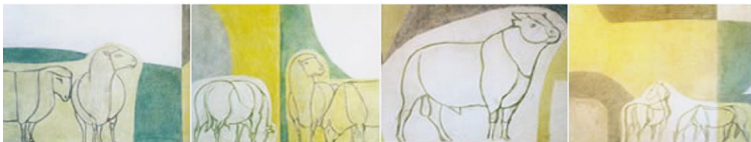


**ISTITUTO ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE DEL LAZIO E DELLA
TOSCANA
MARIANO ALEANDRI**

**METODICHE SPETTROFOTOMETRICHE e
di pHMETRIA DIFFERENZIALE: LORO
APPLICAZIONI E CONTROLLI QUALITÀ**



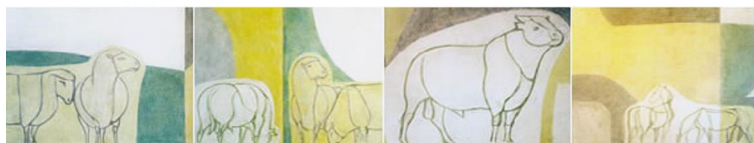
Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche





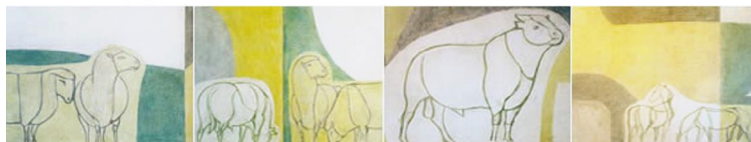
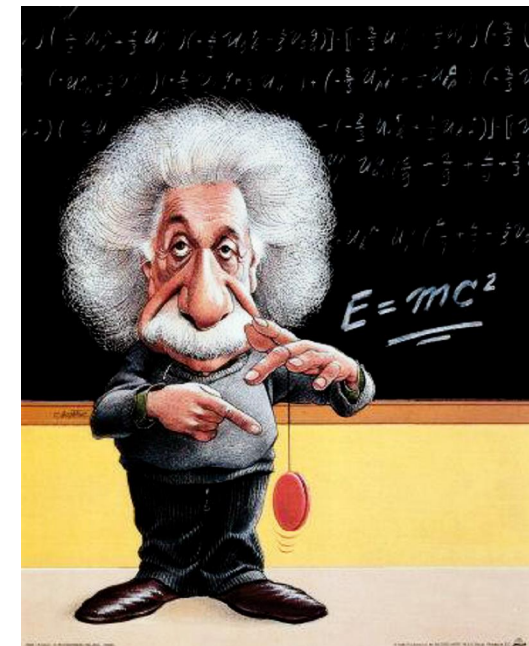
Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



TEMATICHE della LEZIONE

- ” Campioni
- ” Principi generali della spettrofotometria
- ” Applicazioni
- ” Esecuzione operativa
- ” Controlli qualità per l'attendibilità del dato

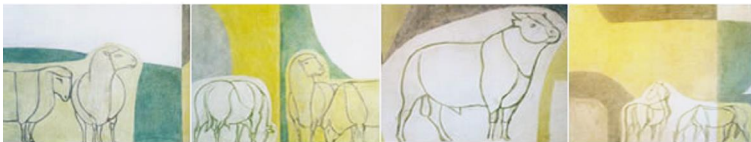
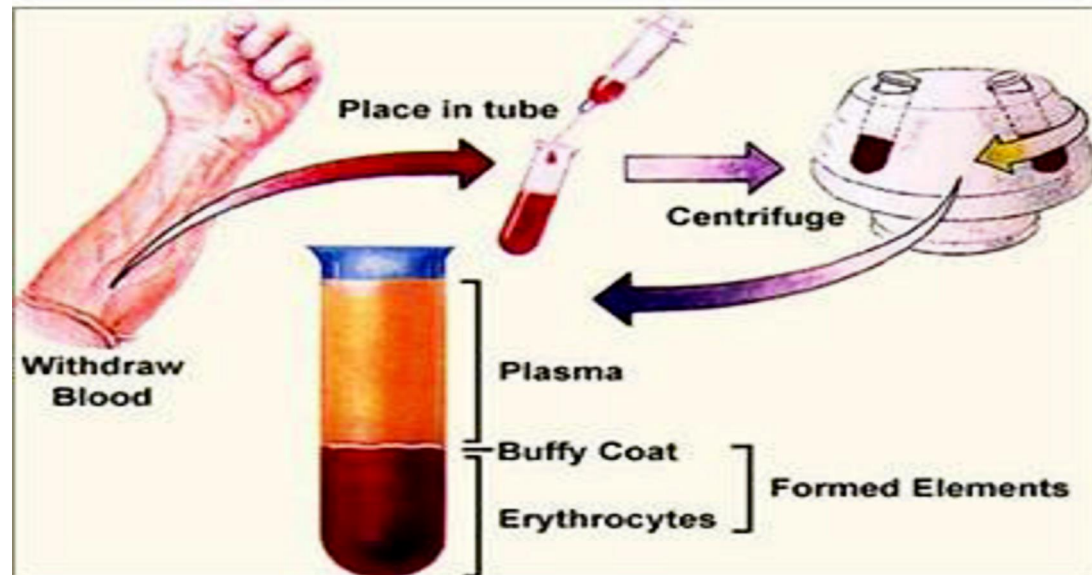


Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



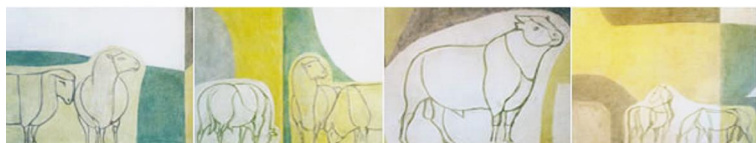
Campioni

- “ **SIERO**: si ottiene dalla centrifugazione di un campione di sangue intero non contenente anticoagulante (conservazione a $+4^{\circ}\text{C}$ o $+20^{\circ}\text{C}$)
- “ **PLASMA**: si ottiene dalla centrifugazione di un campione di sangue intero contenente anticoagulante (conservazione a $+4^{\circ}\text{C}$ o $+20^{\circ}\text{C}$)
(per alcuni parametri il tipo di anticoagulante può interferire nella prova)
- ! **LATTE**: crudo senza conservanti





La corretta raccolta e conservazione dei campioni rappresenta un prerequisito essenziale per assicurare la qualità del dato analitico, e quindi la qualità del servizio offerto al cliente.



Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



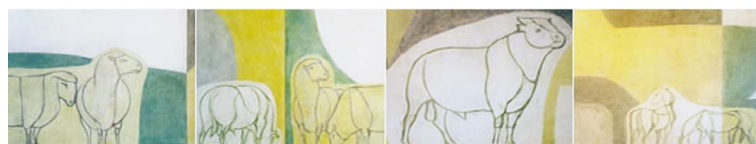
Campioni (plasma e siero): *errori nella fase preanalitica e nella fase di trasporto e conservazione*

” L'esercizio fisico può influire su alcuni enzimi muscolari, come il CK, l'LDH e l'AST che aumentano.

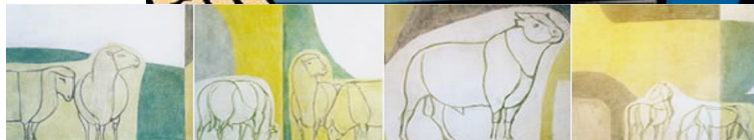


Anticoagulanti usabili per i vari test.

Sostanza anticoagulante	Concentrazione consigliata nel campione di sangue	Test per cui è particolarmente indicata	Test in cui interferisce
Litio eparina	~0,20 mg/ml	Sodio e potassio, bicarbonati cloruri	Ammoniaca, calcio, colesterolo CK, fosfato in., G6-PDH GGT, HBDH, insulina, NEFA
Sodio eparina	~ 1 mg/ml	Emocromo (in alternativa all'EDTA) resistenza globulare, emoglobine patologiche, enzimi plasmatici (esclusi i controindicati)	Calcio, colesterolo, CO ₂ , CK, ferro, LAP, potassio, proteine tot., tempo di protrombina, sodio, VES
Fluoruro (antiglicolitico)	~ 2 mg/ml	Glucosio	Ammoniaca, amilasi, calcio, cloruri, colesterolo, CO ₂ , fosfatasi alcalina, potassio, sodio, urea, VES
Citrato di sodio tribasico		Test emocoagulazione 0.38% VES : 0.76 %	Calcio, colesterolo, fosfatasi alcalina, fosfato in., magnesio, NEFA, sodio, trigliceridi



Una corretta esecuzione del prelievo e
una corretta manipolazione del campione sono necessarie per evitare **LA** ..
EMOLISI



Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche

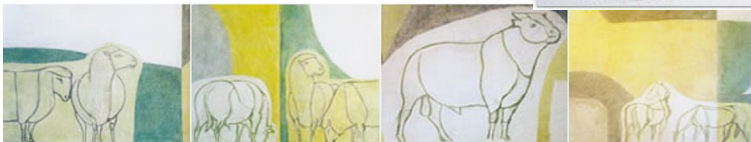


Emolisi

la membrana cellulare dei globuli rossi del sangue viene distrutta, con conseguente passaggio delle componenti intracellulari nel siero o nel plasma

Effetti dell'emolisi

- il rilascio di contenuti intracellulari (LDH e altri enzimi cellulari, potassio, magnesio, e fosforo) modifica la loro concentrazione nel siero.
- l'emoglobina libera (colore rosso) provoca interferenza in molti metodi di dosaggio.
- Le reazioni chimiche durante l'analisi possono essere influenzate dalle sostanze cellulari disperse con l'emolisi.



Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Cause di emolisi:

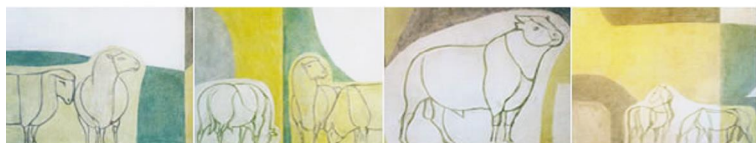


Tecnica di prelievo

- ” tipo di ago utilizzato
- ” stasi da laccio
- ” trasferimenti di sangue nelle provette sottovuoto, espellendolo dalla siringa con ago innestato.

Trattamento campione

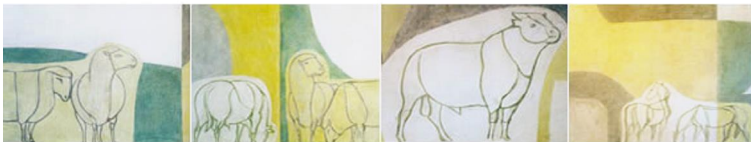
- ” esposizione a temperature **calde** o **fredde**
- ” centrifugazione protratta ad **alta velocità**
- ” ritardata separazione
- ” trasporto



Cosa fare per evitare le emolisi ????



Scegliere personale altamente qualificato ..

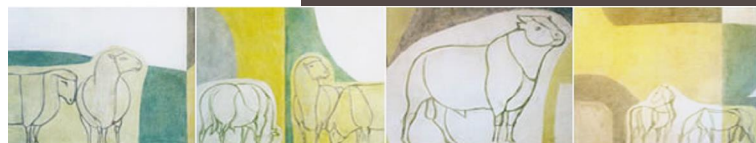


Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Le modalità di conservazione e trasporto al laboratorio possono determinare delle variazioni sui livelli di alcuni parametri

Effettuato il prelievo, il materiale va inviato subito al Laboratorio per essere sottoposto alla preparazione idonea per l'analisi (separazione del siero o del plasma dalla parte corpuscolare).



Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



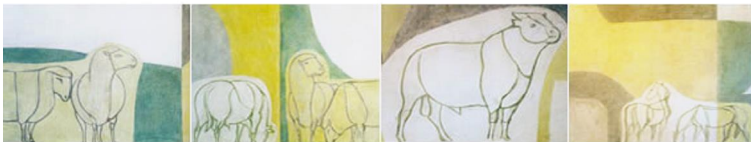
PERCHEq

se i campioni di sangue vengono lasciati a temperatura ambiente anche per un tempo limitato si hanno alterazioni dei livelli di alcuni analiti:

la concentrazione del **glucosio** ↓
diminuisce sensibilmente (diminuzione del 3-5% ogni ora a causa del metabolismo degli elementi figurati);

una volta che il glucosio viene completamente utilizzato, i globuli rossi cominciano a perdere il loro contenuto citoplasmatico dando luogo ad aumento di

LDH, AST, e alcuni elettroliti ↑



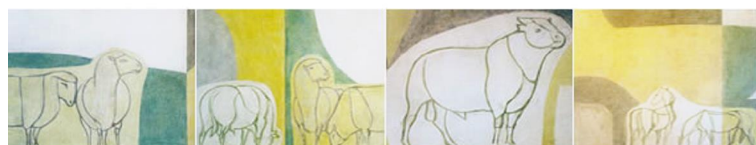
Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Campioni: quantità e conservazione

Prova richiesta	Matrice	Quantità minima	Temperatura di conservazione	
			aliquota analisi	aliquote scorta
Emocromo Formula leucocitaria	Sangue con anticoagulante: EDTA o Litio Eparina	dipendente dalla provetta utilizzata	+5°C ±3 °C	—
Prove chimico cliniche Dosaggi ormonali	Siero/Plasma Siero Siero/Urine	50 µl: 1 prova/500 µl: 19 prove 250 µl per ormone 50 µl	-20°C ±5 °C	—
Urea	Latte	10 ml	+5°C ±3 °C	—



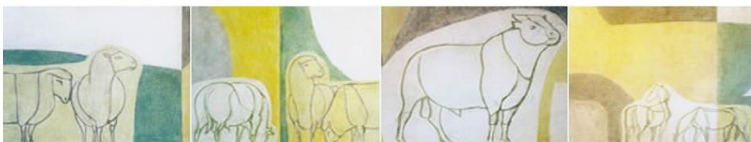
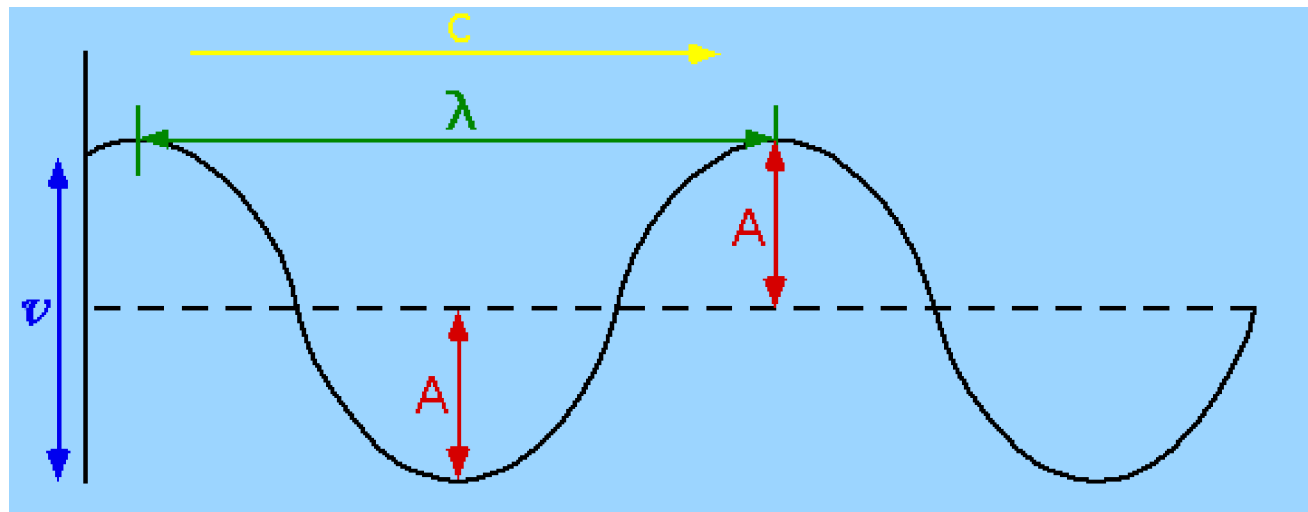
Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Metodo di rilevazione spettrofotometrico

Equa tecnica analitica che permette la **determinazione qualitativa e quantitativa** di una **sostanza**, mediante la sua interazione con la **radiazione elettromagnetica**



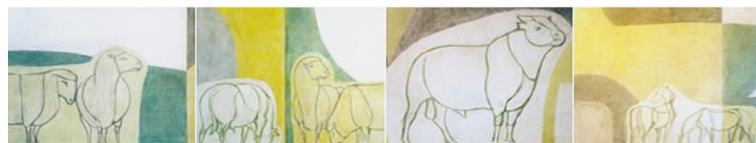
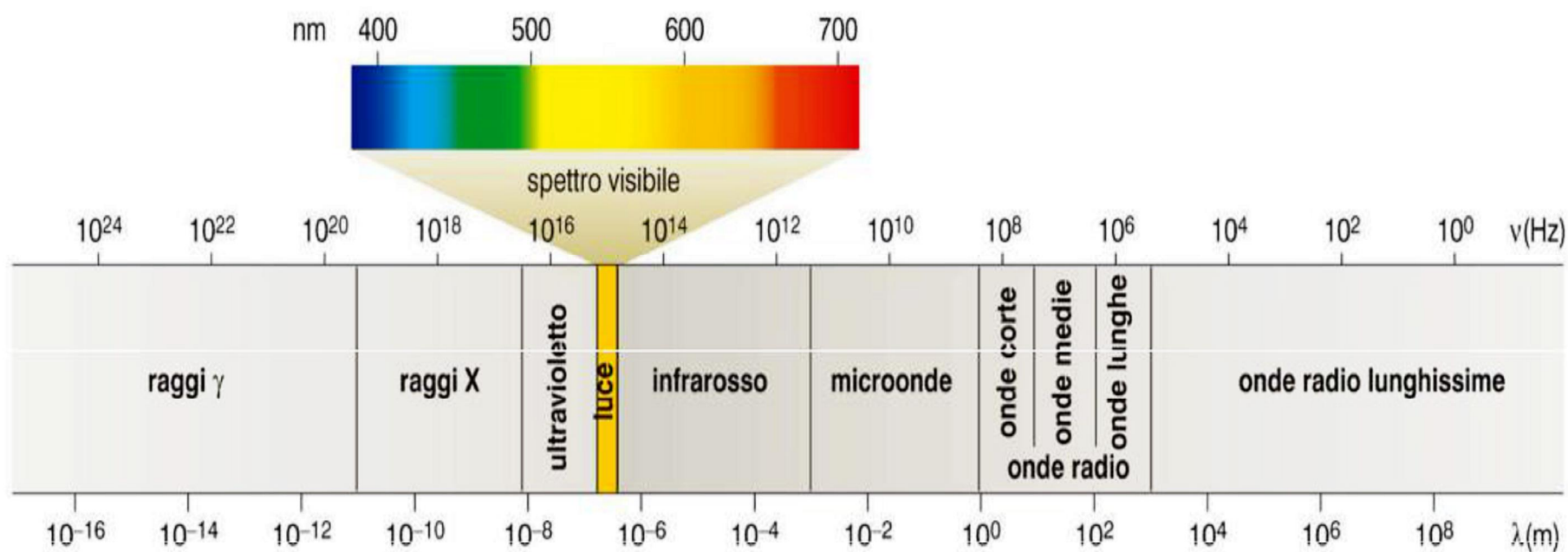
Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Le radiazioni elettromagnetiche possono essere classificate in base al valore di λ

Qinsieme delle radiazioni (onde) elettromagnetiche costituisce lo spettro elettromagnetico



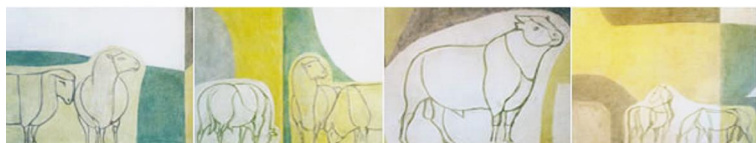
Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche





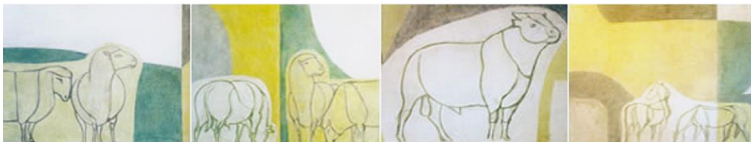
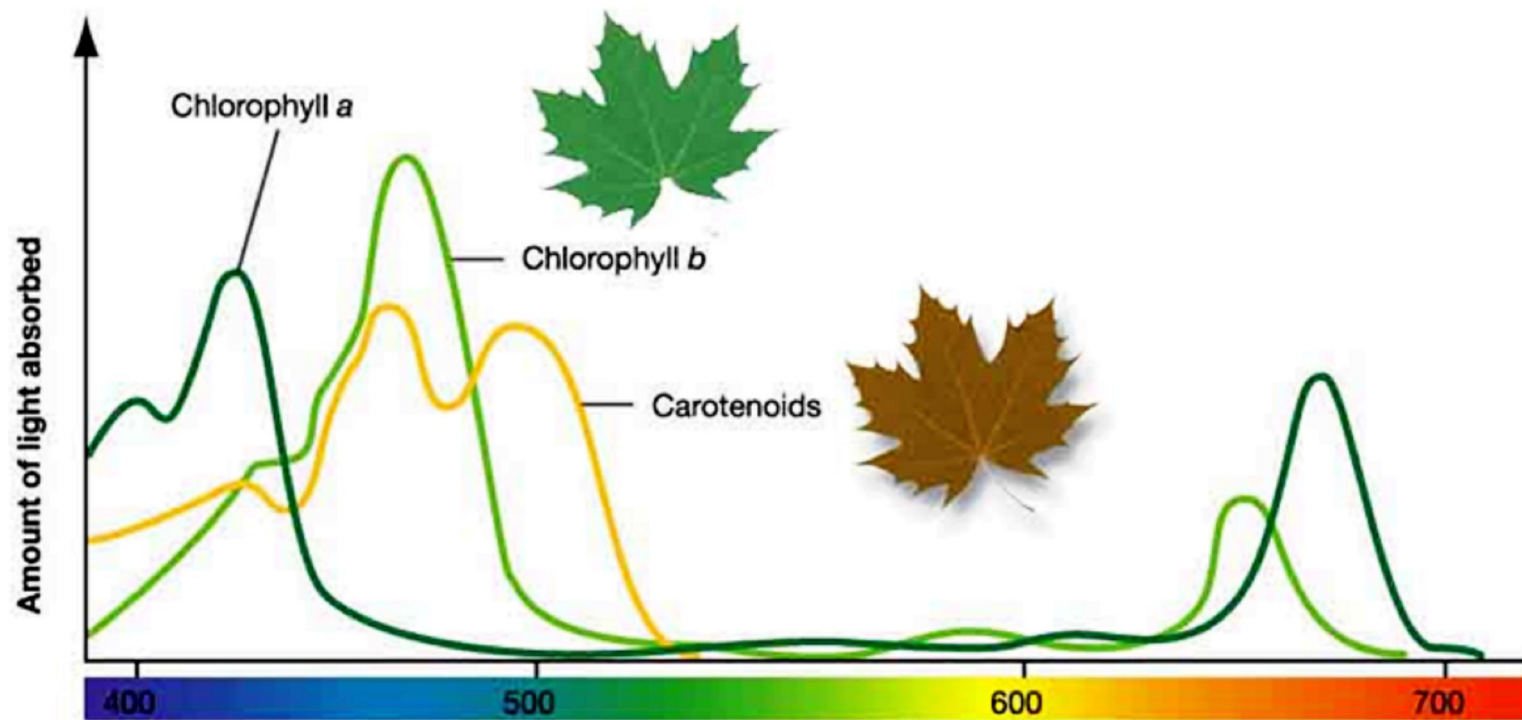
Il nuovo profumo di Antonella



Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



ANALISI QUALITATIVA



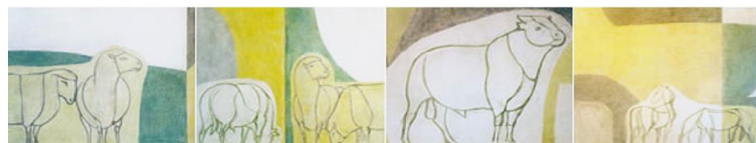
ANALISI QUANTITATIVA

Le determinazioni quantitative sono basate sul fatto che, quando una radiazione attraversa una soluzione, viene assorbita più o meno intensamente a seconda della concentrazione

L'ASSORBIMENTO DIPENDE DALLA CONCENTRAZIONE



I_0 = l'intensità della radiazione incidente
 I = l'intensità della radiazione trasmessa



Antonella Nardoni

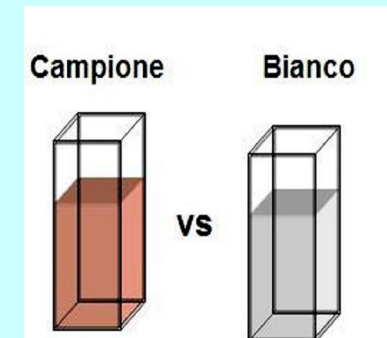
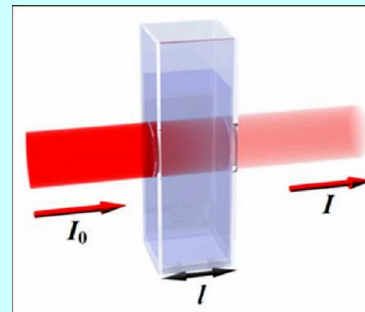
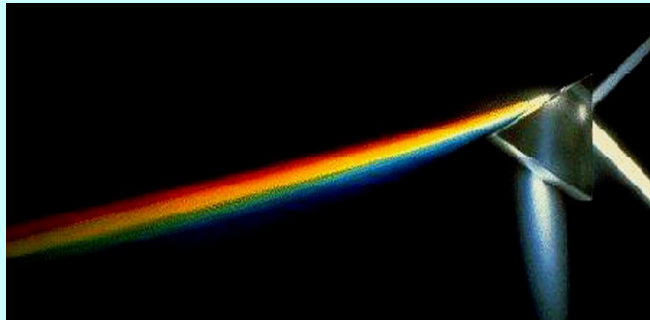
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



ASSORBANZA

A (Assorbanza) o **Densità ottica** (O.D.) è definita come il **logaritmo dell'inverso della trasmittanza**

$$A = - \log T = \log I_0 - \log I$$



$$A = C l$$

Legge di Lambert-Beer

C = concentrazione della soluzione o specie chimica in esame

l = cammino ottico (ovvero lo spessore della soluzione)

= coefficiente di estinzione molare (ovvero l'assorbimento che subisce un raggio di luce monocromatica nell'attraversare una soluzione a concentrazione unitaria e cammino ottico di 1 cm)



Antonella Nardoni

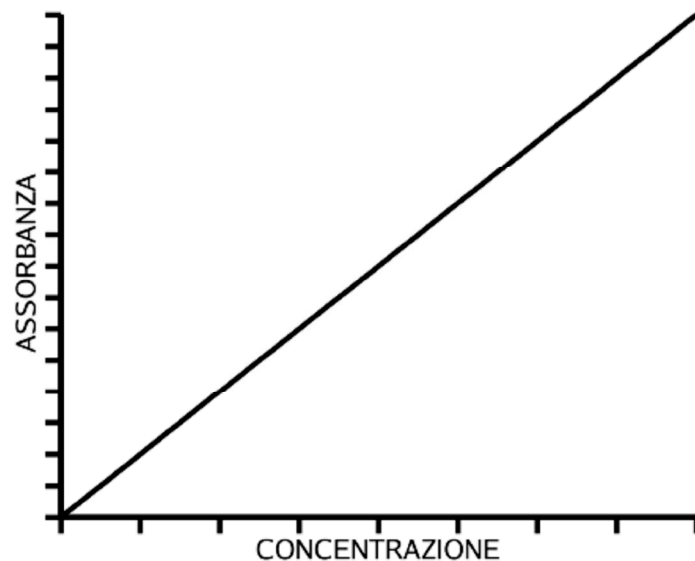
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



ANALISI QUANTITATIVA

La legge di Lambert-Beer descrive i fenomeni di assorbimento di radiazioni elettromagnetiche ed è valida per radiazioni monocromatiche e soluzioni diluite.

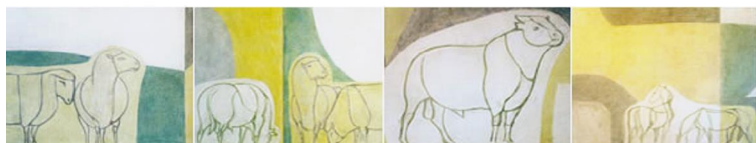
LA PROPORZIONALITA' DIRETTA TRA ASSORBANZA E CONCENTRAZIONE PERMETTE DI EFFETTUARE ANALISI QUANTITATIVE



L'equazione $A = \epsilon \cdot l \cdot C$

rappresenta una retta passante per l'origine

Degli assi e in cui $\epsilon \cdot l$ è il **coefficiente angolare**

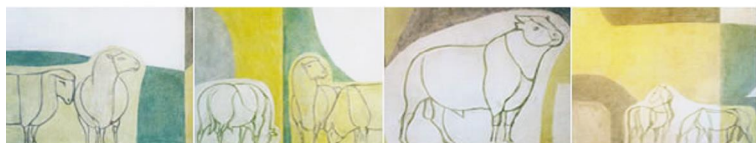


Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Se non avete
capito! Tranquilli
che ve lo ripeto!!



Antonella Nardoni

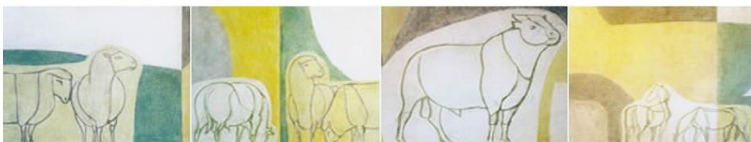
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Le Cuvette: Contenitori per la lettura spettrofotometrica



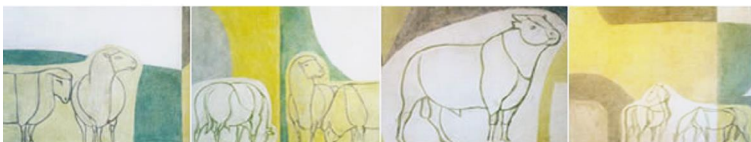
- “ Cuvette o cellette
- “ Sono a forma di parallelepipedo, con due facce piane, parallele ed omogenee che sono quelle che dovranno essere attraversate dal raggio monocromatico ed altre due zigrinate per facilitarne la presa e distinguerle dalle altre due
- “ Spessori tra 0,2 e 1 cm
- “ Devono offrire una trasparenza totale alle radiazioni monocromatiche
- “ L'efficienza di una cuvetta dipende dal modo in cui viene conservata e usata
- “ Impronte digitali, grasso o altri depositi alterano marcatamente le caratteristiche di trasmissione



DOSAGGI ENZIMATICI e COLORIMETRICI

- ✓ DOSARE LA **QUANTITÀ DI UN SUBSTRATO** CHE PRENDE PARTE ALLA REAZIONE CATALIZZATA DA UN ENZIMA
- ✓ DOSARE L'ATTIVITÀ DI UN ENZIMA, CIOÈ **LA VELOCITÀ DI REAZIONE CATALIZZATA DA UN ENZIMA**
- ✓ DOSARE LA QUANTITÀ DI **SUBSTRATO O ELETTROLITA** CHE IN PRESENZA DI UN REAGENTE SI TRASFORMA IN UN COMPOSTO COLORATO.

- Strumento diagnostico per il danno di un tessuto e/o organo
- Carenze e/o difetti enzimatici sono responsabili di sindromi biochimiche



Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



REAZIONE COLORIMETRICA ..

Vediamo
se la sua reazione
sarà acida

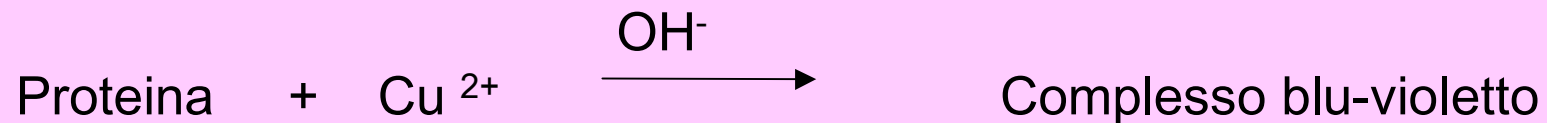


Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche

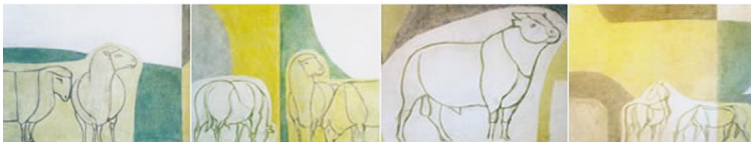


DOSAGGIO COLORIMETRICO: Proteine Totali



Gli ioni rameici in soluzione alcalina reagiscono con le proteine producendo un complesso violetto.

L'assorbanza del complesso a 540/660 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteine nel campione.



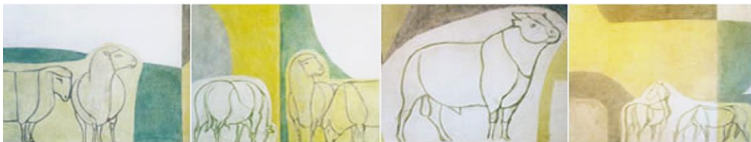
Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche

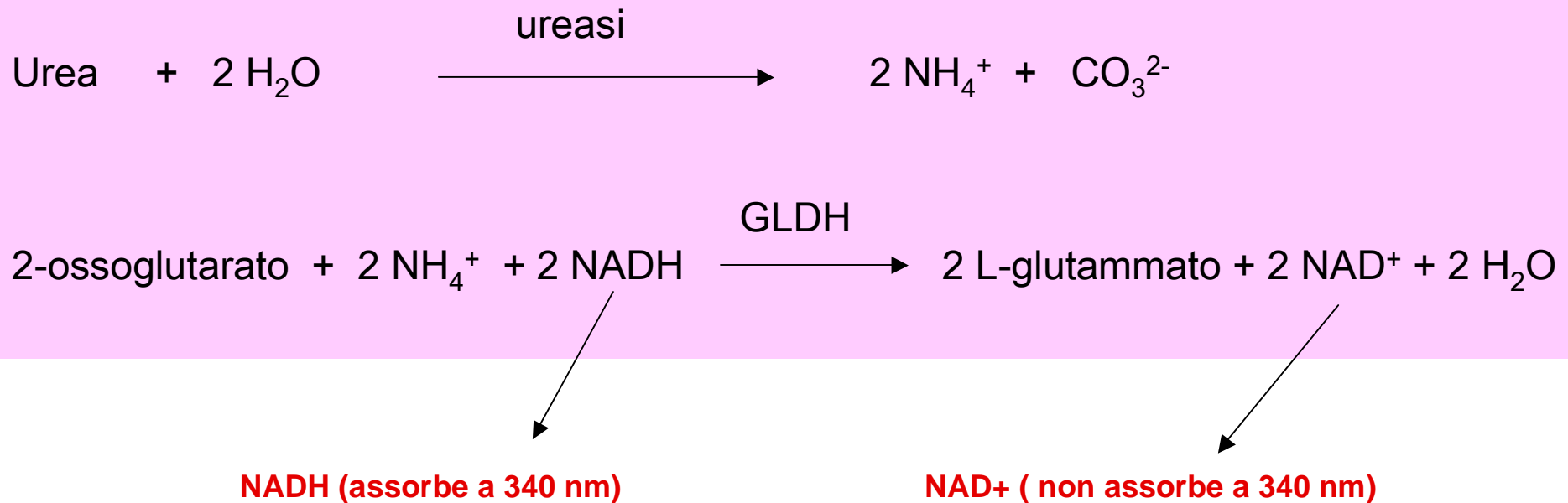


DOSAGGIO ENZIMATICO

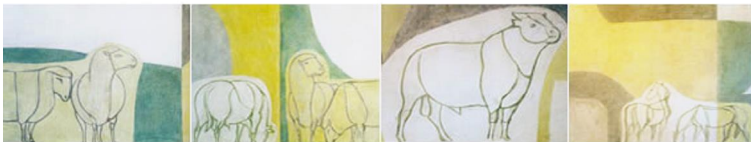
- “ La possibilità di vedere una reazione enzimatica è legata al fatto che i substrati e i prodotti hanno proprietà chimico-fisiche diverse.
- “ Tali proprietà devono poter essere misurabili



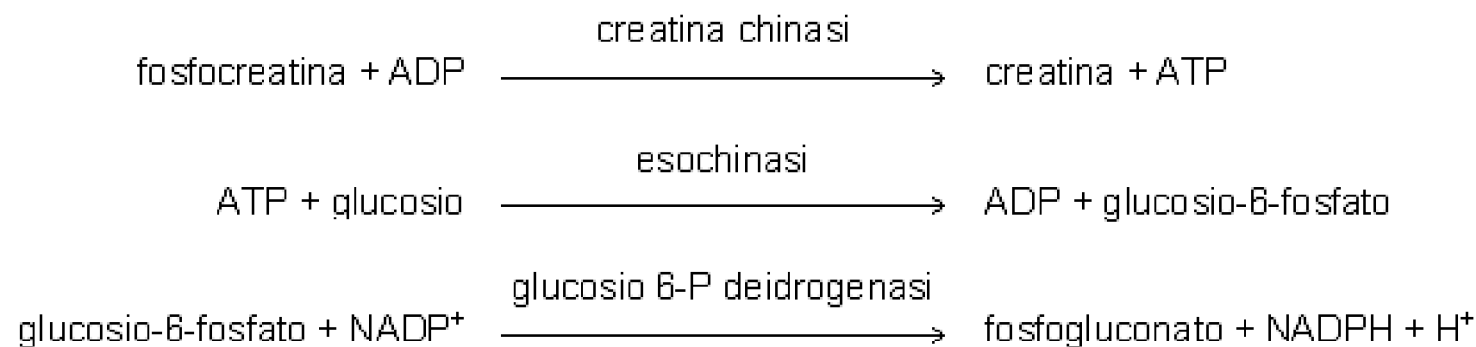
DOSAGGIO ENZIMATICO: UREA (Azoto Ureico)



La diminuzione nell'assorbanza di NADH, per unità di tempo, è proporzionale alla concentrazione di UREA

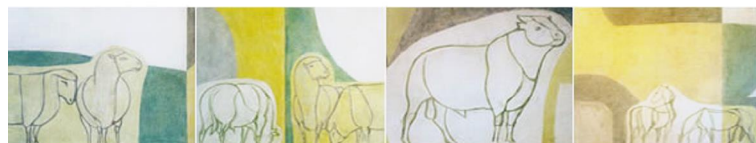
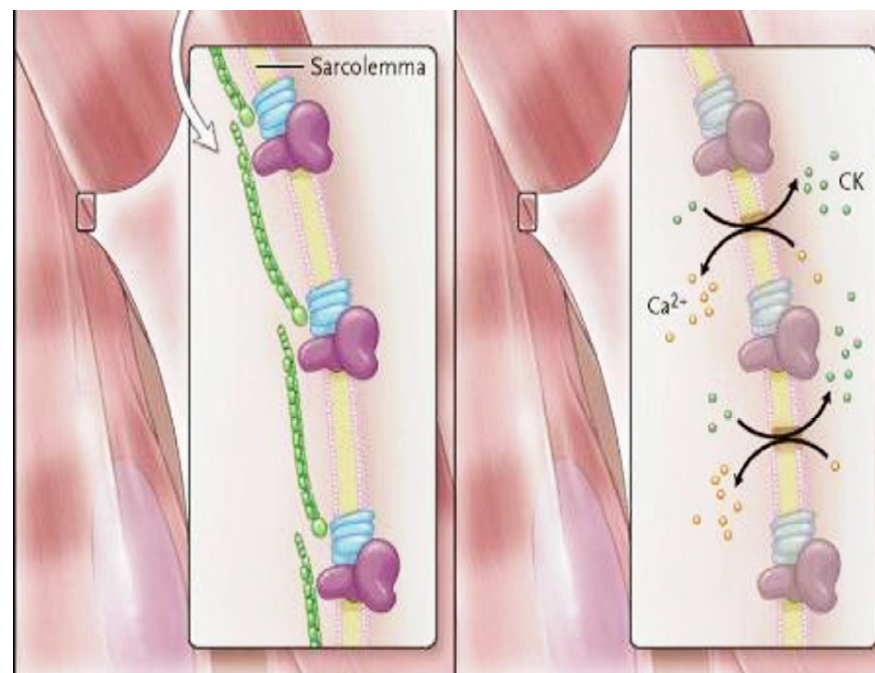


DOSAGGIO ENZIMATICO: Creatina Chinasi



**Determinazione
spettrofotometrica a 340nm**

**l'assorbanza dovuta a NADPH
è proporzionale all'attività dell'enzima**

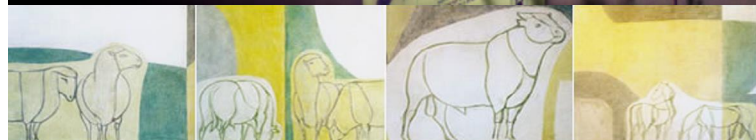
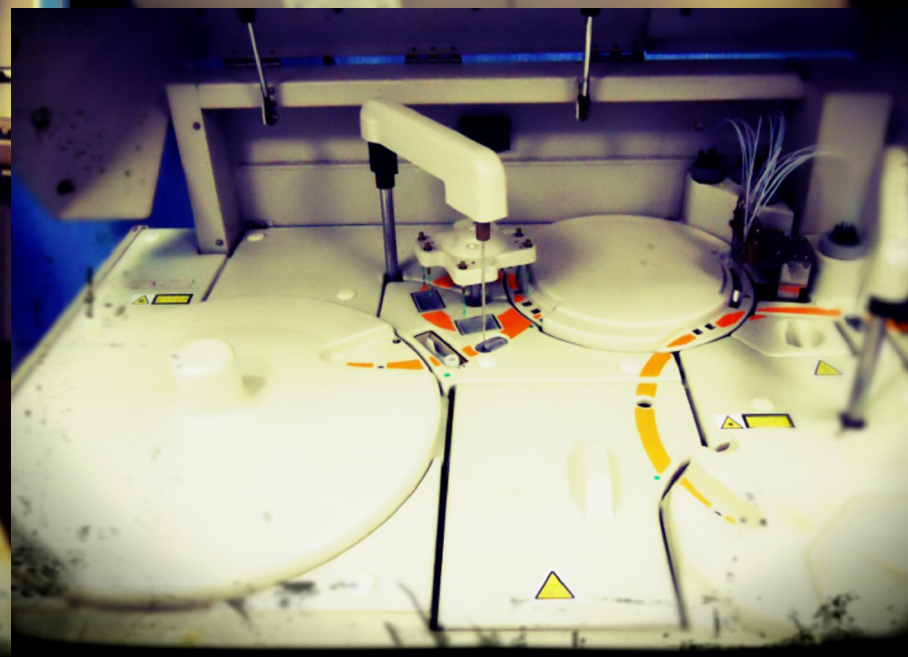


Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche

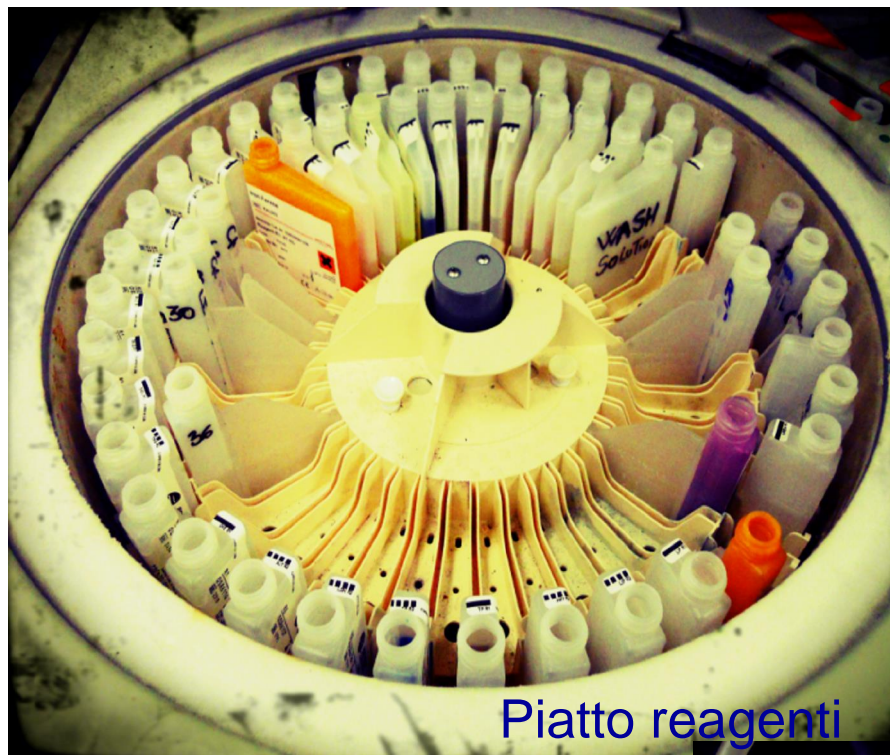


OLYMPUS AU400



Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche

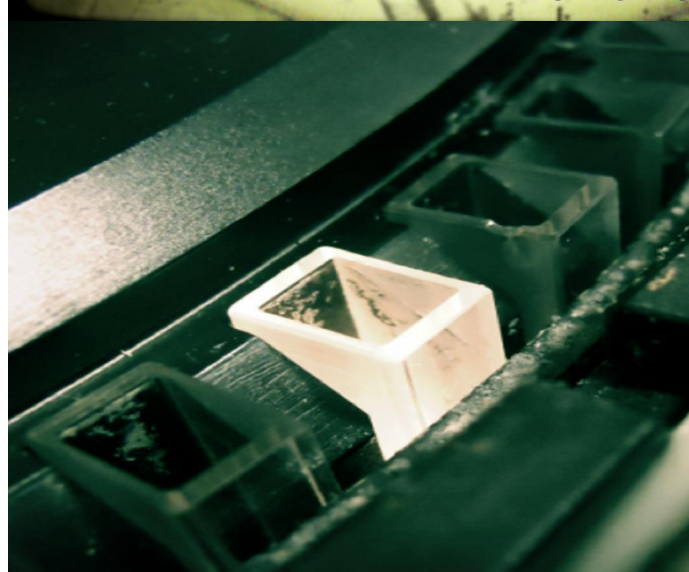




Piatto reagenti



Piatto reazione



Elettrodi



Stazione di lavaggio

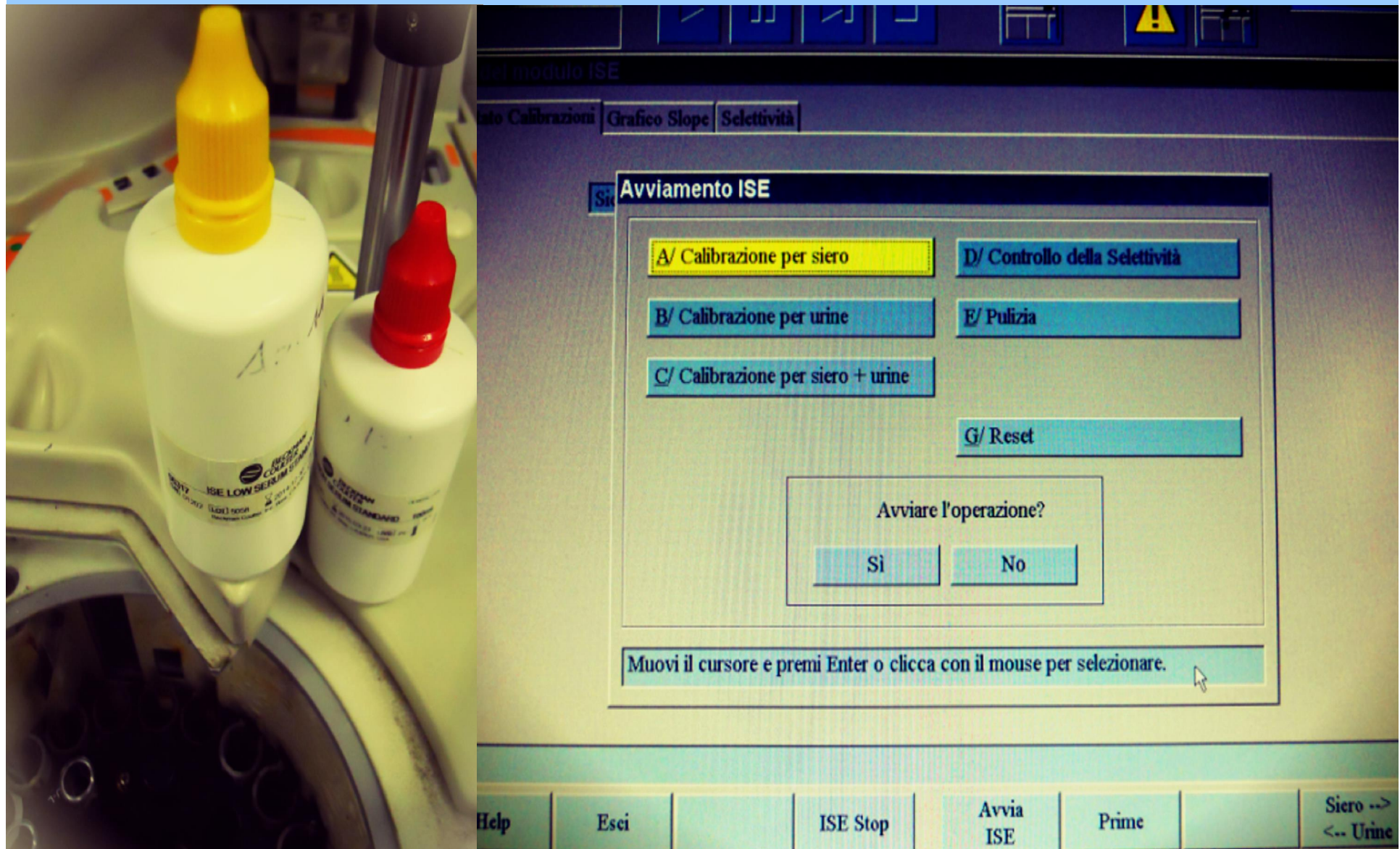


Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Calibrazione elettroliti (ISE - Elettodi Iono Selettivi)



Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



CALIBRAZIONE: Standard Unico

La determinazione della concentrazione dei parametri biochimici, con metodo spettrofotometrico, è eseguita mediante confronto con unico standard (calibrante) attraverso la relazione derivante dalla legge di Lambert-Beer:

$$[] X = \frac{Abs_x}{Abs_c} \times [] C = \frac{[] C}{Abs_c} \times Abs_x = F_{Calib} \times Abs_x$$

dove:

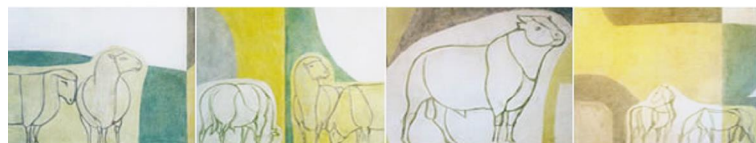
[] X È concentrazione del parametro biochimico nel campione incognito

Abs_x È Assorbanza ottenuta durante la misura del campione incognito

Abs_c È Assorbanza ottenuta durante la misura dello standard/calibrante

[] C È concentrazione dello standard/calibrante

F Calib È fattore di calibrazione



CALIBRAZIONE: Standard Unico

Il segnale (Abs_x) ottenuto dalla prova, moltiplicato per il fattore di calibrazione, fornisce la concentrazione del parametro biochimico nel campione:

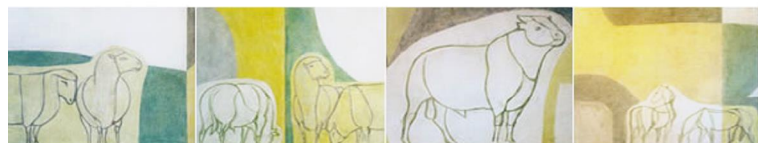
$$[] X = F \text{ Calib} \times Abs_x$$

Il valore del fattore di calibrazione, è ottenuto mediante la formula:

$$F \text{ Calib} = \frac{[] C}{Abs_c}$$

è accettato se cade all'interno di un range di accettabilità che tiene conto della variabilità dell'assorbanza del reagente.

Il valore del fattore di calibrazione dipende esclusivamente dall'assorbanza del reagente e non influisce sul risultato del campione.



Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Fattore di Calibrazione: Calibrazione AB Calibrazione MB

Calibrazione AB È questo tipo di impostazione permette di determinare il Fattore di calibrazione

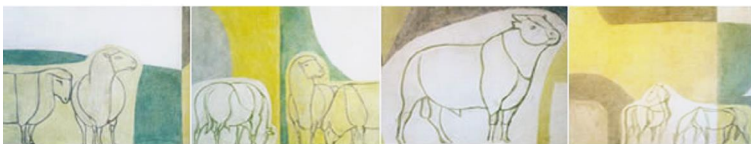
Calibrazione MB - è utilizzato un Fattore di calibrazione determinato dal laboratorio. La generazione del fattore MB specifico deve essere eseguita con un approccio scientificamente valido:

“Si utilizzano 5 eventi di calibrazione separati.

“Per ognuna di queste analisi si utilizza una fiala nuova di calibrante nel modo calibrazione AB.

“Si scartano i valori palesemente anomali, i quali devono essere sostituiti con nuove analisi.

“È consigliabile ridefinire il fattore MB specifico nel caso di sostituzione di un componente critico.



Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Programmazione del Bianco reagente e della Calibrazione



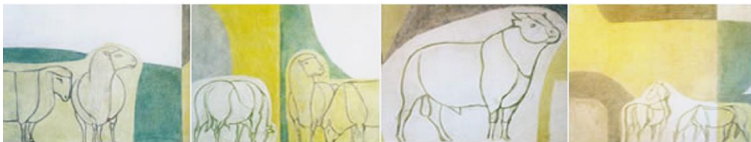
Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Attendibilità del dato analitico

- “ Ogni laboratorio deve stabilire la frequenza con la quale analizzare i controlli.
- “ La buona prassi suggerisce di analizzare i controlli nei giorni in cui si analizzano i campioni e ogni volta che viene eseguita un'analisi del bianco reagente o una calibrazione
- “ È consigliabile che ogni laboratorio generi, secondo le proprie esigenze, intervalli e valori target di controllo.



Antonella Nardoni

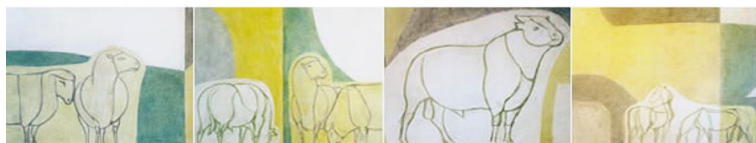
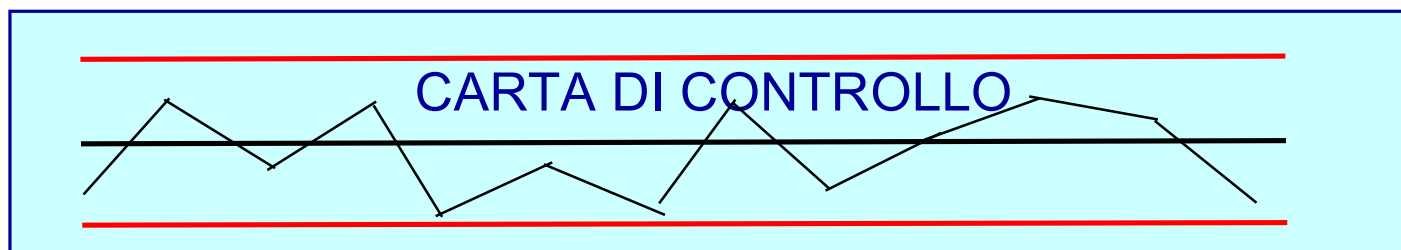
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



CONTROLLI: FISIOLOGICO / PATOLOGICO

**Per l'attendibilità del dato analitico sono
dosati due controlli:**

- 1) livello normale** (con valori fisiologici)
- 2) livello alto** (con valori patologici)



Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Programmazione dei CONTROLLI

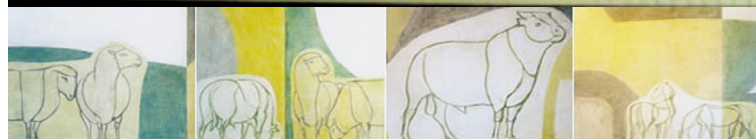
Routine (P)Parametri (A)Utilità (M)Manutenzione (U)Menu Utente (L)Accesso

po: Siero

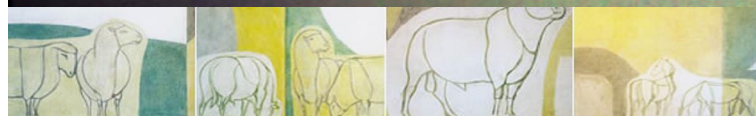
GLU	CREA	AC . UR	CA	MG	FOSF	BILT	BILD	PT	TRIG	COLES
AMI	LDH	ALT	CHE	F . ALC	CK	LIP	FE	APTO	ALB	C1
AZ . UR	GGT	AST	ACBIL	NEFA	TAX	b-HBA	blkBD	blkBT	D-ROM	ZINCO
URPRO	Na	K	.	OXY	CK R	GGT R	LDH R	ALP R		

Selezionare/deselezionare premendo il tasto Enter o facendo clic con il mouse.

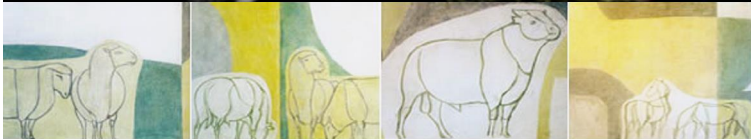
Help	Esci		Conferma			Seleziona Tutti	Deseleziona tutti Test
------	------	--	----------	--	--	-----------------	------------------------



CONTROLLI: Carte di Controllo



CAMPIONI

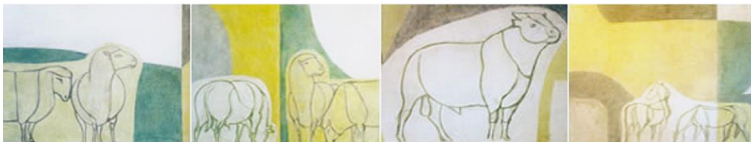


Antonella Nardoni
Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



Programmazione Campioni

- “ I campioni sono programmati inserendo il Servizio Diagnosi e caricando i parametri richiesti.
- “ Il risultato è fornito direttamente dall'apparecchiatura.
- “ In caso di campioni che devono essere diluiti, a causa di una concentrazione elevata dell'analita, il risultato è automaticamente moltiplicato per il fattore di diluizione dall'apparecchiatura.

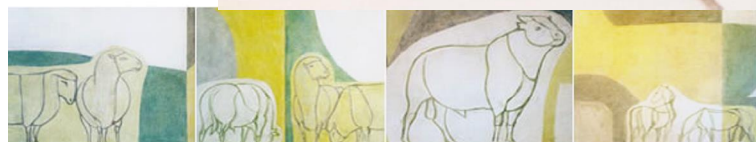


Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche

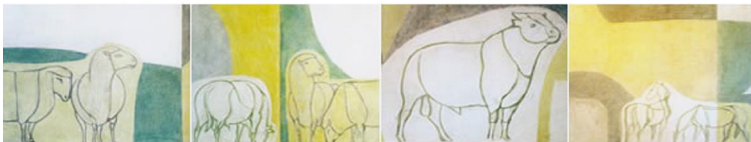
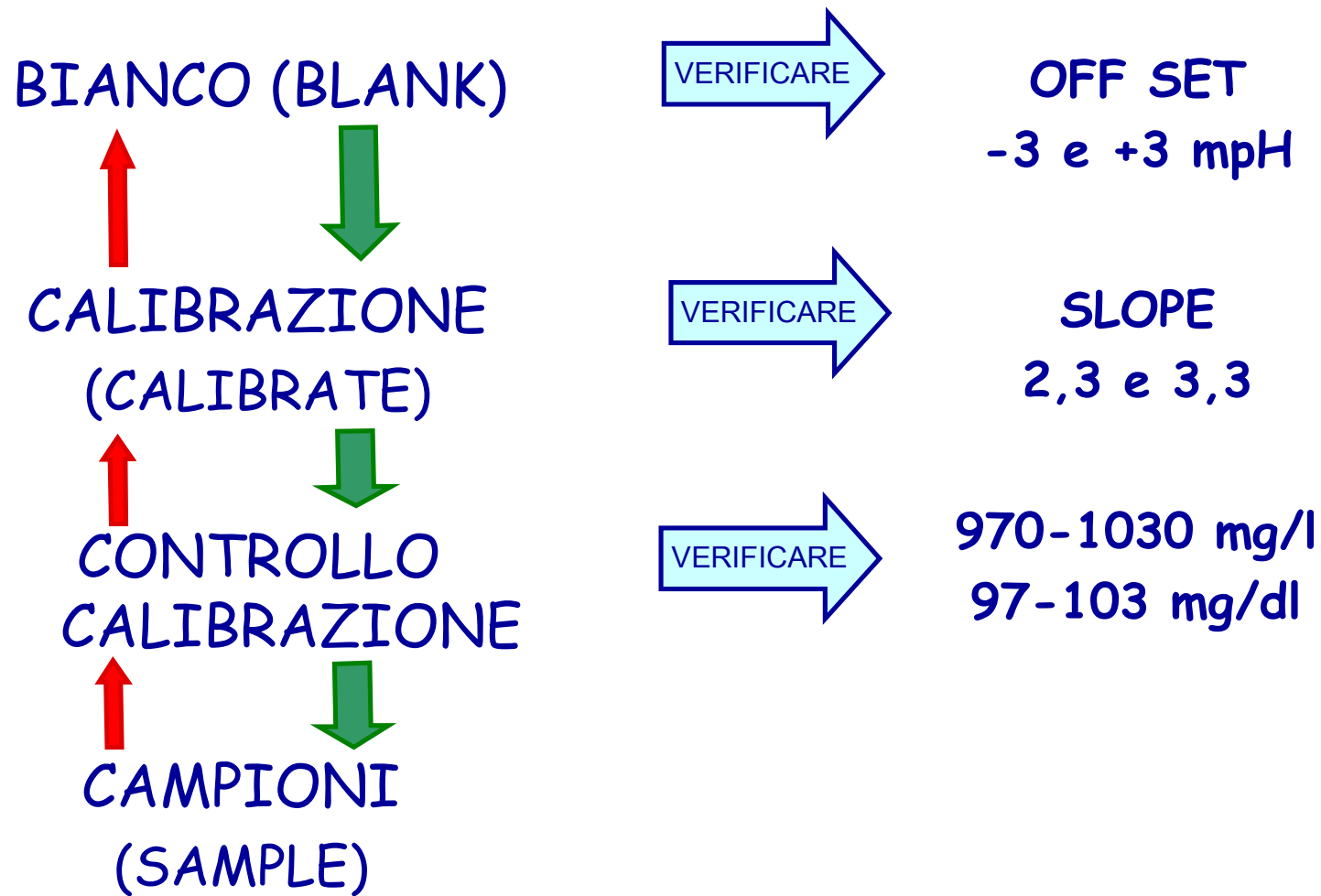


Urea: pHmetria differenziale





CL10 PLUS



Antonella Nardoni

Direzione Operativa Produzioni Zootecniche



HO TERMINATO ..

Per la vostra felicità



Le foto sono di Fiorentino Stravino
I bit strips di Lorenza Dionisi
LDRWM di Nicola Bottalico





RITORNERO

