutte le volte che passa una sostanza che assorbe a quella lunghezza d'onda si ha un picco di assorbanza, in un cromatogramma se esce qualcosa che non assorbe a quella lambda io non lo vedo quindi posso scegliere cosa vedere e cosa no. In tempi diversi escono sostanze diverse ma hanno tutte in comune il fatto di assorbire a quella lunghezza d'onda.

Il **tempo di ritenzione** è la cosa fondamentale per dire se c'è o no quella sostanza, il tempo di ritenzione è il tempo in cui l'analita viene trattenuto all'interno della colonna e dipende dalla natura chimica dell'analita e dal contenuto della colonna. Tanto più sono stretti i picchi tanto più riesco a distinguere una sostanza dall'altra. Posso dire se c'è una sostanza andando a vedere se a quel determinato momento specifico esce una sostanza.

Se ho due cromatogrammi di due campioni uno positivo e uno negativo e li confronto e vedo che i uno dei due c'è ad esempio un picco a 22 minuti che non c'è nell'altro, posso quindi sapere che sostanza c'è in un campione e non nell'altro perchè a quei 22 minuti uscirà una sostanza specifica.

Altro aspetto oltre al tempo è la **quantità**, oltre a sapere se c'è voglio sapere quanta ce ne è, per cui faccio sempre confronto con uno standard. Bisogna ricordarsi che non è tanto l'altezza del picco ma l'area perchè se esce in modo compattato da un picco molto alto altrimenti può uscire poco ma in un tempo lungo, dare un picco largo e basso e quindi se ne trova di più nel campione, è quindi l'area che è direttamente proporzionale con l'analita. Confronto l'area del picco con l'area dello standard, come sempre se ho un solo standard faccio la proporzione altrimenti faccio la retta di regressione ma metto sull'asse Y l'area del picco.

NB: DA NON CONFONDERE CON ELETTROFORESI DOVE NON CONFRONTO CON UNO STANDARD, LI SONO AD ESEMPIO SOLO PROTEINE E QUINDI FACCIO L'area TOTALE, QUI SONO SOSTANZE DIVERSE AD OGNI PICCO.

Per le **dimensioni** faccio la cromatografia ad esclusione (quello che era sds-elettroforesi), polarità faccio cromatografia a fase inversa (per ag, steroidi, farmaci idrofobici), carica faccio cromatografia a scambio ionico, attività biologica faccio cromatografia di affinità.

Gel cromatografia (*"Le sferette sono fatte che sono porose" cit.*)

È la **cromatografia ad esclusione molecolare**, separa in funzione delle dimensioni. C'è sempre una fase mobile, una colonna e un detector. Nella cromatografia ad esclusione molecolare la fase mobile ha il solo compito di trascinare le sostanze, normalmente si utilizza un tampone che mantiene in soluzione l'analita. Nella colonna e quindi nella fase stazionaria ci sono dei composti organici polimerici con pori, la separazione avviene in funzione della dimensione e della forma.

Le sferette sono porose, succede che le molecole piccole entrano, procedendo vengono trattenute dalla fase stazionaria. Le molecole grosse vengono escluse quindi essendo escluse fanno meno strada ed escono prima, avremo quindi prima il picco delle molecole più grosse e poi il picco di quelle più piccole che entrano e fanno molta più strada. Molto spesso esistono diversi tipi di fase stazionaria che permettono di separare molecole all'interno di range di PM.

Cromatografia a fase inversa

Nella fase mobile in questo caso abbiamo una soluzione con polarità variabile, qui c'è una fase in cui attacco le sostanze e una in cui la stacco, cambia la polarità quindi ci sono sostanze a polarità variabile. La separazione avviene in funzione della idrofobicità e polarità, un classico esempio è l'acido grasso che preferisce stare nell'alcol che nell'acqua. La fase stazionaria vede delle palline di sostanze molto variabili, si chiama fase inversa perché le prime fasi stazionarie sviluppate per questa metodologia erano palline di silice molto idrofiliche ed era una cromatografia fatta per idrofilicità, era la fase diretta, è stata resa fase inversa cioè vi è stata attaccata una grossa catena idrocarburica che li rende idrofobici e quindi succede l'opposto, tanto più e lunga la catena di ag tanto più è idrofobico.

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.

In un cromatogramma mentre nella cromatografia a gel posso dire che la prima che esce è la più grossa qui posso dire che la prima che esce è la meno idrofobica.

Cromatografia a scambio ionico

Molto simile alla fase inversa ma la fase stazionaria non ha attaccate sostanze che attraggono sostanze idrofiliche o idrofobiche, ho particelle cariche positivamente o negativamente. Se sono cariche positivamente la colonna prende il nome di scambiatore anionico, se sarà carico negativamente attrarrà cariche positive e quindi si chiamerà scambiatore cationico.

La separazione avviene quindi in base alla carica netta dell'analita, si tiene conto della pKa del composto o pI della proteina. Quindi separo in base alla carica poi per staccare sfrutto il pH, cambio il pH per cui cambia la carica della molecola fino a che si stacca. Posso sfruttare altrimenti un aumento di concentrazione ionica ad esempio mediante NaCl.

Cromatografia per affinità

La separazione avviene in funzione di specifiche interazioni biologiche, affinità di tipo biologico, ligando ormone recettore, sono tutte interazioni biologiche, questa ha applicazioni non tanto analitiche ma di tipo preparativo. La fase stazionaria vede il ligando immobilizzato, se metto l'anticorpo si lega all'antigene, l'enzima al substrato ecc. la fase mobile il tampone ideale per favorire l'interazione.

Per il distacco sfavorisco l'interazione.

METODI ELETTROCHIMICI

Sono legati al potenziale di membrana, dal punto di vista della classificazione i metodi elettrochimici sono inseriti nei metodi di analisi diretta, la concentrazione degli ioni nel campione condiziona direttamente il risultato dell'analisi. Sono sempre metodi molto rapidi perchè non ci sono reazioni chimiche da misurare. Le applicazioni di questi metodi sono molto diffuse, inanzitutto l'**emogasanalisi** ogni volta che si vuole misurare la pressione parziale di ossigeno o anidride carbonica. Tutte le misure di concentrazione degli elettroliti (pH, Na⁺, Ca⁺⁺..) e infine si utilizzano anche come conseguenza di un metodo indiretto cioè c'è una reazione biochimica quindi metodi enzimatici e poi la conversione viene convertita in un segnale elettrico, si utilizzano per il glucosio e il lattato.

Distinguiamo dal punto di vista teorico la potenziometria e la voltmetria o amperometria. La potenziometria utilizza la **cella galvanica** e serve per il pH, con elettrodi ionoselettivi per sodio, potassio, calcio, cloro e ione ammonio, e infine elettrodi gas sensibili per anidride carbonica.

La voltmetria o amperometria sfruttano la **cella elettrolitica** e permettono l'utilizzo con elettrodo di clark per la pressione parziale di ossigeno ad esempio.

Sia nel caso di cellula galvanica che elettrolitica si hanno reazioni di ossidoriduzione che avvengono nelle celle elettrochimiche (due elettrodi metallici immersi in soluzioni contenenti composti ossidabili/riducibili, connessi con un cavo. Chiude il circuito un ponte salino). Nella cella galvanica le ossidoriduzioni avvengono spontaneamente agli elettrodi, l'energia chimica viene convertita in energia elettrica. Nella cella elettrolitica c'è il contrario, le ossidoriduzioni avvengono per applicazione di un potenziale esterno maggiore del potenziale di ossidoriduzione delle soluzioni della cella. L'energia elettrica viene convertita in energia chimica.

Sono strumenti molto spesso integrati.

La misura potenziometrica prevede l'utilizzo di elettrodi ionosensibili.

Questi metodi si basano sul potenziale di membrana, ai due lati di una membrana semipermeabile si crea una differenza di potenziale, il potenziale di equilibrio EQ di ogni specifico ione può essere calcolato con l'**equazione di NERNST**:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

L'**equilibrio elettrochimico** è un bilancio tra forze opposte, se prendiamo una membrana semipermeabile, i due comparti della membrana contengono la stessa concentrazione di KCl e sono separati da una membrana permeabile solo al potassio, non c'è gradiente di concentrazione e non c'è flusso di ioni K⁺ nei comparti. In una situazione B aumentiamo di 10 volte la concentrazione di KCl nel comparto 1, il potassio visto che la membrana è semipermeabile passa e nel momento in cui una molecola di potassio passa nel secondo comparto il cloro non riesce a passare quindi una molecola di potassio compensa la concentrazione ma lascia di la una carica negativa quindi aumenta una differenza di potenziale. L'equazione di nernst dice quale è il voltaggio a cui si interrompe il flusso di ioni potassio, variando la c nei due comparti cambio il potenziale di membrana perchè le cariche che bloccano il flusso sono diverse alle diverse concentrazioni.

L'equazione di nernst a temperatura ambiente e sostituendo il logaritmo naturale con il logaritmo in base 10 diventa:

$$V = \frac{58}{Z} * \text{Log} \frac{C_2}{C_1}$$

per una membrana permeabile al potassio e con concentrazione di potassio 10 volte maggiore nel comparto 1 che nel comparto 2 il potenziale tra le due esce -58mV.

Per una membrana semipermeabile al sodio e con concentrazione di sodio 10 volte maggiore nel comparto 2 il potenziale viene +58mV. Per il cloro nel comparto 2 10 volte maggiore viene ancora -58mV.

Ai due lati della membrana ci sono diverse distribuzioni dei vari ioni, se la membrana non fosse permeabile la differenza di potenziale sarebbe zero, nella membrana a riposo ci sono dei canali ionici che fanno passare gli ioni, a riposo passano gli ioni potassio, la membrana plasmatica a riposo è semipermeabile al potassio, se applichiamo l'equazione di Nernst sapendo le differenze di sodio e cloro dai due lati della membrana, per convenzione 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. Nel potenziale d'azione la membrana è semipermeabile al sodio, si chiudono i canali. Attraverso le membrane delle cellule si generano potenziali perchè ci sono differenze di concentrazione di ioni e perchè le membrane sono selettivamente permeabili a seconda del momento.

Vediamo come funzionano gli strumenti elettrochimici:

- 1) **Elettrodi ionosensibili:** sono elettrodi 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 ddp 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. Nel caso del pH la parte attiva è un bulbo di vetro molto sottile e permeabile agli ioni H^+ , all'interno del bulbo 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. L'elettrodo a vetro e quelli di riferimento sono progettati per dare un potenziale nullo a $pH=7$, la taratura richiede una soluzione a $pH=7$, una a $pH=4$ e una a $pH=9$. Il potenziale generato dipende dalla temperatura, effetto che può essere compensato.
- 2) **Elettrodi ionoselettivi:** 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 sodio, potassio, cloro e calcio nel siero e nel sangue.
- 3) **Elettrodi gas-sensibili:** La CO_2 contenuta nel sangue diffonde attraverso una membrana di teflon e viene a contatto con una soluzione di $NaHCO_3/NaCl$ di cui modifica il pH. In base alla variazione di pH si risale al valore della pCO_2
- 4) **Elettrodo ad ossigeno di Clark:** catodo di platino, anodo di argento immersi in soluzione di KCl, mentre con la galvanica avviene spontaneamente qui sono io che immetto la corrente elettrica. Gli elettrodi sono separati dal campione di sangue da una membrana di polipropilene o teflon molto sottile e permeabile all'ossigeno. Agli elettrodi si applica una tensione di polarizzazione di 650mV, il catodo di platino diventa negativo $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$ (riduzione); l'anodo diventa positivo $4Ag + 4Cl^- \rightarrow 4AgCl + 4e^-$ (ossidazione). Per ogni molecola di ossigeno che diffonde sono necessari 4 elettroni, a tensione costante la corrente è quindi proporzionale alla pressione parziale di ossigeno del campione. Quando tra due elettrodi viene applicata una ddp misurata in V si genera una corrente elettrica, la quantità di carica che scorre nell'unità di tempo è l'intensità di corrente e si misura in A. Si introducono qui i cosiddetti biosensori che convertono un segnale biochimico in un segnale elettrico. Esistono biosensori sensibili al glucosio,

su una membrana si immobilizza l'enzima glucosio ossidasi, posso misurare il consumo di ossigeno misurando la riduzione a un catodo di platino polarizzato a 650mV, con elettrodo di clark. La produzione di H₂O₂ misurando l'ossidazione ad un anodo di platino a 700mV e la produzione di gluconato misurando l'abbassamento del pH.

FOTOMETRIA ATOMICA

Esistono due sistemi che sono **spettroscopia in emissione atomica** e **spettroscopia di assorbimento atomico**. Gli analiti quantificati in spettroscopia di assorbimento atomico hanno applicazioni in campo clinico quindi cationi di interesse clinico (calcio, magnesio, sodio, potassio, litio), oligoelementi di interesse biologico (ferro, cobalto, zinco, cromo, manganese) e oligoelementi di interesse tossicologico (piombo, emoglobina, cadmio). Una delle righe di assorbimento dell'atomo deve essere tra λ 200 e 1000 nm, metalli alcalini di interesse clinico sono di solito misurati con fotometria di emissione in quanto è più sensibile. È valida la legge di Lambert-Beer, le metodiche di spettroscopia atomica hanno reso meno diffusi molti dei metodi di analisi degli ioni più comuni.

Per quanto riguarda l'assorbimento atomico abbiamo una lampada e non un selettore di lunghezza d'onda quindi per ogni analita devo usare una lampada diversa, c'è un bruciatore che fa sì che la molecola sia a livello atomico, abbiamo l'onda elettromagnetica che colpisce gli atomi quindi mandiamo allo stato gassoso il campione. Si ferma solo le onde elettromagnetiche che vengono fermate dai nostri atomi, mentre le molecole hanno spettro di assorbimento continuo, questo perché le molecole sono costituite da molti atomi. Negli atomi si assorbono solo specifiche lunghezze d'onda, lo spettro è a righe e non è continuo, in funzione della distribuzione delle cariche nell'atomo. Per quanto riguarda il bruciatore servono 1500-2000°C, la sorgente luminosa è fondamentale perché se sbaglia lunghezza d'onda non vedo nulla. La sorgente di radiazioni è una lampada ad elettrodo cavo contenente lo stesso elemento che cerchiamo nel campione, segue il **principio di Kirchhoff** secondo cui un atomo assorbe le stesse radiazioni elettromagnetiche che emette quando viene eccitato. Ci sono sia lampade a singolo elemento che permettono analisi di singoli elementi per ogni lampada oppure langolo a multielemento in cui si possono analizzare più elementi in contemporanea. Per quanto riguarda la **spettroscopia di emissione atomica** si utilizza per elementi che hanno basso livello di eccitazione per cui è sufficiente l'energia di una fiamma (sodio e potassio).

Nel fotometro a fiamma per spettroscopia ad emissione atomica vado a vedere l'intensità delle onde elettromagnetiche emesse che è proporzionale alla concentrazione della sostanza, per calcolarla si usa uno standard interno a causa delle interferenze che ci sono misurando sodio e potassio. Si utilizzano campioni diluiti in soluzione a concentrazione nota di sali di litio in quanto il litio ha le medesime interferenze, così si corregge la misura. È un metodo molto rapido ed efficiente. Se voglio misurare il sodio misuro ad esempio le onde elettromagnetiche a 819nm.

FATTORI CHE INFLUENZANO IL DATO DI LABORATORIO

Il risultato dell'analisi dipende dal campione ma anche da una serie di fattori, la variabilità **pre-analitica** è quello che succede al campione prima dell'analisi. La variabilità **analitica** è quello che influenza l'analisi in sé. Rimane una stima, ci sono comunque degli errori ma si cerca di avere un valore più accurato possibile.

Variabilità preanalitica

La correttezza del risultato analitico dipende dal mantenimento delle caratteristiche chimiche, biologiche e morfologiche del campione. Una variabilità pre-analitica può dipendere dal **tipo di campione** che stiamo analizzando quindi il plasma è la parte liquida del sangue, il siero è la parte liquida del sangue senza i fattori di coagulazione. Per ottenere il siero si lascia coagulare il sangue in una provetta di vetro senza anticoagulanti (tappo rosso) per minimo 30 minuti a temperatura ambiente, si centrifuga 5 minuti a 3000rpm. Per ottenere il plasma si centrifuga ma prima si aggiungono anticoagulanti. Nell'utilizzo del plasma ci sono poi fonti ulteriori di variazioni perchè si possono utilizzare diversi tipi di anticoagulante quindi:

- **Eparina:** va benissimo tranne che per l'analisi emocromocitometrico perchè fa compattare le piastrine, è un polisaccaride, anticoagulante naturale, costituito da unità di monosaccaridi legati da legami differenti tra loro. Viene estratta dal sangue molto spesso dai maiali in quanto è prodotta dalle cellule, il meccanismo di azione è molto preciso perchè va a bloccare uno dei fattori della coagulazione. L'eparina non è presente autonomamente ma ha molte cariche nella sua molecola, di conseguenza per il suo mantenimento nella provetta vengono forniti dei sali di eparina, non è quindi pura ma ci sono diversi sali insieme quindi troviamo sodio-eparina, potassio-eparina... sono diverse perchè se devo fare natriemia e utilizzo la provetta con sodio avrò un valore di sodio nel sangue sballato. Hanno un **tappo verde**.
- **EDTA: tappo violetto**, è un acido che chela il calcio del plasma quindi lo sequestra in se, inibisce quindi l'attività degli enzimi della coagulazione perchè non trovano calcio. Il problema compare solo se occorre determinare la calcemia. Commercializzato come sale di sodio o di potassio e quindi anche qui possiamo alterare la misura di sodio e potassio nel sangue. È l'anticoagulante di scelta per l'esame emocromocitometrico.
- **Citrato o acido citrico:** funziona come l'EDTA, ha tre gruppi carbossilici che chelano il calcio e bloccano la coagulazione. Utilizzato nel sangue per le trasfusioni perchè non è tossico. Anche qui interviene il problema dell'alterazione della concentrazione di sodio e potassio nel sangue.

Anche nella **misurazione del glucosio** intervengono fattori che variano la misura dal momento del prelievo all'analisi, la glicolisi nel campione continua, per rallentare questo processo possiamo aggiungere i **glicostatici** o più semplicemente raffreddare il campione, i glicostatici inibiscono la glicolisi nelle cellule del sangue, consumano il 3-5% del glucosio nel sangue. I glicostatici bloccano gli enzimi della glicolisi ma anche la pompa sodio potassio quindi altero anche l'equilibrio della membrana cellulare e quindi aumentano i parametri del potassio.

Per quanto riguarda l'**emolisi** la lisi degli eritrociti porta al passaggio nel plasma dell'emoglobina e di tutte le sostanze all'interno degli eritrociti, le cause possono essere osmotiche, meccaniche o fisiche, l'emoglobina può alterare le misurazioni colorimetriche a 405nm e 550-575nm. Come prima si verifica innalzamento dei valori di potassiemia. Certi enzimi come la LDH aumentano di molto in un campione dove è avvenuta emolisi.

Variabilità analitica

L'esattezza della stima della concentrazione di un analita in un campione dipende da **5 parametri**: precisione, Accuratezza, limite di determinabilità, sensibilità e specificità. Sono parametri caratteristici di ogni metodo, ogni metodo avrà questi parametri diversi. Precisione e accuratezza dipendono sia dal metodo che dall'esecuzione, limite di determinabilità, sensibilità e specificità dipendono solo dal metodo.

- **Precisione:** sovrapposibilità dei valori ottenuto con misurazioni distinte e ripetute sullo stesso campione. Numericamente è espressa come valore di deviazione

standard che misura la dispersione delle misurazioni. Viene espresso come **coefficiente di variabilità (CV)**, $CV = DS / \text{media} * 100$. Il coefficiente permette il confronto con campioni con concentrazioni diverse.

- **Accuratezza:** concordanza tra il valore vero e i valori ottenuti in una serie di misure sullo stesso campione. Il termine è **bias** ed è = concordanza/valore atteso * 100
- **Ripetibilità:** misura della deviazione dal valore medio in un'unica serie analitica (**intra-assay**)
- **Riproducibilità:** misura della deviazione dal valore medio tra serie ripetute nel tempo da diversi operatori, con diverse soluzioni standard (**inter-assay**).
- **Imprecisione TOT:** $RAD(\text{ripetibilità}(CV_{\text{entroserie}})^2 + \text{riproducibilità}(CV_{\text{traeserie}})^2)$
- **Concordanza:** tra il valore vero di un parametro e i valori ottenuti in una serie di misure sullo stesso campione con lo stesso metodo. Media misurata-valore atteso. Maggiore è il valore e maggiore è l'inaccuratezza.
- **Limite di rilevabilità:** è la minima quantità di analita misurabile dal metodo, numericamente si esprime con il valore di concentrazione corrispondente alla media dei valori del bianco + 2DS. Legato a questo c'è il **limite di linearità** che è leggermente superiore, è il range di concentrazioni all'interno del quale trovo una linearità dei dati ed è il range di misurazioni che considero per i calcoli.
- **Sensibilità:** è la variazione in risposta per unità di reagente, indica la risposta del test a cambi della dose della sostanza misurata. Numericamente si esprime con il valore del coefficiente angolare della retta, la sensibilità di un metodo può diminuire agli estremi della curva dose-risposta.
- **Specificità:** rappresenta l'attitudine del metodo a misurare solo la sostanza studiata, ogni metodo può avere problemi in questo senso perchè possono esserci interferenze. È strettamente correlata all'accuratezza, se non è specifico non è accurato. La specificità non può essere quantificata con un valore numerico e viene espressa in valore assoluto. Solo per dosaggi immunochimici si quantifica come cross-reattività mentre solo per le proteine come specie-specificità e sono valori percentuali. La **cross-reattività** riguarda i dosaggi immunochimici di tutte le molecole, la **specificità** e la cross-reattività influiscono soprattutto sull'accuratezza, se un metodo non distingue tra la molecola di interesse e altre molecole presenti nel campione biologico la misura dell'analita di interesse si discosta da quella vera. La cross-reattività è un parametro che quantifica la specificità dei dosaggi immunochimici di tutte le molecole, sia proteiche che non. La specie-specificità è un parametro solo dei dosaggi immunochimici di proteine, nei dosaggi di proteine si ha quindi sia cross-reattività che specie-specificità. Il legame antigene anticorpo si realizza per la formazione di legami non covalenti tra le catene laterali degli aa nelle regioni ipervariabili dell'anticorpo e i gruppi chimici dell'antigene nell'epitopo. La specificità antigenica di una molecola risiede in aree ristrette che sono gli epitopi, la forza di legame tra anticorpo e antigene dipende dalla complementarità tra le catene laterali e da temperatura, pH e concentrazione ionica totale. La cross-reattività dipende dall'affinità di un anticorpo per molecole simili che hanno epitopi simili ed esprime in modo relativo la reattività di un anticorpo per una molecola rispetto alla reattività per un'altra molecola. L'attitudine si misura come percentuale di cross-reattività, minore è la cross-reattività di un anticorpo verso molecole simili, maggiore è la specificità del metodo che lo utilizza. Maggiore è e minore è la specificità del metodo. L'attitudine di un anticorpo di riconoscere la stessa proteina di specie diverse e si esprime in **percentuale di specie-specificità**.

Obiettivi per gli errori analitici

È necessario un bilanciamento fra l'optimum di performance di una metodica analitica e la facilità d'uso, di riferimento e dei costi dei reattivi, e gli obiettivi diagnostici. Il risultato analitico ha valore in quanto contribuisce a comprendere la probabilità che un individuo sia affetto da una determinata malattia. Esistono degli obiettivi per gli errori analitici calcolati in base alla **variabilità biologica**, maggiore è la variabilità biologica di un analita e maggiore è l'errore analitico. Gli intervalli di riferimento di variabilità biologica vengono calcolati prendendo una popolazione di riferimento, la variabilità biologica può essere espressa come coefficiente di variabilità biologica che è la DS rispetto alla media *100. L'intervallo tra due valori rientra il 95% dei valori del parametro misurato su una popolazione di riferimento è detto **intervallo di riferimento**. Esiste una variabilità biologica intra-individuale o inter-individuale. Posso calcolare un coefficiente di variabilità biologica totale (radice di CV^2 intra + CV^2 inter).

Per ogni analita misurabile esistono formule che mettono in relazione variabilità analitica e metodo, la variabilità di precisione e accuratezza deve ad esempio essere nel primo caso inferiore alla metà della variabilità intra, nel secondo inferiore ad un quarto della variabilità totale.

Esistono degli obiettivi che tengono conto di tutte e due e questo è l'errore analitico totale, è la differenza tra il valore ottenuto e il valor vero risulta essere un'inestricabile commistione di imprecisione e inaccuratezza, per questo si indica come **errore analitico totale**.

$ETa\ ottimale = \frac{1}{4} \text{ range valori di riferimento / (media valori di riferimento) } * 100$

Un altro parametro molto utile è la **differenza critica** che è quando si fa lo stesso dosaggio nello stesso animale due volte di seguito, è la massima differenza tra due valori misurati in tempi successivi in uno stesso animale spiegabile dalla variabilità analitica tra le serie e dalla variabilità biologica intra-individui. Se la differenza è superiore alla differenza critica i può considerare che sia dovuta ad una variazione delle condizioni del paziente. Con la differenza critica dico quanto è dovuto alla variabilità biologica e quanto a quella analitica.

La differenza critica dipende sia dalla variabilità biologica sia dal metodo, il sodio ha una variabilità biologica molto piccola, la variabilità analitica è scesa molto negli ultimi anni perchè il metodo è stato molto migliorato, questo ha avuto un enorme peso sulla differenza critica che è scesa molto. La variabilità biologica dei trigliceridi è molto alta, la variabilità analitica è diminuita ma avendo un valore molto alto di biologica anche la critica resta alta.

C'è però un altro problema riguardo la variabilità biologica, riferendosi agli ormoni questi hanno dei valori che variano ritmicamente. Per gestire questo occorre controllare il problema della pulsatilità ad esempio degli ormoni ipofisari, si effettuano prelievi ripetuti nel tempo o si effettuano test di stimolazione del rilascio dell'ormone.

Sicurezza e qualità nel laboratorio

Parliamo di controllo di qualità, abbiamo un controllo di qualità interno e un controllo di qualità esterno. Il **controllo di qualità interno** è l'operazione di controllo della qualità analitica che ogni laboratorio attua indipendentemente, si attua inserendo fra le analisi uno o più campioni con concentrazione nota di un certo analita definiti **campioni di controllo**. La concentrazione misurata nei campioni di controllo deve essere simile o uguale al valore atteso, in caso contrario le analisi si considerano imprecise. Si tratta di un controllo nel tempo cioè va fatto continuamente e riporterò su dei grafici i risultati della analisi. Un metodo è il **metodo di shewart-levey-jannings** in cui la concentrazione del controllo di ogni analisi è confrontata con la media +-DS delle concentrazioni misurate nello stesso campione di controllo durante un periodo preliminare durante il quale il

metodo era sotto controllo, si costruisce un grafico in cui le concentrazioni (y) misurate nei campioni di controllo nel tempo (X) sono confrontati con i limiti di allarme e di intervento rispetto alla media di controllo, ho delle linee orizzontali che rappresentano quei limiti e vedo se il grafico le supera.

Altra metodologia di controllo è il **metodo della media delle analisi duplicate**. Il valore atteso con cui si confronta il valore misurato nei campioni di controllo è la differenza tra i valori misurati in due campioni di controllo a concentrazione differente (uno alta e uno bassa) quindi controllo contemporaneamente entrambe le concentrazioni. Se la metodica mantiene le sue performance la differenza tra le due misurazioni è costante. Per quanto riguarda il **controllo di qualità esterno** invece abbiamo l'analisi da parte di diversi laboratori di campioni standard inviati dall'esterno a più laboratori contemporaneamente. I risultati delle analisi ottenuti dai singoli laboratori sugli stessi campioni sono inviati alla sede centrale. Esiste un **programma regionale del controllo di qualità di chimica clinica**.

Altro tipo di risultato è il **diagramma di youden** che si basa sull'elaborazione delle analisi ottenute dai laboratori su due campioni a diversa concentrazione dell'analita (alta e bassa), con un grafico così si valuta la capacità di un laboratorio di valutare le concentrazioni alte e basse.

INTERPRETAZIONE DELL'ANALISI DI LABORATORIO AI FINI DIAGNOSTICI

Test diagnostici e test di screening

Si considera **test diagnostico o di screening** una qualsiasi procedura che possa fornire informazioni su un particolare problema clinico. I test diagnostici e di screening sono esami di laboratorio (es. test della glicemia, colesterolo ecc.) o qualsiasi misurazione che sia effettuata con uno strumento di misura. Possono essere considerati test anche l'auscultazione cardiaca, la percussione polmonare, l'esame della mucosa congiuntivale, domande di un questionario, ecc... 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 si esegue su tutti gli individui di una determinata popolazione, indipendentemente dal loro stato di salute.

TEST PATOGNOMICO: Se positivo, indica con sicurezza la presenza del carattere ricercato. Ad esempio l'analita in condizioni non patologiche è assente. Un test patognomonico non genera mai risultati falsi-positivi (ma può fornire risultati falsi-negativi).

TEST NON PATOGNOMICO: 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.

Es: INDIVIDUAZIONE DI BOVINE INFETTE DA BRUCELLOSI

Test patognomonico: esame colturale del latte. □, Se risulta positivo la bovina è sicuramente infetta, il batterio non è né ubiquitario né commensale.

Se risulta negativo, non possiamo essere sicuri dell'assenza d'infezione: gli animali infetti eliminano le brucelle con il latte in maniera intermittente.

Test non patognomonico: test sierologico per la presenza di anticorpi specifici. , Falsi-positivi: animali infettati da microrganismi antigenicamente simili. Falsi negativi: bovini infettati recentemente che non hanno ancora prodotto anticorpi specifici.

Nella maggior parte dei casi e per i test quantitativi la distribuzione delle popolazioni "malata" e "sana" hanno parametri la cui concentrazione ha delle aree di sovrapposizione.

in tutti i casi in cui non ci sia una separazione netta tra soggetti malati e sani per il parametro considerato, l'attribuzione del risultato di un test alla popolazione dei malati o a quella dei sani può avvenire solo su base statistica. Per la valutazione statistica del risultato del test è necessario conoscere il **valore predittivo del test**: percentuale di animali che sono correttamente classificati in base al risultato del test.

VALORE PREDITTIVO DI UN TEST DIAGNOSTICO

Calcolo del valore predittivo dipende da:

- Sensibilità diagnostica del test
- Specificità diagnostica del test
- Prevalenza della malattia

La **sensibilità** e la **specificità** sono caratteri propri del test e legati al suo funzionamento. In genere essi sono dichiarati dal produttore e noti prima dell'applicazione del test sulla popolazione: sono probabilità pre-test. In termini di probabilità reali una risposta può venire dalla conoscenza del valore predittivo di un test diagnostico: percentuale di animali che sono correttamente classificati in base al risultato del test e si deve prendere in considerazione anche la prevalenza.

Sensibilità e specificità diagnostiche: misure che indicano la capacità di un test diagnostico di individuare, fra le unità di una popolazione, gli individui provvisti del carattere ricercato e quelli che ne sono privi. Il termine sensibilità e specificità in senso epidemiologico hanno un significato molto diverso da quello che hanno nella definizione della variabilità analitica (sensibilità e specificità analitiche)

1) **SENSIBILITÀ DIAGNOSTICA** Capacità di un test di identificare correttamente gli animali malati. Capacità di un test di identificare correttamente gli animali malati. La sensibilità risponde alla domanda: quanti degli animali malati sottoposti al test risultano positivi? Statisticamente è la probabilità che un animale malato risulti positivo al test, quindi la percentuale di animali malati che risultano positivi al test (attendibilità del risultato positivo).

Diminuendo la sensibilità di un test aumenta il numero di possibili falsi negativi: □, Sensibilità 100%: nessun animale malato risulta negativo. Se il test è negativo l'animale è □ sicuramente sano (FN = 0). □, Sensibilità 98%: su 100 animali malati 2 risultano negativi. Quindi se il test è negativo l'animale ha comunque il 2% di probabilità di essere malato (FN = 2/100)

2) **SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA** Capacità di un test di identificare correttamente gli animali sani. Capacità di un test di identificare correttamente gli animali sani. La specificità risponde alla domanda: quanti degli animali sani sottoposti al test sono risultati negativi? Statisticamente è la probabilità che un animale sano risulti negativo al test. Quindi la percentuale di animali sani che risultano negativi al test (attendibilità del risultato negativo).

Maggiore è la sensibilità minore è il rischio di falsi negativi: Specificità 100%: nessun animale sano risulta positivo. Quindi se il test è positivo l'animale è sicuramente malato (FP = 0, test patognomonico). Specificità 98%: su 100 animali sani 2 risultano positivi. Quindi se il test è positivo l'animale ha il 2% di probabilità di essere sano (FP = 2/100).

Valore critico, soglia di cut-off

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. La sensibilità e la specificità diagnostiche cambiano variando il cut-off. La scelta del valore critico è di estrema importanza.

Valore predittivo di un test diagnostico

La sensibilità e la specificità sono caratteri propri del test e legati al suo funzionamento. In genere essi sono dichiarati dal produttore e noti prima dell'applicazione del test sulla popolazione: sensibilità e la specificità sono probabilità pre-test. In termini di probabilità reali una risposta può venire dalla conoscenza del valore predittivo di un test diagnostico:

percentuale di animali che sono correttamente classificati in base al risultato del test e dipende anche dalla prevalenza. **PREVALENZA** = probabilità a priori della presenza di una malattia nella popolazione studiata. Statisticamente è la frequenza della malattia in una popolazione di 100.000 animali

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.

Valore predittivo positivo (VPP) Percentuale di animali con risultati positivi da considerare malati: probabilità che un animale con test positivo sia malato. Dipende soprattutto dalla sensibilità diagnostica del test e dalla prevalenza della malattia.

Valore predittivo negativo (VPN) Percentuale di animali con risultati negativi da considerare sani: probabilità che un animale con test negativo sia sano. Dipende soprattutto dalla specificità diagnostica del test e dalla prevalenza della malattia.

VPP e VPN dipendono dalla sensibilità e specificità diagnostiche del test: aumentano con l'aumentare di questi due parametri. A parità di sensibilità e specificità, la prevalenza ha un ruolo determinante: 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.