

CHIMICA BIOANALITICA

Tecniche bioanalitiche:

Basate su
reazioni biochimiche



→ Coinvolgimento laboratori:

- Biochimico
- Chimico
- Clinico

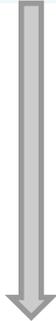


Applicazioni

- Analisi e monitoraggio ambientale di inquinanti con metodi e tecnologie sempre più efficienti.
Verifica delle caratteristiche inquinanti di contaminanti.
- Identificazione e caratterizzazione chimica e biologica di biomolecole (Proteine, lipidi, aa., intermedi metabolici, ormoni, acidi nucleici...).

Bioanalitica si basa sullo **studio** di:

Interazione
Luce-Materia



Spettroscopiche:

- Fluorimetria
- Scattering
- Citometria (Scattering + fluorimetria)
- Nefelometria
- Torbidimetria

Interazione
Enzima-Substrato



Da cui le tecniche

Enzimatiche:

- Dosaggi enzimatici (attività enzimatica)
- Dosaggi di substrato (conc. analiti)

Interazione Antigene-
Anticorpi



Immunochimiche:

- Quantitative
- Qualitative

Caratteristiche

- **specificità:** reazioni biochimiche
- **sensibilità:** ng, pg

Interazione Luce-Materia

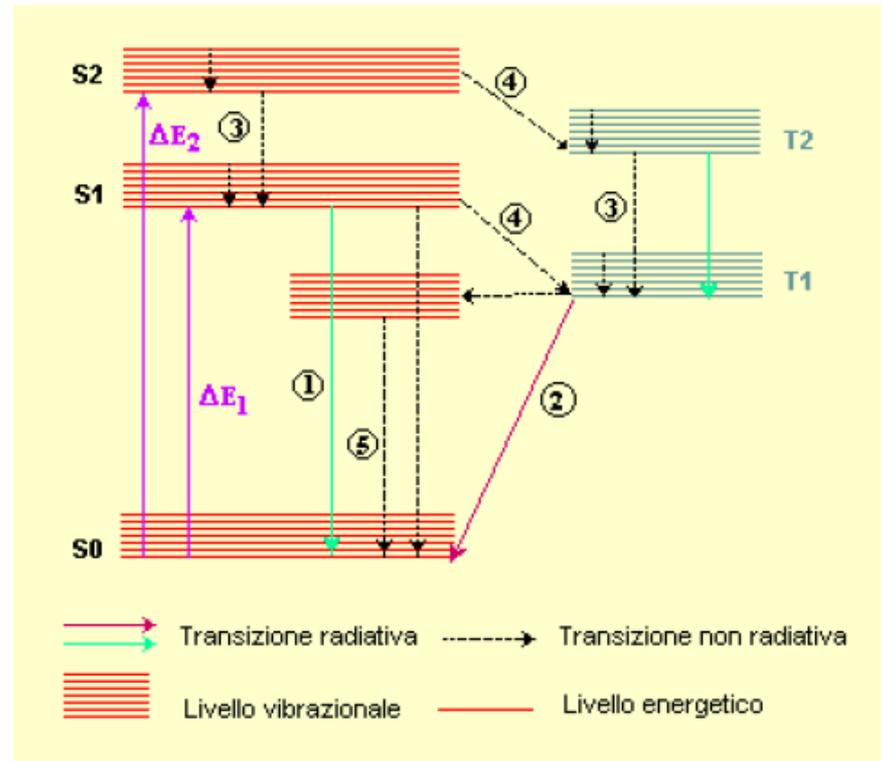
Caratteristiche:

Diffusione

Assorbimento

Emissione (o luminescenza)

- Chemiluminescenza
- Bioluminescenza



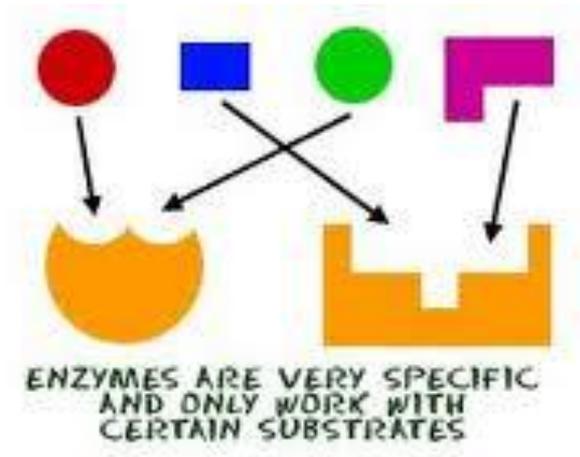
Usate in:

- Determinazione forma e dimensioni di cellule e particelle
- Rilevazione presenza e concentrazione analiti
- Monitoraggio andamento di reazione

Interazione Enzima-Substrato

Caratteristiche:

- Catalizzatori biologici (green)
- Selettivi
- Specifici
- Possibilità di immobilizzazione



Determinazione di:

- Attività catalitica enzimi
- Concentrazione sostanze per mezzo di enzimi
- Concentrazione sostanze mediante reattivi marcati

Interazione Antigene-Anticorpo

Caratteristiche:

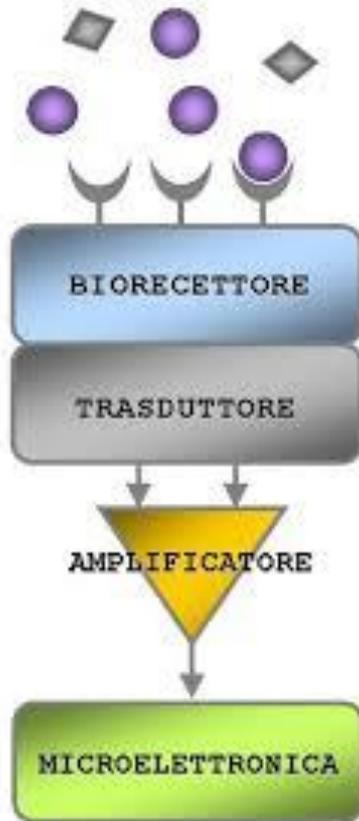
Immunoglobuline prodotte dalle plasma-cellule
Specificità del legame Ab-Ag
Altamente specifici (monoclonali)
Possibilità di immobilizzazione

Usati in:

- Immunodiffusione (radiale e semplice)
- Immunolettroforesi
- Dosaggi immunochimici
- Saggi immunologici
- ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay)



Biosensori



Caratteristiche:

Tre componenti:

- Elettronica
- Trasduttore
- Biologica (bioriconoscimento)

Alta sensibilità (ppb)

Alta selettività

Riconoscimento bioaffine e biometabolico

Sito recettore influenzato da pH, T e F.I.

Perdita attività nel tempo

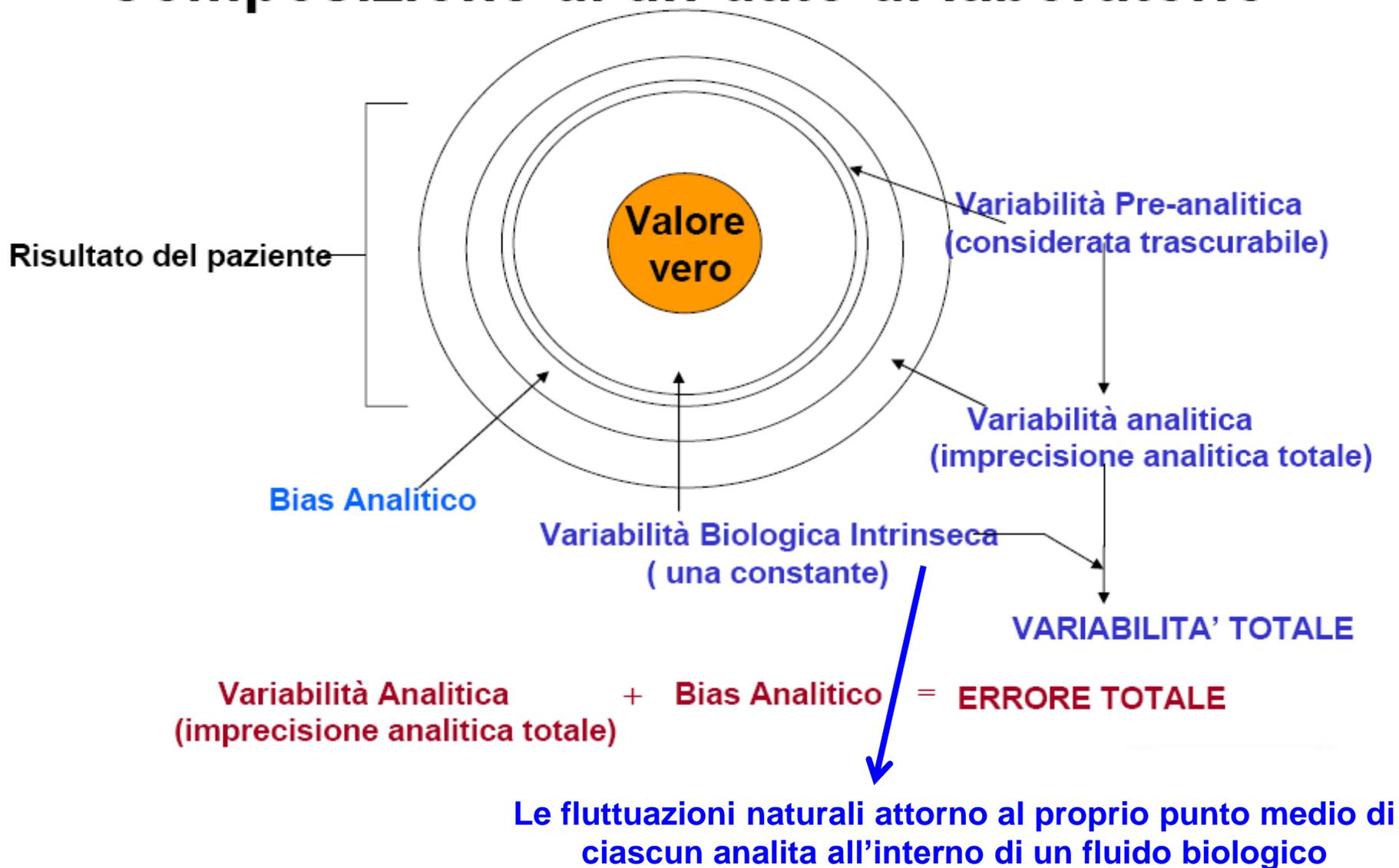
Tempo di risposta dipendente dalla $v_{\text{diffusione}}$

Biorecettore:

- Anticorpo
- DNA
- Recettori specifici
- Fibre ottiche

- Cellule e tessuti
- Enzima

Composizione di un dato di laboratorio



Popolazione di riferimento

- **Popolazione non necessariamente SANA, ma **definita** in maniera chiara**
 - **Sesso, età, altezza, alimentazione**
 - **Condizioni al prelievo (ora, farmaci, gravidanza, fasi del ciclo, esercizio fisico)**
 - **Tipo di prelievo**
 - **Trasporto, stoccaggio**
 - **Metodo di analisi**

Analisi statistica per l'intervallo di riferimento

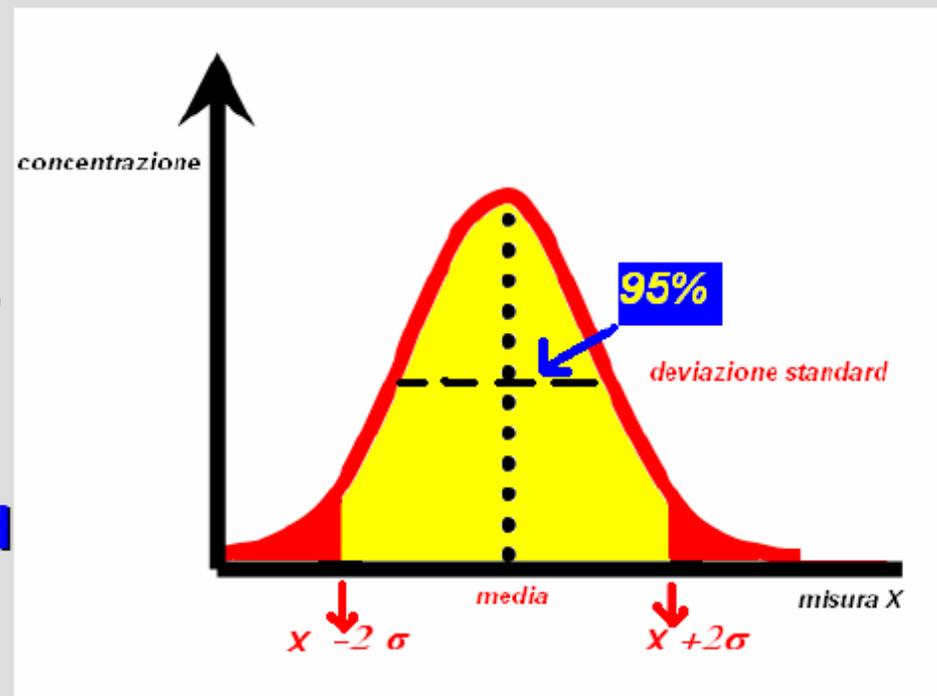
- **I dati ottenuti dal gruppo-campione sono sottoposti a**
 - **eliminazione dati aberranti**
 - **trattamento statistico per riconoscere il tipo di distribuzione (normale o non-normale)**
 - **determinazione dell'intervallo di riferimento con statistiche parametriche o non parametriche**

Analisi statistica

- Se il campione mostra una distribuzione **gaussiana** gli intervalli di riferimento si calcolano con **statistiche parametriche**.
- Se il campione mostra una distribuzione **NON gaussiana** gli intervalli di riferimento si calcolano con statistiche **NON parametriche**

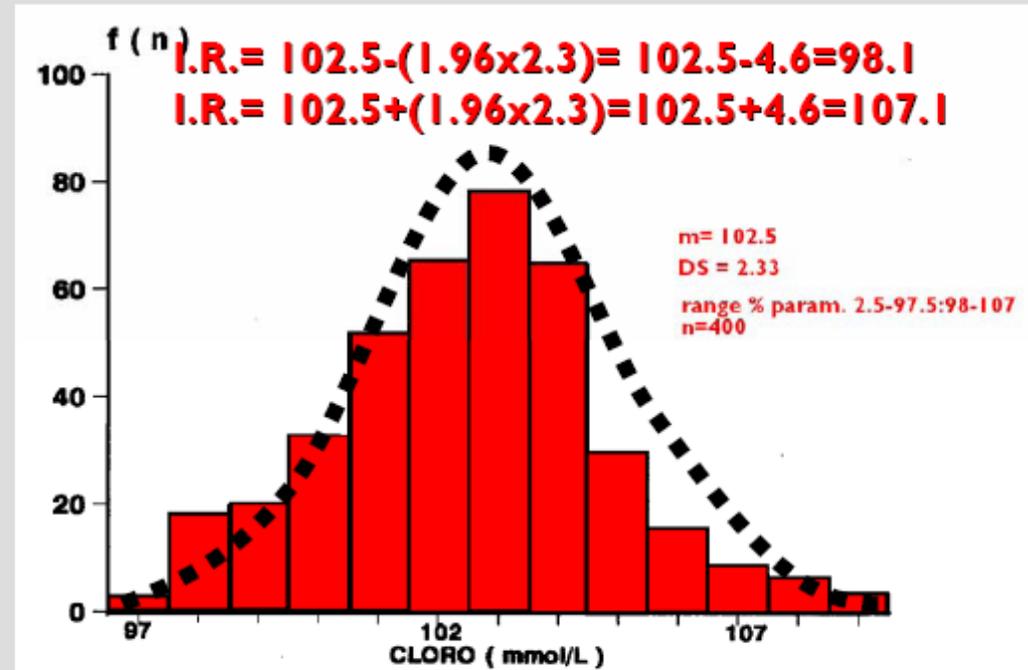
Distribuzione di tipo gaussiano

- Nel caso la distribuzione sia di tipo gaussiano si applica per il calcolo dell'intervallo una **statistica parametrica**:
 - 2 deviazioni standard sopra e sotto la media identificano l'intervallo di riferimento.

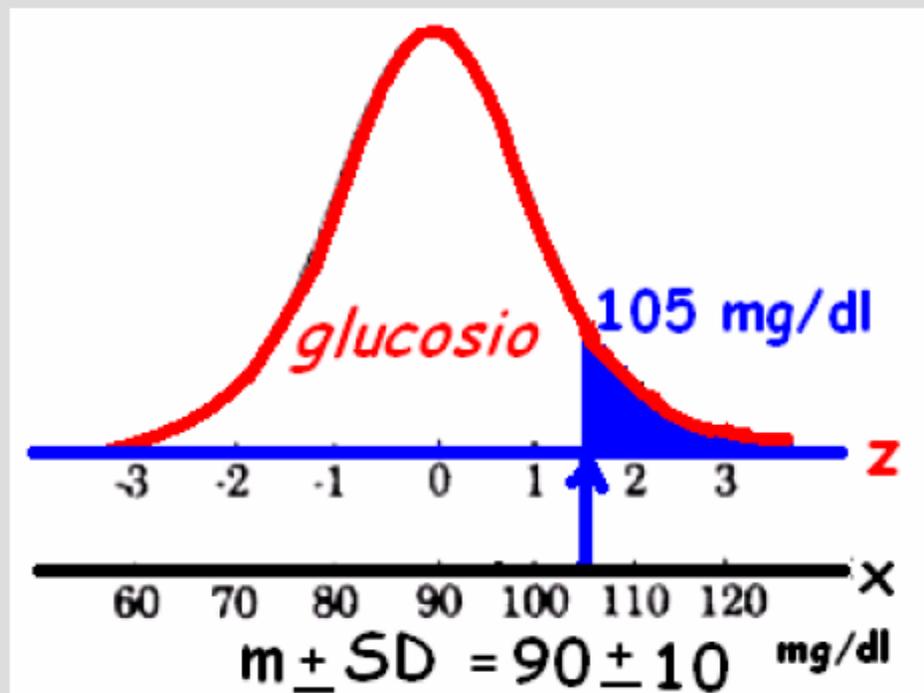


Caso I – distribuzione gaussiana ($n \geq 120$)

- Statistiche “parametriche”
 - n , media, DS, range
 - Intervallo di rif.:
 - ✓ $\text{media} - 1.96\text{DS}$ – $\text{media} + 1.96\text{DS}$
 - Percentili 2.5 – 97.5



Intervalli di riferimento per una distribuzione gaussiana



Distribuzione non gaussiana

- Statistiche “ non parametriche”

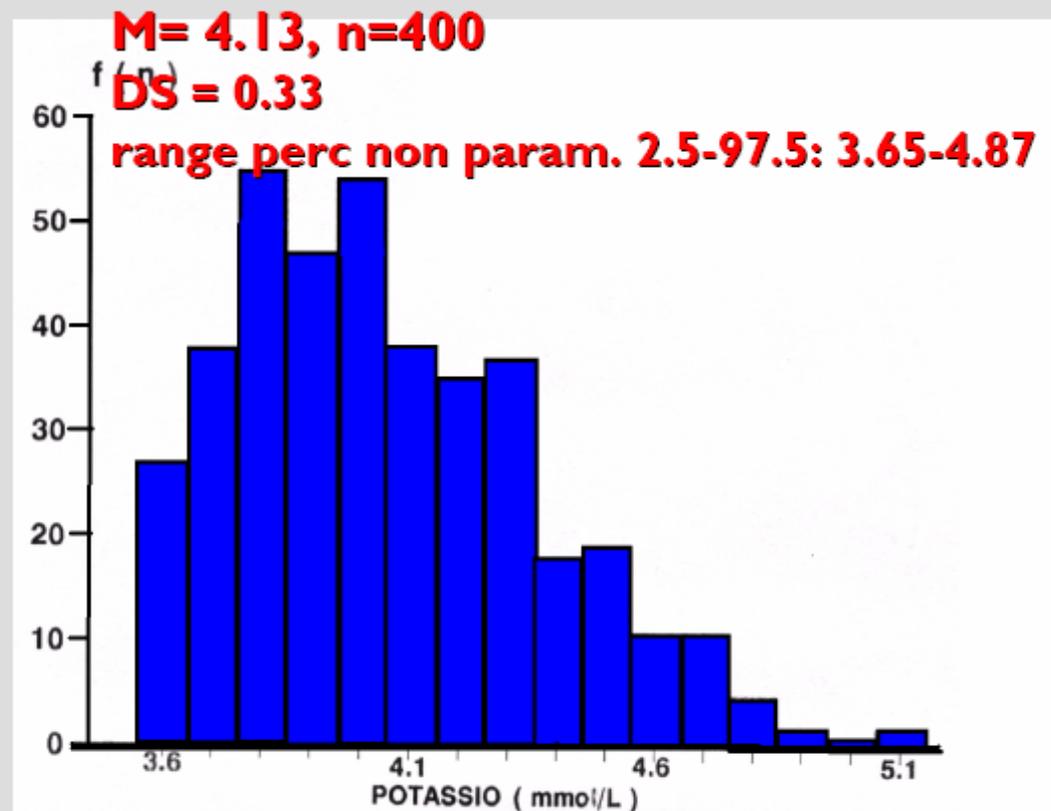
→ n, mediana, min, max, range

→ Intervallo di rif.:

✓ Percentili
2,5 – 97,5

Percentile 2.5:

valore più basso posseduto dal 2.5% della popolazione



Variabilità e incertezza

incertezza	vs	certezza
variabilità	vs	costanza
imprevedibilità	vs	prevedibilità
probabilismo	vs	determinismo
errore (sistematico)	vs	appropriatezza
errore (casuale)	vs	precisione

Le sfide che l'incertezza ci pone

Variabilità delle stime campionarie, intervalli di confidenza. Come convivere con l'incertezza

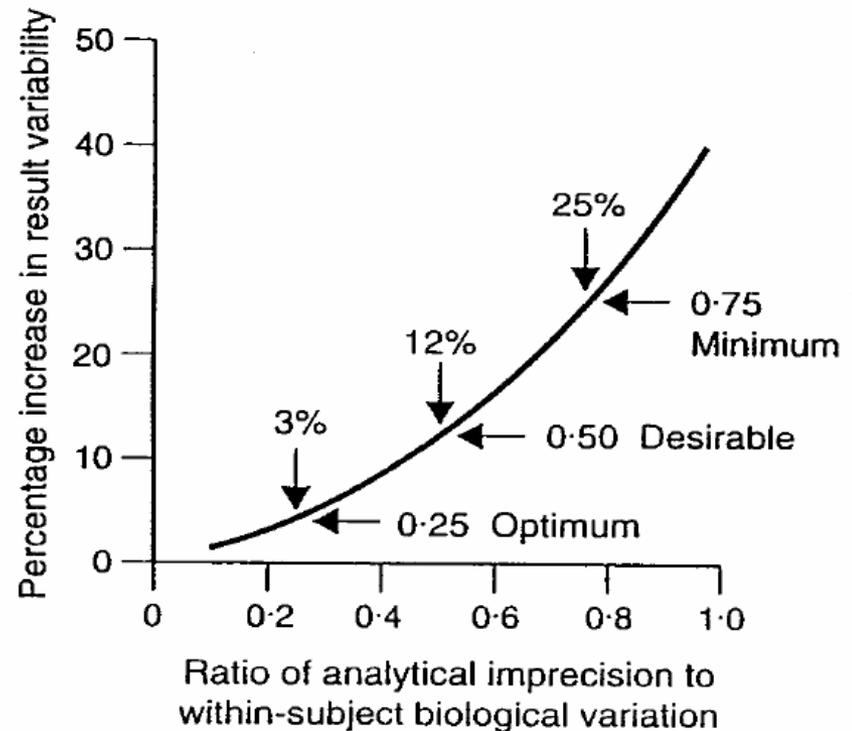
Variabilità “buona” e variabilità patologica (da evitare, correggere, limitare).
Il problema della “normalità”

Le componenti della variabilità. Comprenderle per dominare e gestire la variabilità

variabilità biologica

Le fluttuazioni naturali attorno al proprio punto medio di ciascun analita all'interno di un fluido biologico

- *Svantaggi* :
Precisione ed accuratezza lontani dall'essere raggiunti



Variabilità biologica, **valori di riferimento**

Definizione di specifiche di qualità basate sulla variabilità biologica

Specifiche di qualità per la imprecisione:

Modello: confronto di 2 valori nello stesso paziente (monitoraggio)

Variazione implicata: Vb intraindividuale

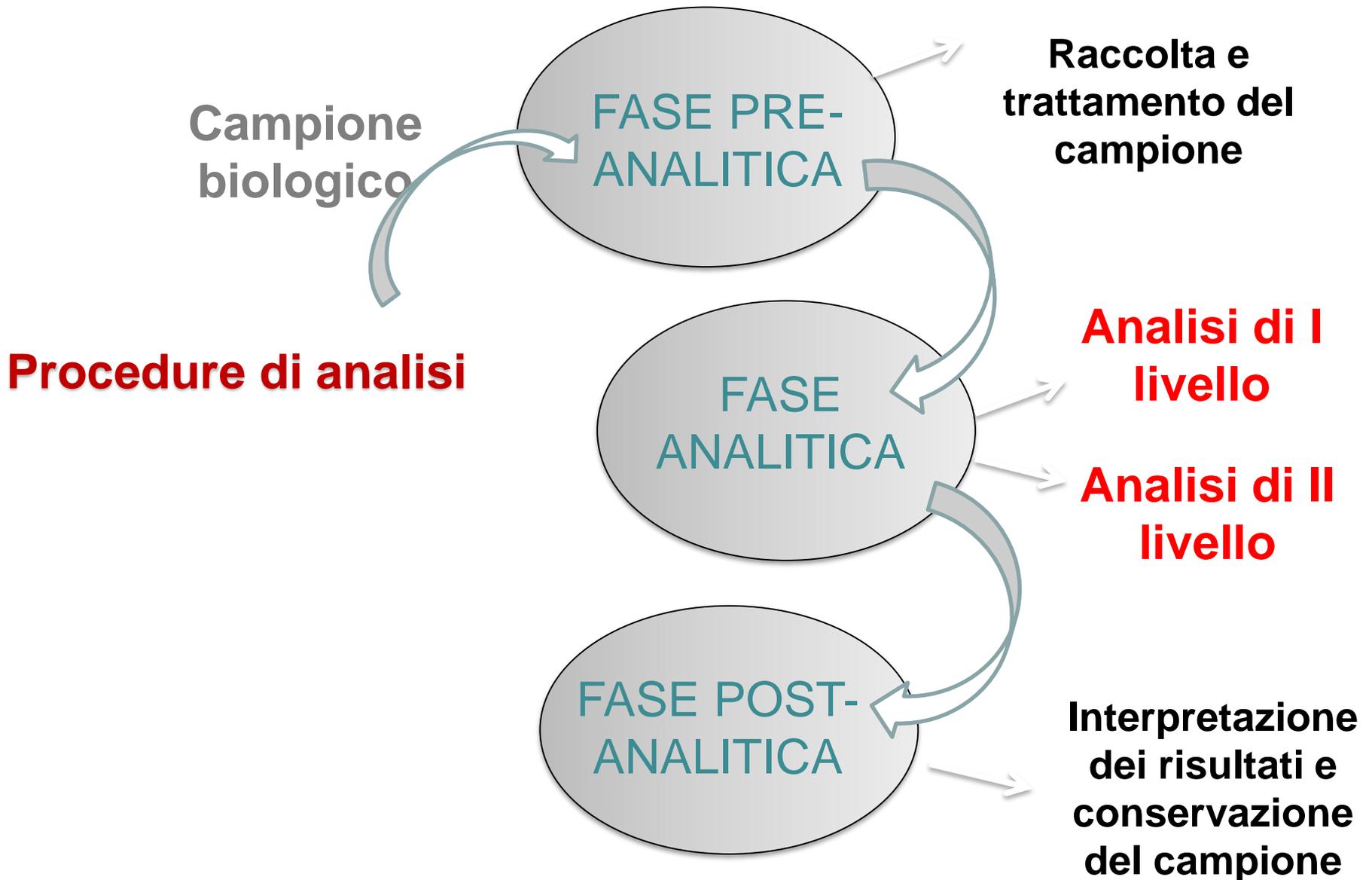
Specifiche di qualità per l' inaccuratezza:

Modello: transferibilità dei valori di riferimento (diagnosi)

Variazioni implicate : Vb intra e Vb interindividuale

Analita	Variabilità Biologica	Traguardo Analitico	CV% - Dato Sperimentale	Commento prestazione
Sodio	0,6	0,3	1,5	Scarsa
Cloro	1,4	0,7	2,5	Scarsa
Trigliceridi	23	11,5	10	Accettabile

Analisi di matrici biologiche



Analisi di sangue e urine

URINA

SANGUE

SALIVA

CAPELLI



Tra le diverse matrici biologiche, sangue e urina sono considerate le matrici di elezione per analisi chimico/cliniche

Vantaggi:

- prelievo poco invasivo
- campionamento di grandi volumi
- determinazione dei metaboliti anche a distanza di alcuni giorni dall'assunzione

Svantaggi:

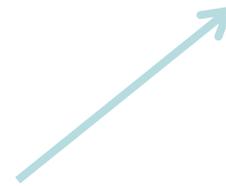
- contiene molte sostanze potenzialmente interferenti (sostanze con somiglianza strutturale o conformazionale)
- possibili contraffazioni del campione (diluizione, adulterazione, sostituzione)

Analisi di screening o di I livello

VANTAGGI

- sensibilità e specificità discrete
- nessun pre-trattamento del campione
- economicità
- rapidità
- efficacia
- standardizzazione

Il **CUT-OFF** è la concentrazione necessaria minima (in ng/mL) affinché la tecnica analitica usata ne segnali la positività



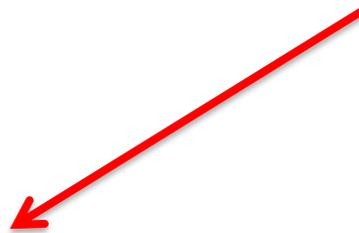
*Analisi **preliminari** che determinano, in riferimento a cut-off prestabiliti, la positività o la negatività di un campione in termini **semi-quantitativi***

Analisi di conferma o di II livello

CARATTERISTICHE

- sensibilità e specificità elevate
- tecniche costose e sofisticate
- estrazione degli analiti dalla matrice biologica

*Analisi altamente **specifiche e selettive** che permettono di confermare la positività dei campioni positivi e di verificare eventuali falsi positivi ai test di screening dando una risposta di tipo **quantitativo***



**PRE-TRATTAMENTO
ANALISI STRUMENTALE**

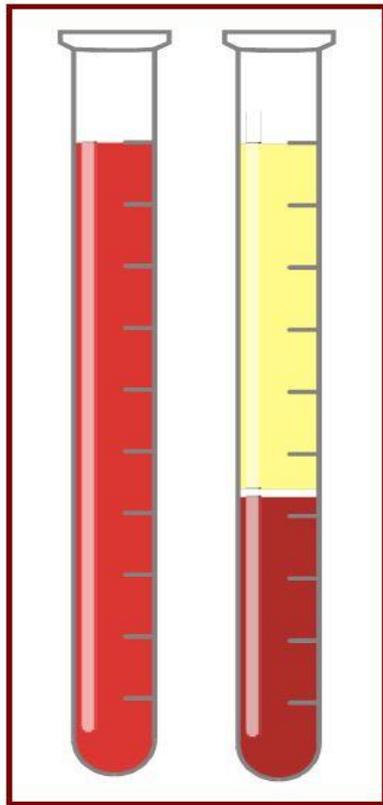
Analisi chimico clinica del sangue



Le analisi del sangue sono un metodo sempre più diffuso, in quanto:

- forniscono un gran numero di informazioni chimico/cloniche
- provocando il minimo danno al paziente.

COMPOSIZIONE DEL SANGUE



55%	plasma	{ 90% Acqua 8% Proteine 1% Sali 0,5%Lipidi 0,1%Glucosio	{ Albumine Globuline Proteine della coagulazione
~1%	globuli bianchi e piastrine		
45%	globuli rossi		

DI CHE COSA E' COMPOSTO

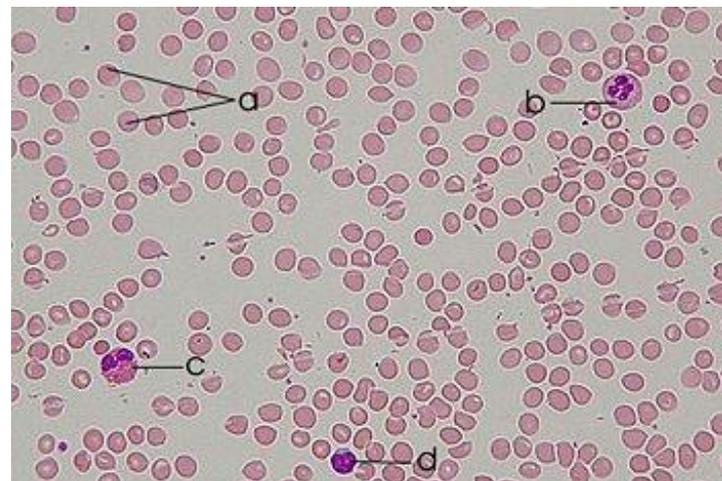
Ematocrito (HCT): da 28 a 52 %.

Globuli bianchi o Leucociti (WBC): da 4 mila a 10 mila.

Globuli rossi o Eritrociti (RBC): da 4 milioni a 5,5 milioni circa.

Piastrine (PLT): da 140 mila a 440 mila.

Volume corpuscolare (MCV): da 78 a 102 %.



QUANTE PROTEINE CI SONO

Albumina: da 50,1 a 69,3 %.

Beta globuline: da 6,3 a 12,1 %.

Alfa 2 globuline: da 6,1 a 11,2 %.

Alfa 1 globuline: da 2 a 3,5 %.

Gamma globuline: da 9,8 a 20 %.

COLESTEROLO E TRIGLICERIDI

Colesterolo HDL (high density lipoprotein)
≥35 mg/dl %.

Colesterolo totale: fino a 200 mg/dl %.

Trigliceridi: da 40 a 170 mg/dl %.

I SALI MINERALI

Ferro: da 37 a 147 mug/l.

Potassio: da 3,6 a 5 mEq/l.

Sodio: da 135 a 146 mEq/l.

Parametri importanti

Amilasi: fino a 160 UI/L.

Azotemia: da 10 a 50 mg %.

Bilirubina: da 0 a 1 mg/dl.

CPK(creatinfosfochinasi): da 33 a 194 UI/L.

Creatinina: da 0,6 a 1,2 mg %.

Fosfatasi alcalina: da 73 a 207 UI/L.

Gamma GT(glutamiltranspeptidasi): da 2 a 38 UI/L.

Glicemia: da 70 a 110 mg %.

Transaminasi: fino a 40 UI/L.

Uricemia: uomo da 3,7 a 7 mg %

- donna da 2,4 a 5,7 mg %.

Coagulazione

- Importanza fisiologica: argina la fuoriuscita di sangue causate da lesioni dei vasi
- Importanza analitica: possibilità di separare plasma dalla parte corpuscolare.



Coagulante



Coagulazione

La **via intrinseca della coagulazione** ha inizio con un trauma sul sangue stesso o con l'esposizione del sangue al collagene di una parete vasale traumatizzata e procede lungo una serie di reazioni a "cascata":

Attivazione del fattore XII (o fattore di Hageman) e liberazione di fosfolipidi piastrinici.

Per contatto con collagene o con una superficie bagnabile, come il vetro, il fattore XII assume una nuova configurazione e diventa attivo. Simultaneamente, le piastrine liberano fosfolipidi tra cui la lipoproteina chiamata *fattore piastrinico III*,

Attivazione del fattore X (o fattore di Stuart). Sempre in **presenza di ioni calcio**, il fattore IX attivato, agendo di concerto con il fattore VIII, con i fosfolipidi piastrinici e con il fattore III liberato dalle piastrine traumatizzate, attiva il fattore X (o fattore di Stuart).

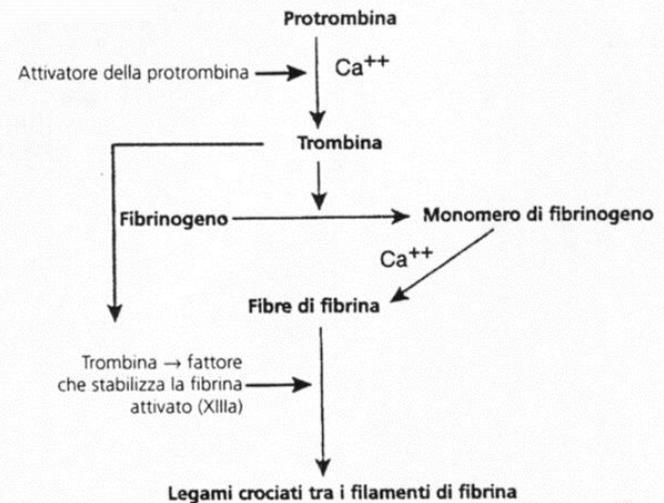
Formazione dell'attivatore della protrombina. Il fattore X attivato si unisce al fattore V ed ai fosfolipidi piastrinici o tissutali formando il complesso noto come *attivatore della protrombina*.

L'attivatore della protrombina determina **la scissione della trombina dalla protrombina**: la maggior parte delle molecole di protrombina si lega ai propri recettori presenti sulla superficie delle piastrine legate al tessuto danneggiato.

La trombina agisce sul fibrinogeno trasformandolo in filamenti di fibrina

La fibrina costituisce il coagulo nel cui **reticolo** restano intrappolate le piastrine.

Questa fase dura solo 10-15 secondi.



Schema della conversione della protrombina in trombina e polimerizzazione del fibrinogeno in filamenti di fibrina.

antioagulanti

Eparina: mucopolisaccaride acido: anticoagulante naturale, in quanto è presente a bassi livelli nel sangue e nei tessuti.

Agisce inibendo la trombina, in associazione con l'antitrombina III, e altri fattori della coagulazione

Gli ioni **calcio** sono necessari per lo svolgimento di tutte le reazioni.

Quindi, il sangue prelevato da un individuo può essere reso incoagulabile riducendo la concentrazione dei ioni calcio al di sotto del livello minimo richiesto per la coagulazione:

EDTA (acido etilendiaminotetracetico): sequestra lo ione calcio, formando con esso complessi stabili;

Citrato: sottrazione come sale stabile;

Ossalato: precipitazione come sale insolubile.

Plasma/siero

Per le indagini biochimico cliniche si può utilizzare

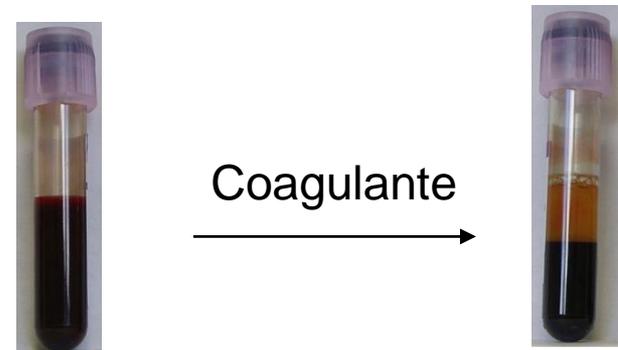
Plasma: si ottiene per centrifugazione da un campione di sangue intero a cui è stato aggiunto un anticoagulante (per esempio, citrato, eparina) immediatamente dopo il prelievo.

Il plasma può essere congelato per successive analisi.

Siero: si raccoglie il sangue in una provetta che non contiene anticoagulanti, e si permette la formazione del coagulo, si centrifuga

Il **siero** ha una composizione simile a quella del plasma, ma **non** contiene alcuni **fattori della coagulazione**, poichè si ottiene lasciando coagulare il campione di sangue prima della centrifugazione. Per i test della coagulazione tutti i fattori coinvolti nella coagulazione devono essere preservati, quindi il siero non può essere utilizzato.

Il plasma ha minor rischio di emolisi, rispetto al siero



Emolisi

L'emolisi visibile nel campione dopo centrifugazione: presenza di concentrazioni di emoglobina libera nel siero o nel plasma $> 300 \text{ mg/L}$ (18.8 nmol/L).

Conseguenze:

- Aumento di costituenti intracellulari nello spazio extracellulare
- Interferenza con la procedura analitica
- Interferenza ottica



Cause:

Tecnica di **prelievo**

- Accesso venoso difficile,
- Tipo di ago utilizzato,
- Stasi da laccio,
- Ostruzione parziale di cateteri,
- Applicazione di pressione negativa da aspirazione con siringa

Trattamento del campione

- Esposizione a temperature calde o fredde,
- Centrifugazione protratta ad alta velocità
- Trasporto?



Raccolta e trattamento campioni

Raccolta
Manipolazione
Trattamento
Analisi

Unica catena \Rightarrow massima accuratezza in tutti gli stadi per assicurare accuratezza del risultato finale.

buon esito dell'analisi di laboratorio: **standardizzazione** dei metodi di raccolta e di pre-trattamento dei campioni biologici per preservare le peculiarità chimiche, biologiche e morfologiche del campione stesso.

procedura di raccolta \Rightarrow Protocollo National Committee for Clinical Laboratory Standards

la modalità di prelievo, il trasporto, l'accettazione, trattamenti preliminari e la conservazione

Procedure standard di additivi per pretrattamento

Additivo	Colore tappo	Determinazione	Note
Gel e attivatore coagulazione	Rosso/grigio oppure oro	Chimica su siero	
Gel ed eparina di litio	Verde/grigio o verde chiaro	Chimica su plasma	
Nessuno	Rosso	Chimica su siero e sierologia	Utilizzabile per svariati usi
Trombina	Giallo/grigio o arancio	Analisi urgenti su siero	Breve tempo di coagulazione
Eparina di litio o di sodio	Verde	Chimica su plasma	
Citrato di sodio	Nero	VES	
Citrato di sodio	Azzurro	Coagulazione	
K ₂ o K ₁ EDTA	Lavanda	Ematologia	Pure test genetici...
NAF, K ₂ , EDTA/NaF o ossalato di K/NaF	Grigio	Glucosio	Anche per lattato ed alcool
Destrosio citrato acido (ACD)	Giallo	Banche del sangue, genetica	
Polianetolsolfato di sodio (SPS)	Giallo*	Microbiologia	
Eparina di sodio o nessun additivo	Blu*	Tossicologia	Per elementi in tracce e chimica nutrizionale

	Colore Note operative importanti	Tipo di campione: esami eseguiti	Volume minimo
	Rosso (per urgenze) Giallo Senza anticoagulante Con gel separatore	Siero: biochimica, immunologia, farmacotossicologia, sierologia batterica e virale	2 cc di sangue
	Tappo Grigio Con KF + Na ₂ EDTA Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo	Plasma: curve glicemiche – acido lattico	2 cc di sangue
	Tappo Nero Con anticoagulante K2 EDTA Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo	Sangue intero: emocromi, G-6-PDH, emoglobina glicata	1 cc di sangue
	Tappo Viola - Provetta lunga Con anticoagulante K3 EDTA Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo	Plasma: PTH, ciclosporina, Renina attiva, ACTH (Prel.a freddo) Tacrolimus e omocisteina (Prel.a freddo), BNP Sangue intero: Cromatografia Hb, ammonio, tipizzazioni linfocitarie	2 cc di sangue
	Tappo Arancio Con anticoagulante Litio Eparina Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo	Plasma: , marcatori cardiaci (CK-MB, troponina I)	1 cc di sangue
	Provetta Bianca Con anticoagulante K2 EDTA + gel Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo. La provetta deve essere recapitata in Laboratorio entro 2 ore dal prelievo	Plasma: rivelazione antigeni batterici e/o virali con metodica PCR	3 cc di sangue
	Tappo Celeste Con anticoagulante Na - citrato 9NC 3.2% (0.109M) Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo	Plasma: coagulazione	E' importante riempire sempre la provetta fino al segno indicato Esistono provette per prelievi pediatrici

	<p>Tappo Verde <u>Nota importante</u> Con anticoagulante Lito Eparina Capovolgere 4-5 volte subito dopo il prelievo</p>	<p>Plasma: biochimica in emergenza, osmolarità plasmatica; catecolamine plasmatiche (prel.a freddo)</p>	<p>2 cc di sangue Per catecolamine plasmatiche: provetta piena</p>
	<p>Tappo Rosso – Provetta da 7ml Senza anticoagulante Senza separatore</p>	<p>Chimica clinica: es. chimico fisico del Liquor Crioglobuline prelievo e recapito della provetta a 37 °C U.O. Microbiologia: esami batteriologici sul Liquor</p>	<p>1 cc di materiale:</p>
	<p>Provetta urine tappo bianco</p>	<p>Esame completo urine</p>	<p>5 cc di urina</p>
	<p>Provetta Urine tappo blu</p>	<p>Dosaggi urinari chimica clinica e tossicologici Test di gravidanza Lisozima urinario</p>	<p>1 cc di urina</p>