

Sensori Ottici in Fisica-Medica

(la luce al servizio della medicina: i sensori ottici a fianco del letto del paziente)

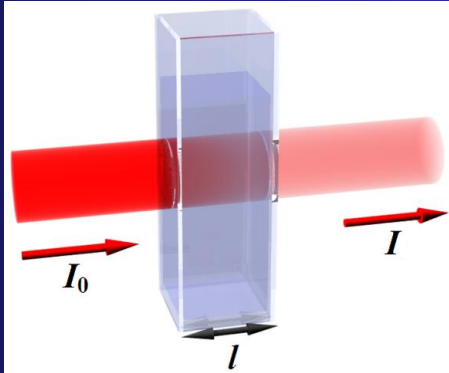
Francesco Baldini

Istituto di Fisica Applicata -CNR

Sesto Fiorentino, Firenze

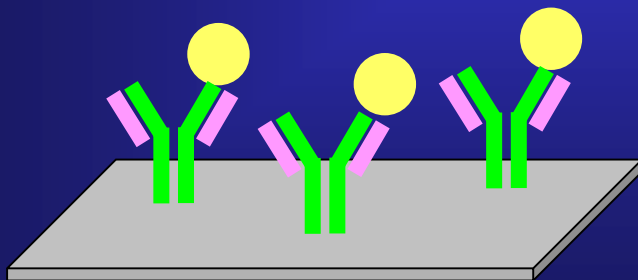
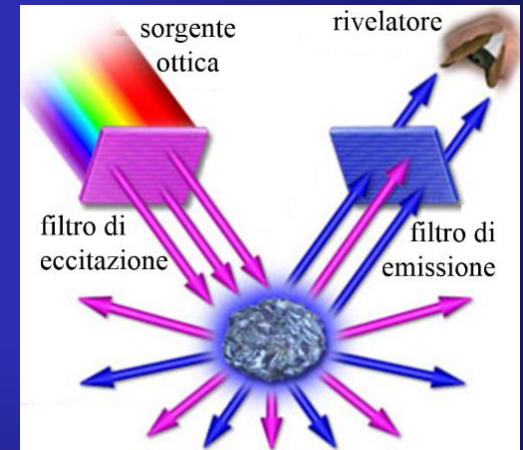
Sensori ottici per parametri chimici e biochimici

alcuni principi di funzionamento



assorbimento

fluorescenza



rifrattometria

supporto "ottico"

ASSORBIMENTO

- molecole caratterizzate da specifiche bande di assorbimento
- reagenti con proprietà ottiche che interagiscono con la molecola analizzata

$$A_{\lambda} = \log_{10} \frac{I_{0\lambda}}{I_{\lambda}} = \varepsilon_{\lambda} l c$$

l = cammino ottico

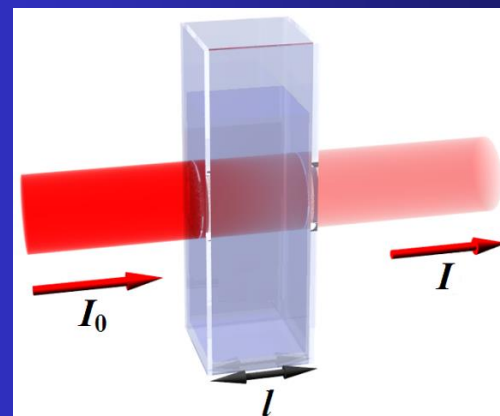
c = concentrazione

ε = coefficiente di estinzione (coefficiente di assorbimento molare)

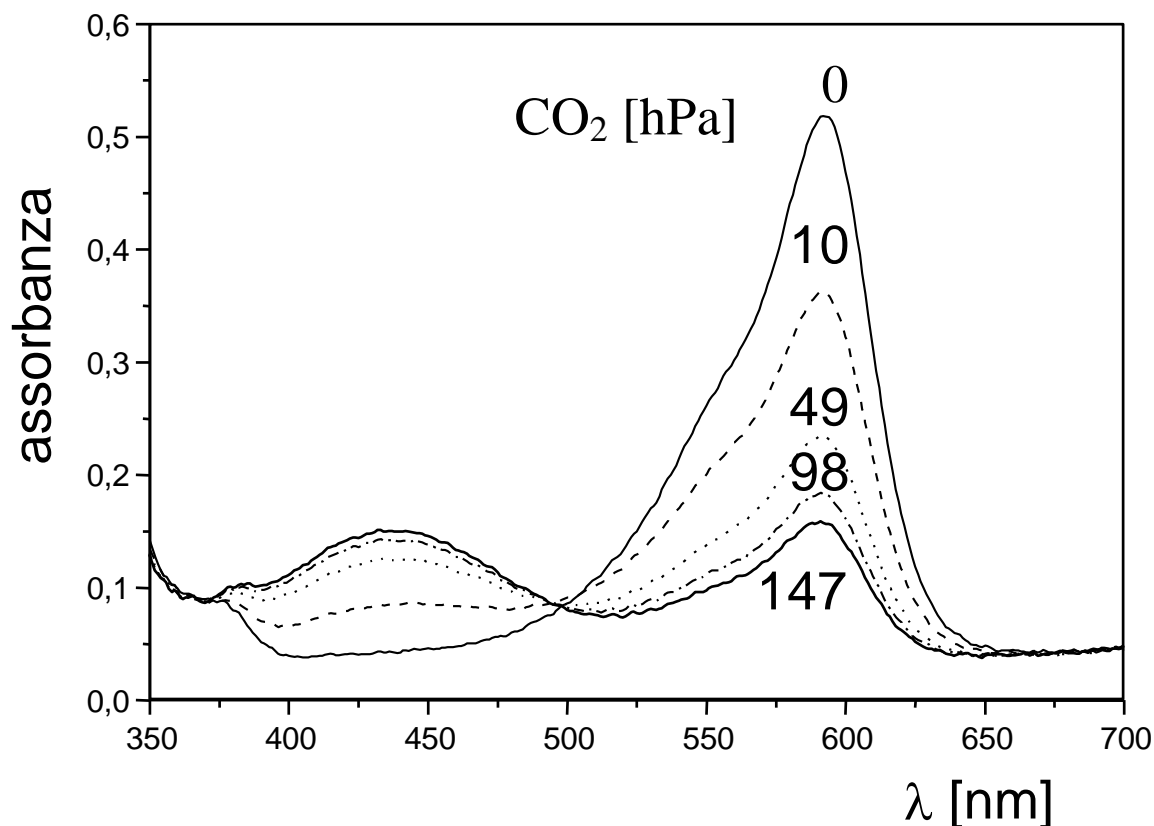
λ = lunghezza d'onda

in presenza di più specie assorbenti

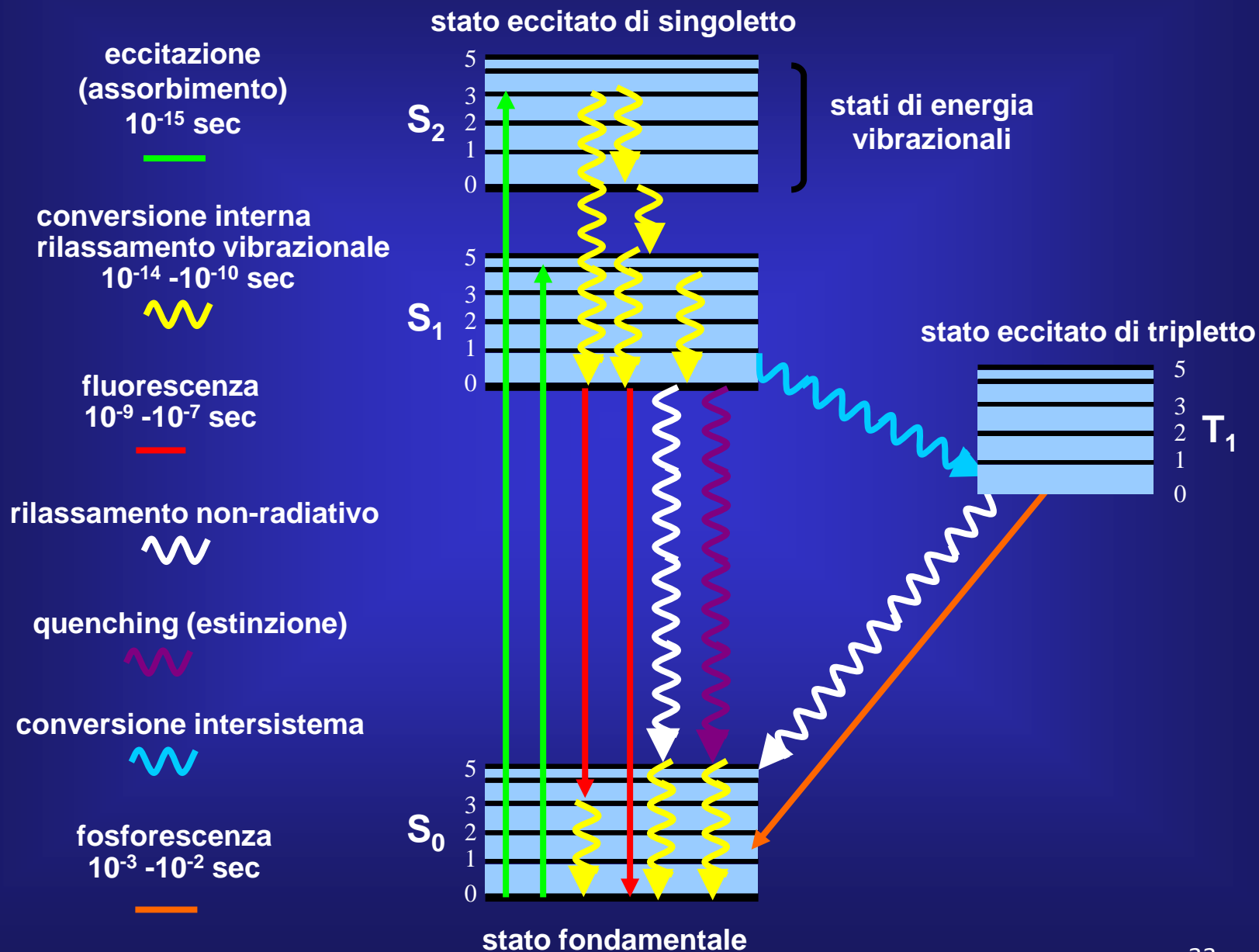
$$A = l \cdot \sum_i \varepsilon_i c_i$$



Spettri di assorbimento di uno strato sensibile per la rivelazione di CO₂



La fluorescenza (luminescenza) deriva dal decadimento di stati elettronici eccitati diagramma di energia di una molecola



Transizione	Fenomeno	Scala temporale (sec)
$S(0) \longrightarrow S(1) \text{ o } S(n)$	assorbimento	10^{-15}
$S(n) \longrightarrow S(1)$	conversione interna	10^{-14} to 10^{-10}
$S(1) \longrightarrow S(1)$	rilassamento vibrazionale	10^{-12} to 10^{-10}
$S(1) \longrightarrow S(0)$	fluorescenza	10^{-9} to 10^{-7}
$S(1) \longrightarrow T(1)$	conversione intersistema	10^{-10} to 10^{-8}
$S(1) \longrightarrow S(0)$	rilassamento non-radiativo quenching	10^{-7} to 10^{-5}
$T(1) \longrightarrow S(0)$	fosforescenza	10^{-3} to 100
$T(1) \longrightarrow S(0)$	rilassamento non-radiativo quenching	10^{-3} to 100

Fluorescenza e sensori ottici



importanti parametri in luminescenza

Coefficiente di estinzione (coefficiente di assorbimento molare) ε

$$A_{\lambda} = \log_{10} \frac{I_{0\lambda}}{I_{\lambda}} = \varepsilon_{\lambda} l c$$

$$[\varepsilon] = \text{litri moli}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Efficienza quantica

Rapporto fra il numero dei fotoni emessi e il numero dei fotoni assorbiti

Tempo di vita di fluorescenza

Tempo caratteristico della molecola che rimane nello stato eccitato prima di tornare allo stato fondamentale

Energia: funzione della lunghezza d'onda e della frequenza

$$E = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

- spettro di emissione indipendente dalla energia di eccitazione
- fotoni emessi caratterizzati da una energia minore di quella dei fotoni assorbiti e da una lunghezza d'onda maggiore (Stokes shift)

Campione misurato

- fluorescente
- interagente con un fluoroforo
- marcato con un fluoroforo

Legge di Parker

$$I(\lambda_{em}) = k \cdot I(\lambda_{exc}) \cdot \Phi \cdot \varepsilon \cdot l \cdot c$$

$I(\lambda_{em})$ = intensità di emissione

$I(\lambda_{exc})$ = intensità di eccitazione

Φ = efficienza quantica

ε = coefficiente di estinzione

l = cammino ottico

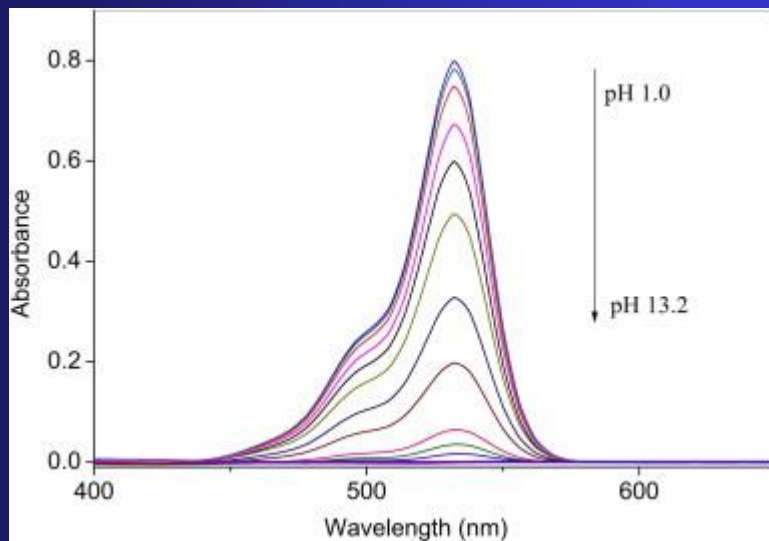
c = concentrazione

k = costante

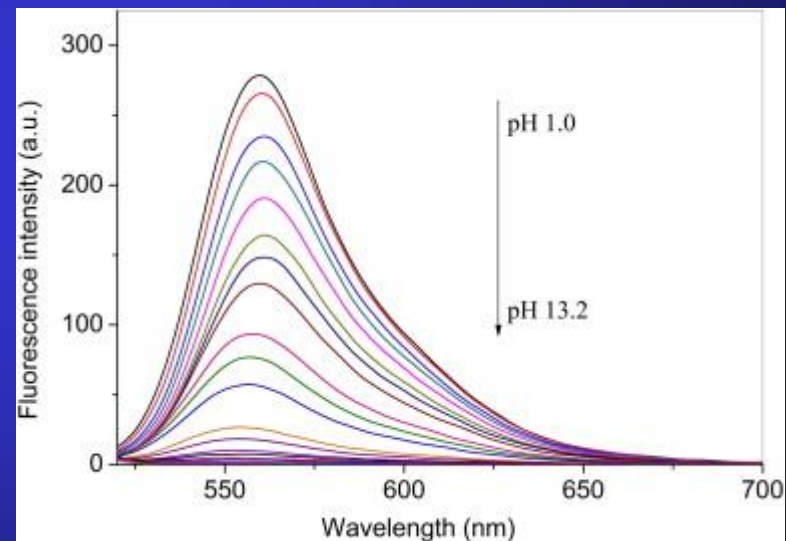
Interazione con un fluoroforo

misura di pH →

misura della concentrazione degli ioni idrogeno



spettri di assorbimento



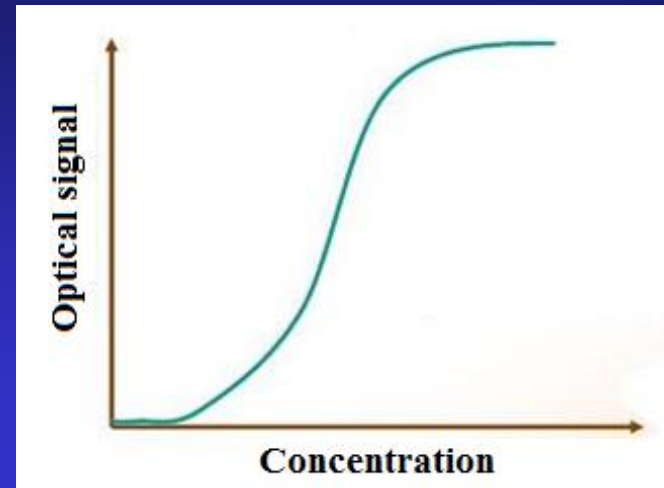
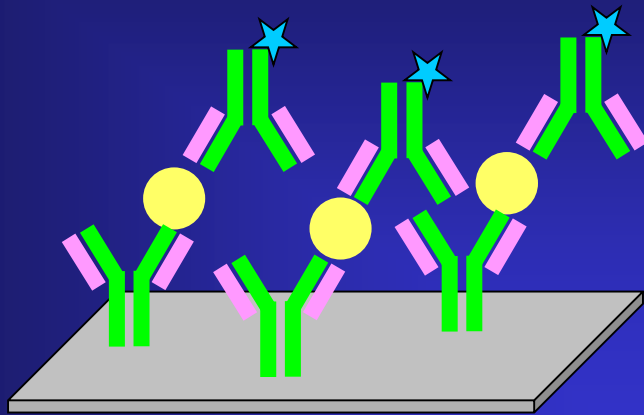
spettri di emissione

Marcatura con un fluoroforo

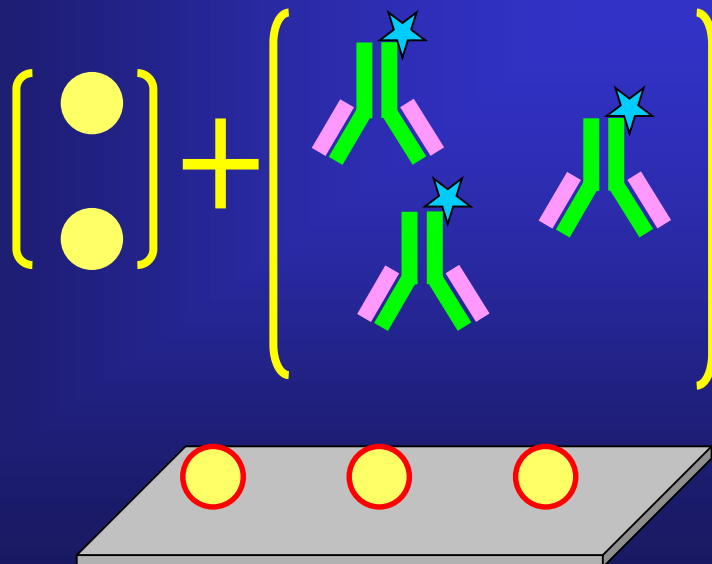
Elemento essenziale per un biosensore è l'elemento di riconoscimento molecolare in grado di interagire in maniera selettiva con l'analita da determinare

- anticorpo
- sequenza oligonucleotidica
- aptamero

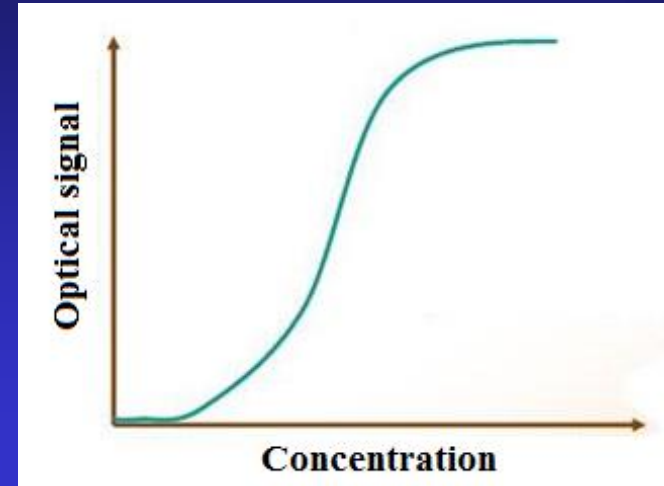
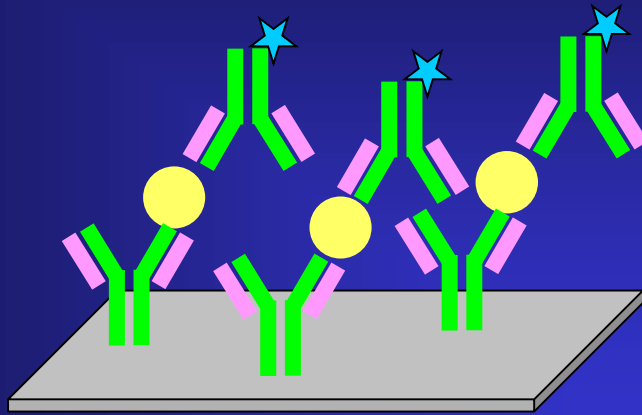
saggio di tipo sandwich



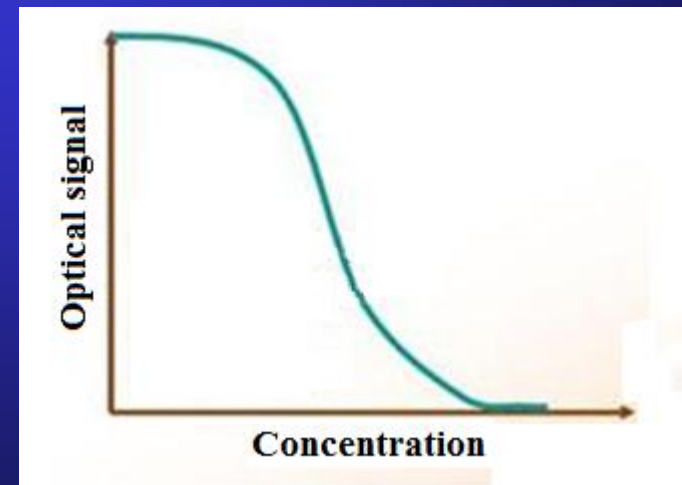
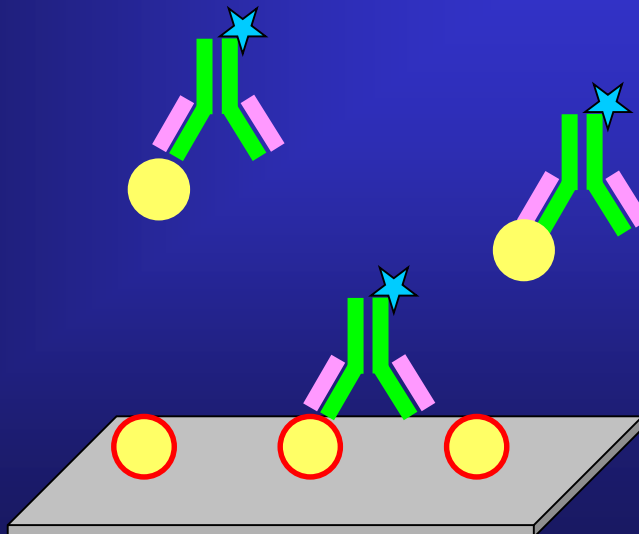
saggio di tipo competitivo



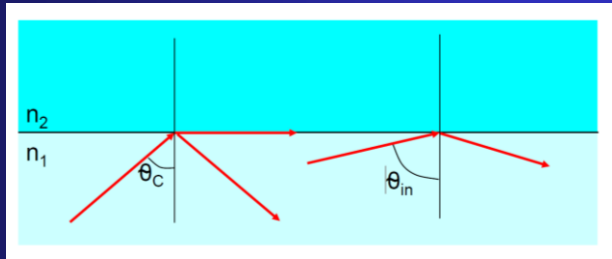
saggio di tipo sandwich



saggio di tipo competitivo



Sensori rifrattometrici

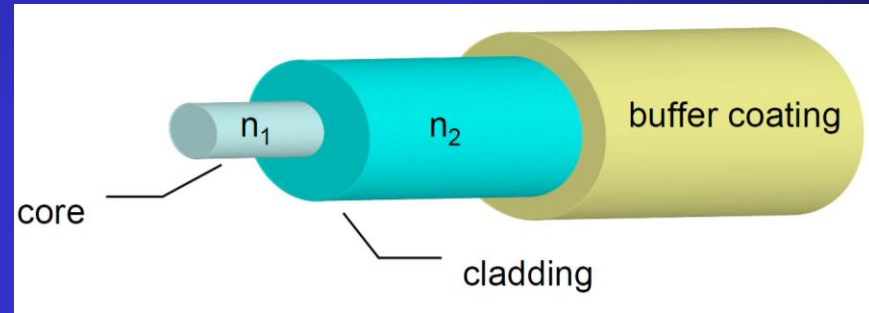


$\theta_{in} > \theta_c =$ riflessione totale

θ_{in} = angolo di incidenza

θ_c = angolo di riflessione totale

$\theta_c = \arcsin (n_2/n_1)$



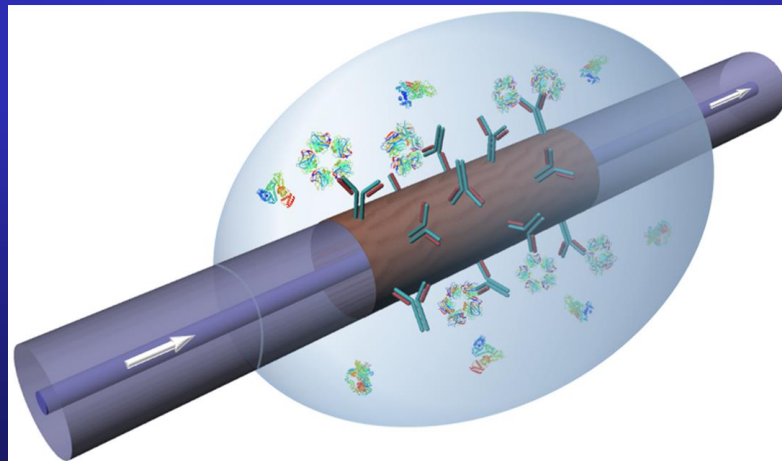
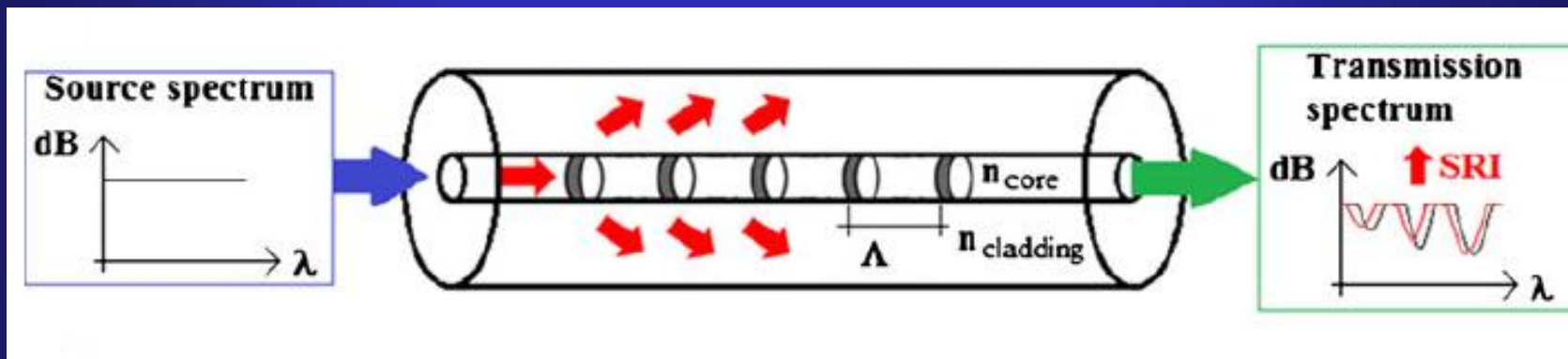
fibra ottica

dispositivo a simmetria cilindrica in grado di trasmettere la luce

Sensori rifrattometrici

Reticoli in fibra ottica a passo lungo (LPG) ($\Lambda = 100 - 700 \mu\text{m}$)

$$\lambda_{\text{res}(m)} = (n_{\text{eff,core}} - n_{\text{eff,clad}(m)}) \Lambda$$



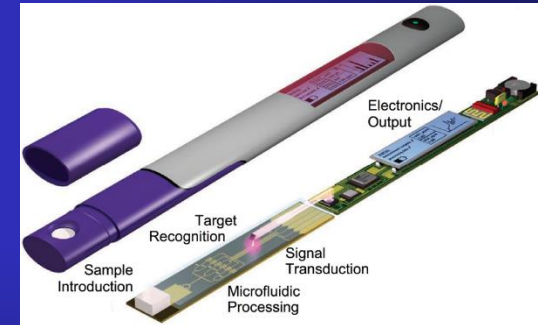
i sensori ottici a fianco del letto del paziente

Richiesta pressante da parte dei medici di dispositivi in grado di fornire risposte in termini rapidi vicino al letto del paziente per tutte quelle patologie per le quali è necessario formulare velocemente una corretta diagnosi e allo stesso tempo decidere la terapia più adatta



Dispositivi “Point of Care Testing”

- In ospedale
- Presso il medico di famiglia
- A casa



I biosensori ottici giocano un ruolo fondamentale nella determinazione della concentrazione dei cosiddetti biomarcatori, analiti che vengono prodotti in eccesso in presenza di determinate patologie.

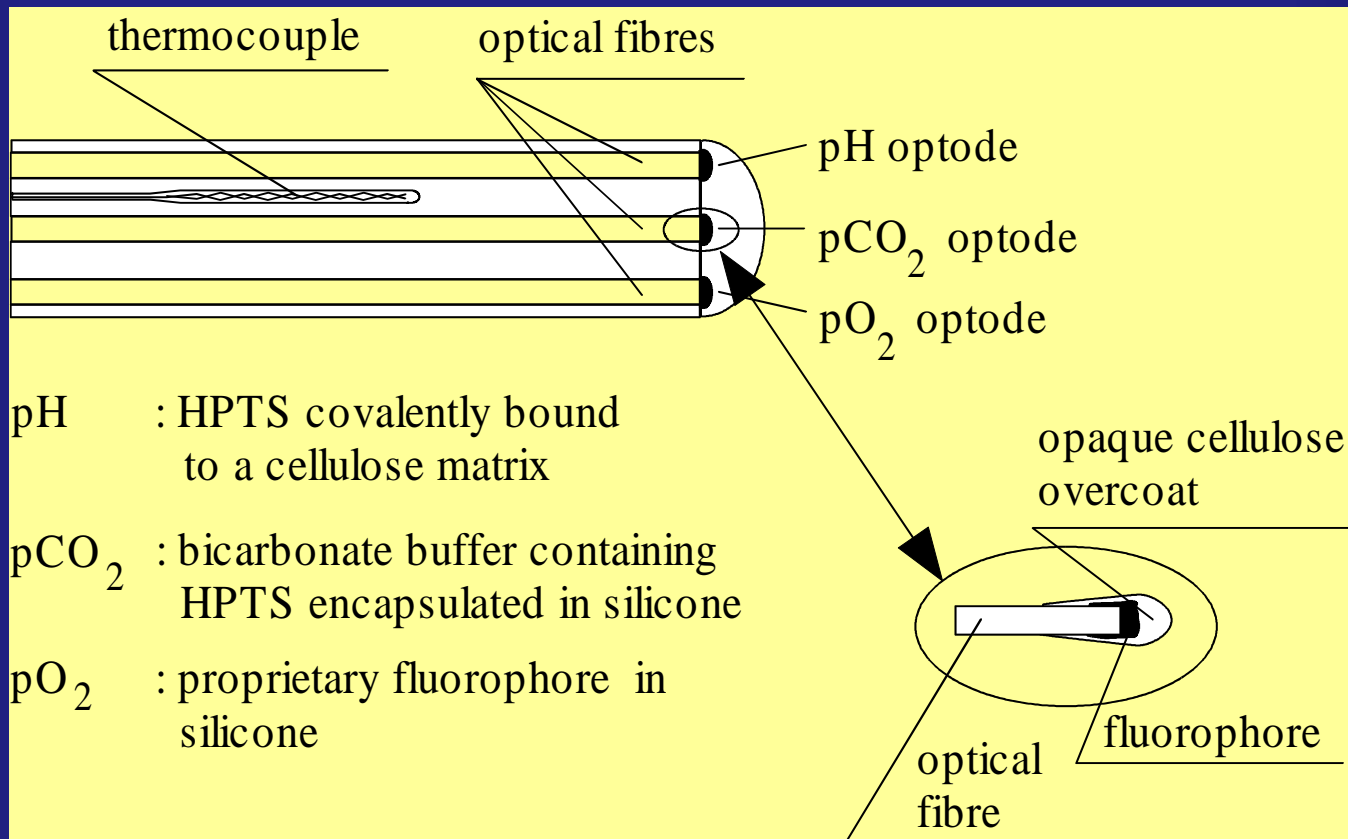
Sensori ottici nella diagnostica clinica

- Sensori invasivi, tramite l'utilizzo di fibre ottiche in grado di entrare all'interno del corpo umano
- Sensori minimamente invasivi, dove l'interazione con il corpo umano è minimizzata
- Sensori non invasivi, che utilizzano campioni biologici prelevati dal paziente

Sensori ottici nella diagnostica clinica

- **Sensori invasivi, tramite l'utilizzo di fibre ottiche in grado di entrare all'interno del corpo umano**
- Sensori minimamente invasivi, dove l'interazione con il corpo umano è minimizzata
- Sensori non invasivi, che utilizzano campioni biologici prelevati dal paziente

Primo sensore intravascolare (1986)



Miller W.W., Yafuso M., Yan C., Hui H.K., Arick S., *Clin. Chem.* 1987; 33: 1538

Gehrich J.L., Lübbers D.W., Opitz N., Hansmann D.R., Miller W.W., Tusa J.K., Yafuso M., *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1986; 33: 117.

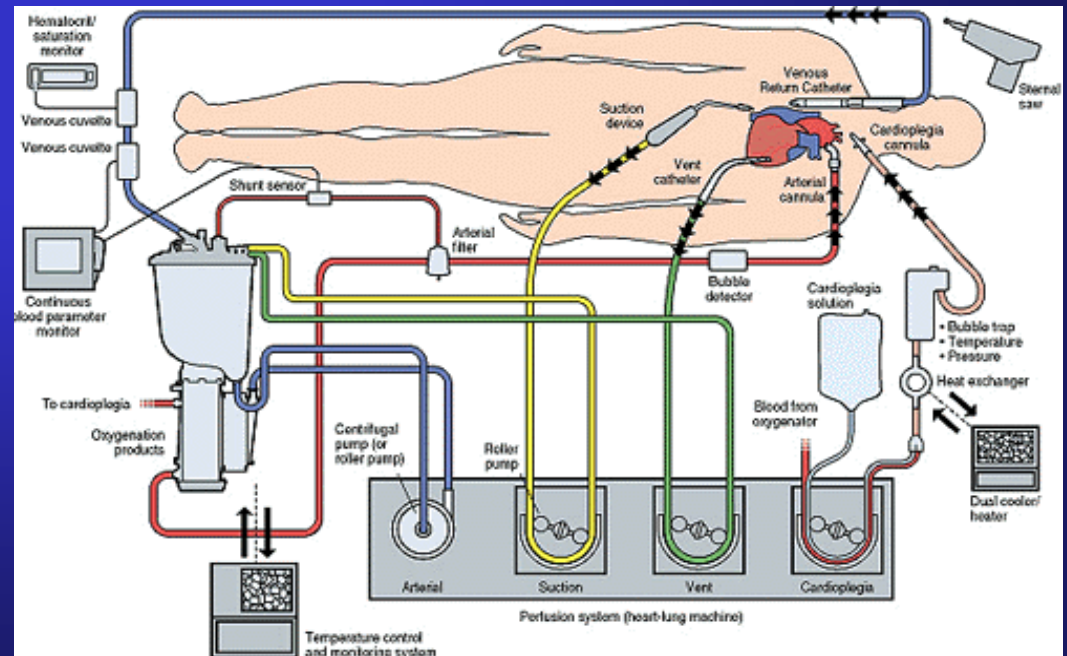
pH, pO₂ e pCO₂: perché?

Il monitoraggio in tempo reale è di fondamentale importanza in sale operatorie e unità di terapia intensiva per determinare la quantità di ossigeno erogata ai tessuti e la qualità della perfusione

Cardiologia

Alla fine degli anni Novanta, in Europa, più di 200.000 interventi chirurgici a cuore aperto all'anno

il 15% necessita di un monitoraggio continuo di pH, pO₂ and pCO₂

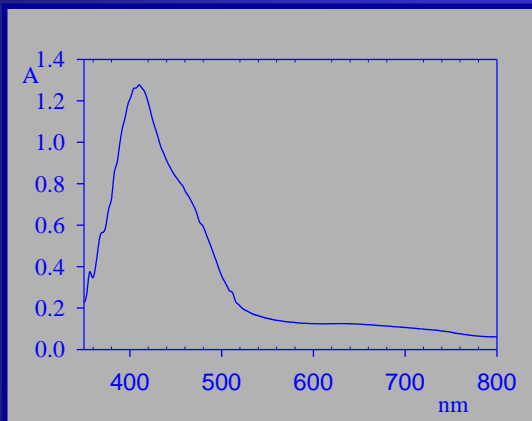
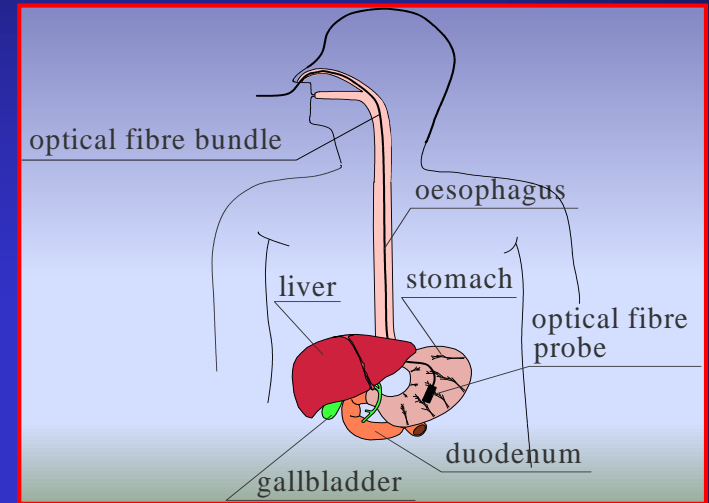


Sensore di reflusso biliare

Reflusso del contenuto duodenale nello stomaco e nell'esofago

- reflusso duodenogastrico
- reflusso duodenogastroesofageo

ulcera gastrica, gastrite chimica, aumentato rischio di cancro, esofagite grave



spettro di assorbimento della bile

bilirubina: pigmento biliare principale con un assorbimento ben definito nella regione blu

Sensore di reflusso biliare

BILITEC 2000, prodotto da Cecchi srl, distribuito da Medtronic fino al 2007 e attualmente da EBNeuro



Stretta correlazione fra la presenza di reflusso contenente bile e alcune patologie dell'apparato gastro-esofageo (esofagiti, esofago di Barrett)

Misura della CO₂ nello stomaco

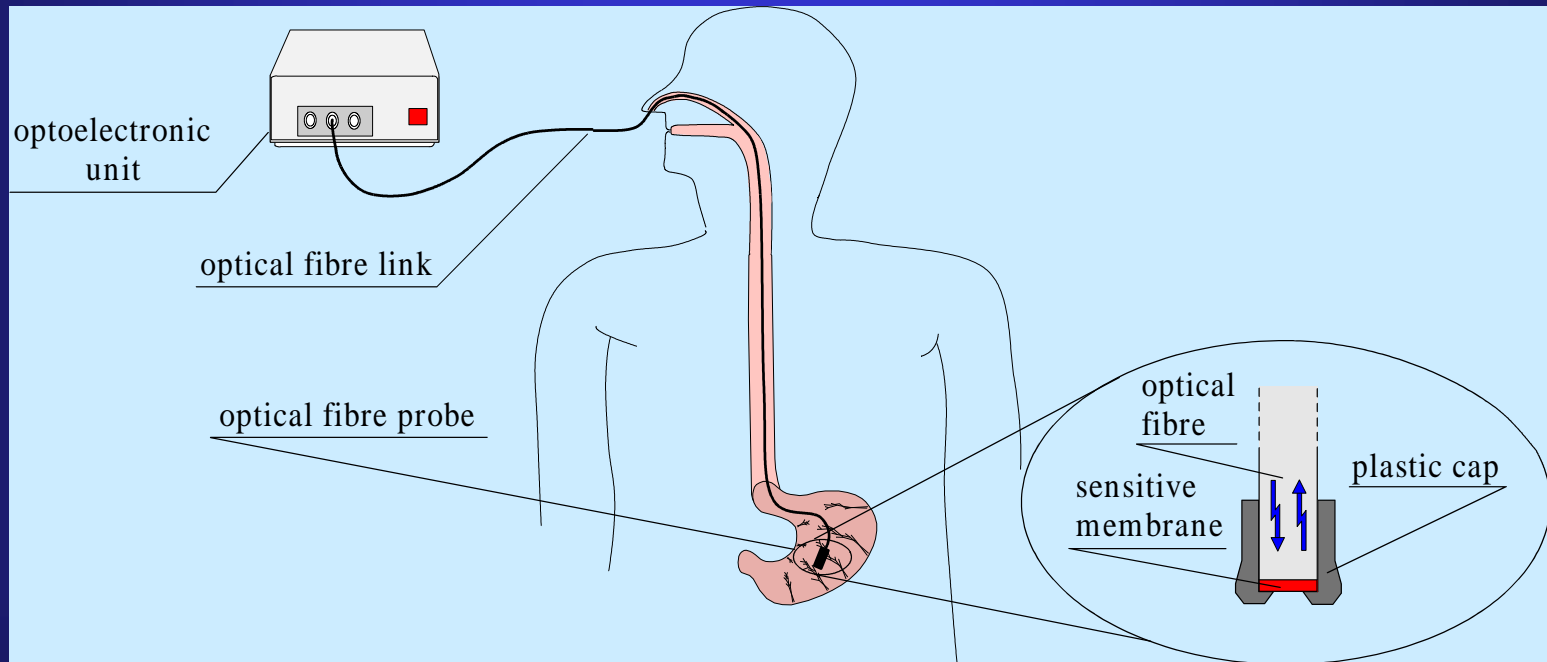
persone sane: CO₂ gastrica = CO₂ nel sangue

alterata perfusione della regione gastro-intestinale (e.g. shock emorragico)



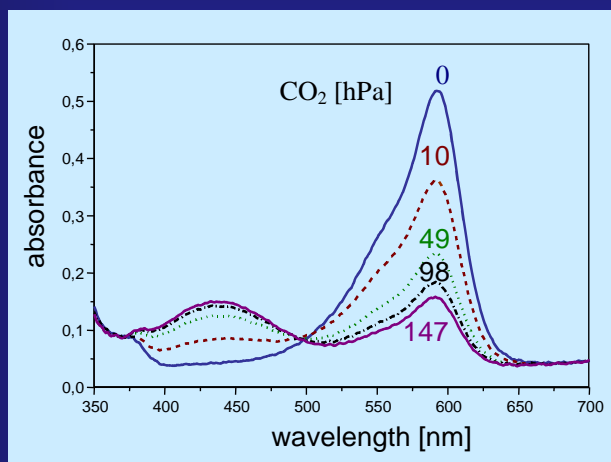
aumento della CO₂ gastrica

monitoraggio continuo importante in pazienti in terapia intensiva



il sensore ottico

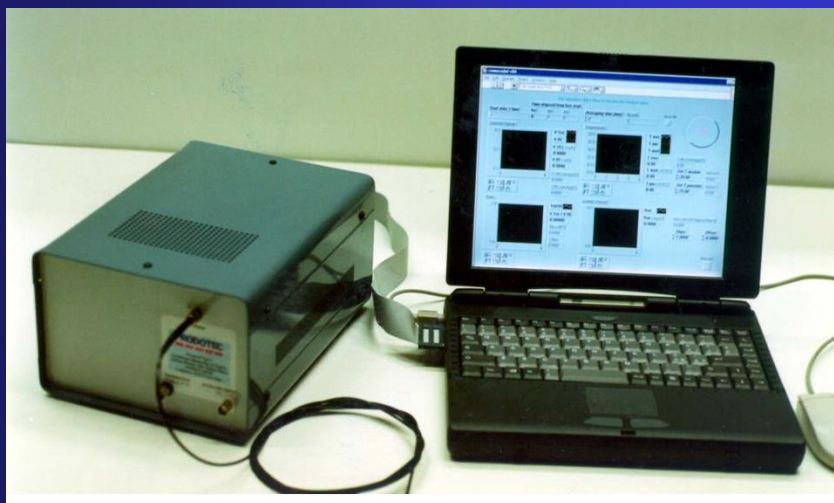
trasduttore ottico: coppia ionica (indicatore/ione ammonio quaternario) in etilcellulosa



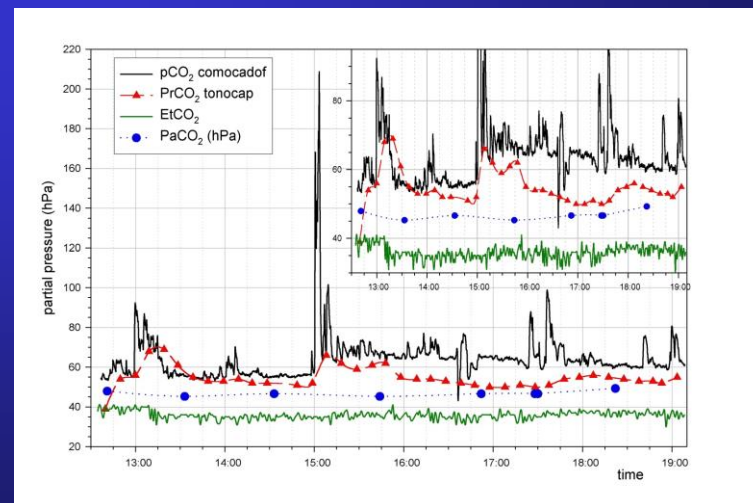
spettri di assorbimento



la sonda ottica



l'unità optoelettronica

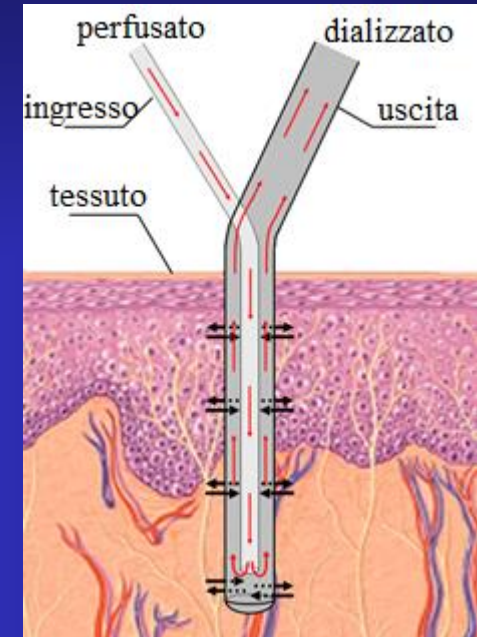
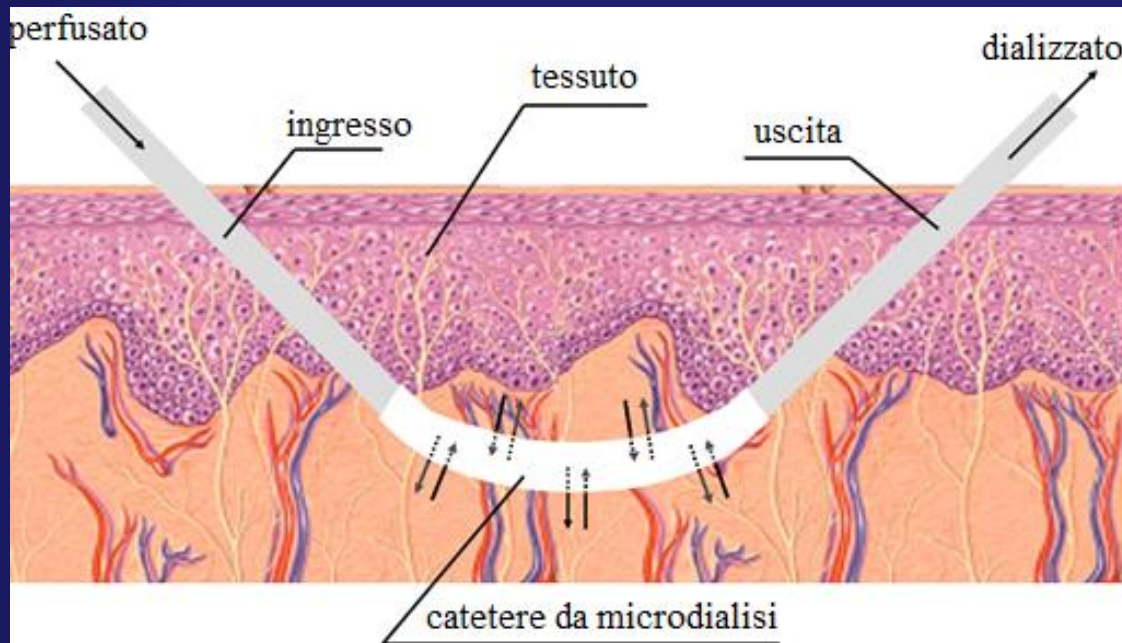


misura in terapia intensiva

Sensori ottici nella diagnostica clinica

- Sensori invasivi, tramite l'utilizzo di fibre ottiche in grado di entrare all'interno del corpo umano
- **Sensori minimamente invasivi, dove l'interazione con il corpo umano è minimizzata**
- Sensori non invasivi, che utilizzano campioni biologici prelevati dal paziente

Microdialisi



La microdialisi rappresenta un approccio alternativo al prelievo di sangue:

- meno invasivo
- nessuna perdita di sangue
- meno doloroso

parametri importanti

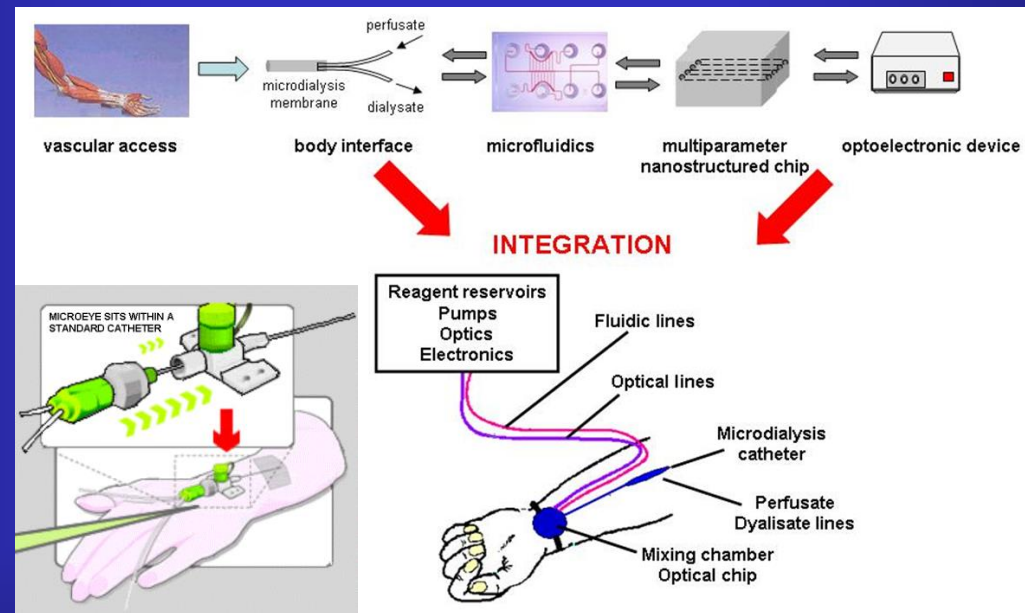
- velocità di flusso ($\mu\text{L}/\text{min}$)
- cut-off della membrana da dialisi (il più alto ~ 100 kDal)
- tasso di recupero (pH 100%, glucosio 80%, citochine 5-30 %)

Il tessuto adiposo è stato proposto all'inizio del 2000 come un promettente punto per la misura continua o estremamente frequente di parametri di interesse clinico

Novità recente: catetere da microdialisi intravascolare

Medicina personalizzata: monitoraggio terapeutico di farmaci in pazienti trapiantati

Biomarcatori: immunosoppressori come ciclosporina A, tacrolimus, acido micofenolico



Progetto Europeo NANODEM

*NAN*Optonic *DE*vice for Multiple therapeutic drug monitoring (2012-2016)

Limiti di rivelazione richiesti per il saggio biologico

immunosoppressore	Limite di rivelazione nel sangue (LoD)
tacrolimus	0.5 ng / mL
acido micofenolico	200 ng / mL
ciclosporina A	20 ng/mL

- Bisogna considerare:
- la frazione libera dei farmaci dissolta nel sangue
 - il tasso di recupero del catetere da microdialisi
 - la diluizione del dializzato con i tamponi contenenti i reagenti

immunosoppressore	Frazione libera	LoD (ng/mL)	Tasso di recupero	LoD (ng/mL)	Diluizione	LoD richiesto (ng/mL)
tacrolimus	1%	0.005	30%	0.0015	1:1	0.0007
acido micofenolico	3-17%	6-34	27.6%	1.65-9.4	1:1	0.82-4.7
ciclosporina A	3-10%	0.6-2	6.5%	0.039-0.13	1:1	0.019-0.065

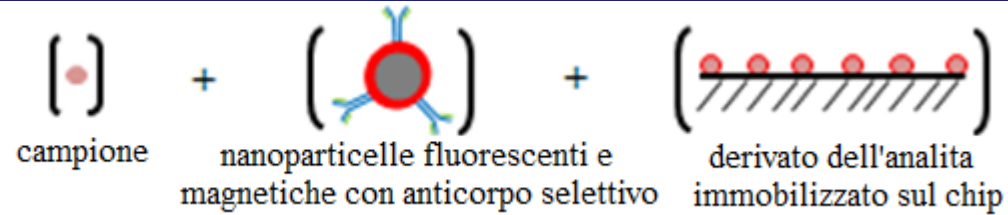
Necessità di strategie per l'amplificazione del segnale



Concentrazione dell'analita vicino allo strato sensibile mediante l'uso di nanoparticelle magnetiche

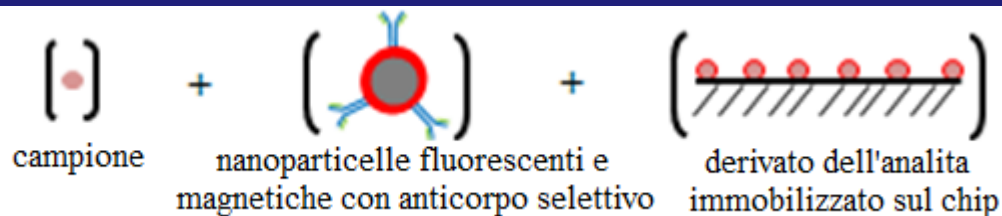
come funziona il saggio biologico

saggio competitivo



come funziona il saggio biologico

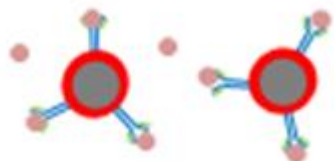
saggio competitivo



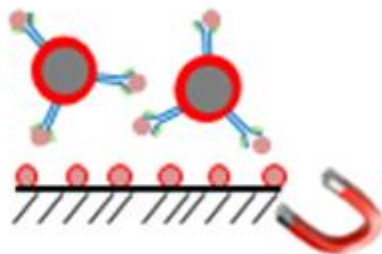
alta concentrazione
di analita



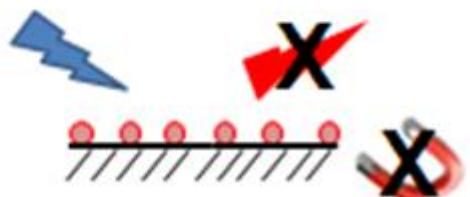
incubazione
fuori del chip



preconcentrazione
magnetica
vicino allo
strato sensibile



lavaggio



nessun segnale/basso segnale fluorescente

Sensori minimamente invasivi



il chip ottico di misura

Immuno-suppressant	Targeted limit of detection (LOD)	Achieved LODs
cyclosporin A	0.125 ng/ml	0.22 ng/ml
Tacrolimus	0.019 ng/ml	1.20 ng/mL
mycophenolic acid	2.500 ng/ml	0.19 ng/ml



il dispositivo point of care

Studio di ricerca clinico presso il TUM di Monaco di Baviera

Studio di ricerca prospettico monocentrico per studiare la frazione libera di immunosoppressori nei pazienti dopo il trapianto di rene utilizzando la microdialisi intravascolare

Sensori ottici nella diagnostica clinica

- Sensori invasivi, tramite l'utilizzo di fibre ottiche in grado di entrare all'interno del corpo umano
- Sensori minimamente invasivi, dove l'interazione con il corpo umano è minimizzata
- **Sensori non invasivi, che utilizzano campioni biologici prelevati dal paziente**

Sepsi

La sepsi, o setticemia, è una complicazione potenzialmente letale di un'infezione che si verifica quando le sostanze chimiche che entrano in circolo per combattere l'infezione scatenano un'inflammatione diffusa in tutto l'organismo. Rappresenta la causa più alta di mortalità in pazienti in terapia intensiva ed è stata fino a 10-15 anni fa estremamente sottovalutata.

E' importante riuscire a determinare se la sepsi è di tipo virale o batterico in quanto questo aspetto è strettamente legato al tipo di terapia da somministrare.

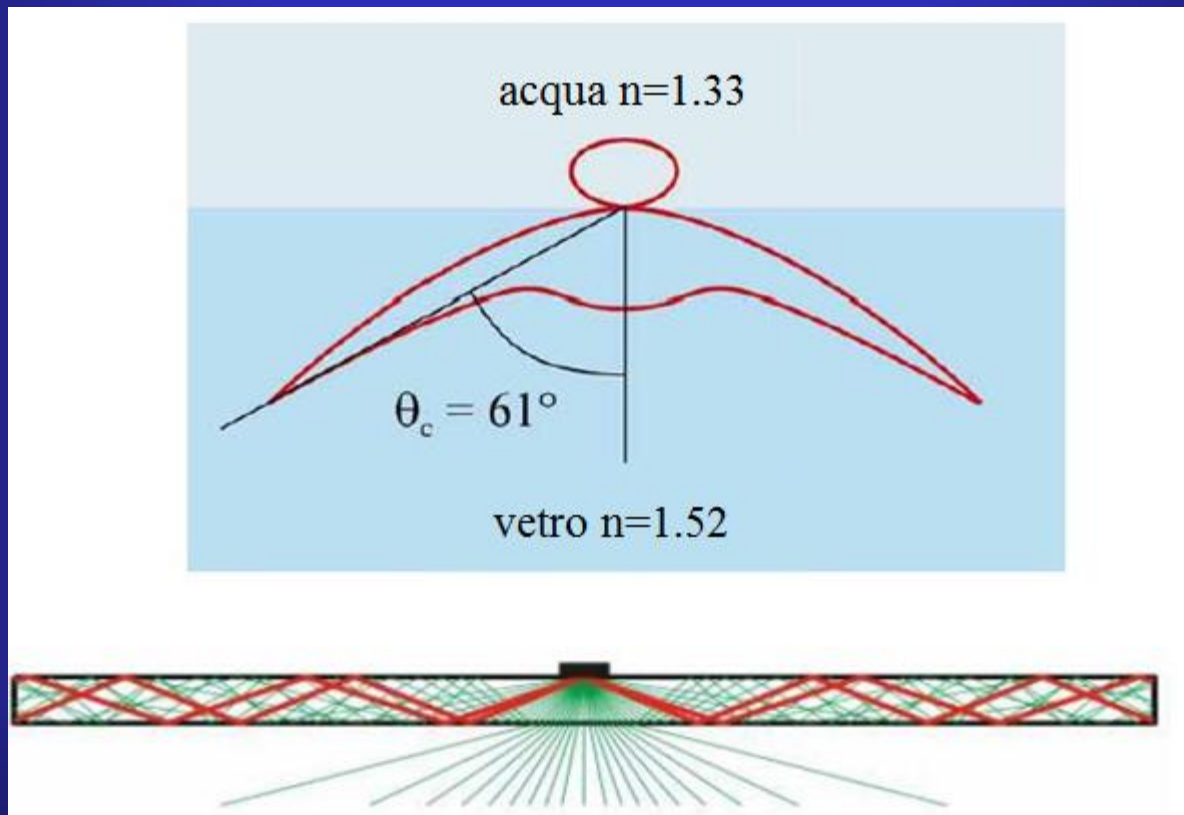
I biosensori possono offrire un importante aiuto per una rapida identificazione delle origini della sepsi.

Ogni ora di ritardo nella somministrazione di una efficace e corretta terapia antibiotica aumenta nei pazienti in terapia intensive la mortalità del 7%

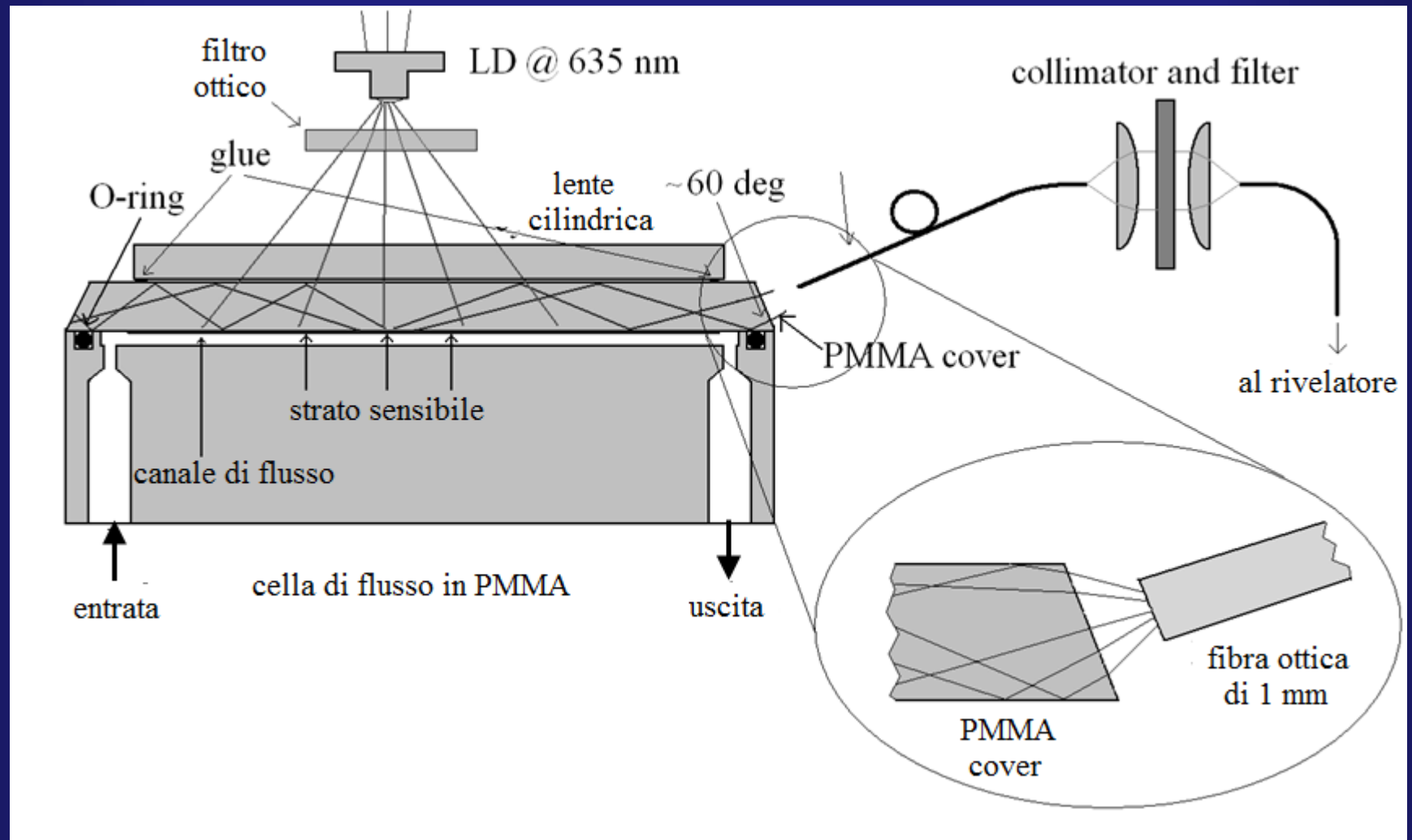
Biomarcatori: proteina C reattiva, procalcitonina, neopterinina, interleuchina 6, suPAR

Piattaforma ottica basata sull'anisotropia di fluorescenza

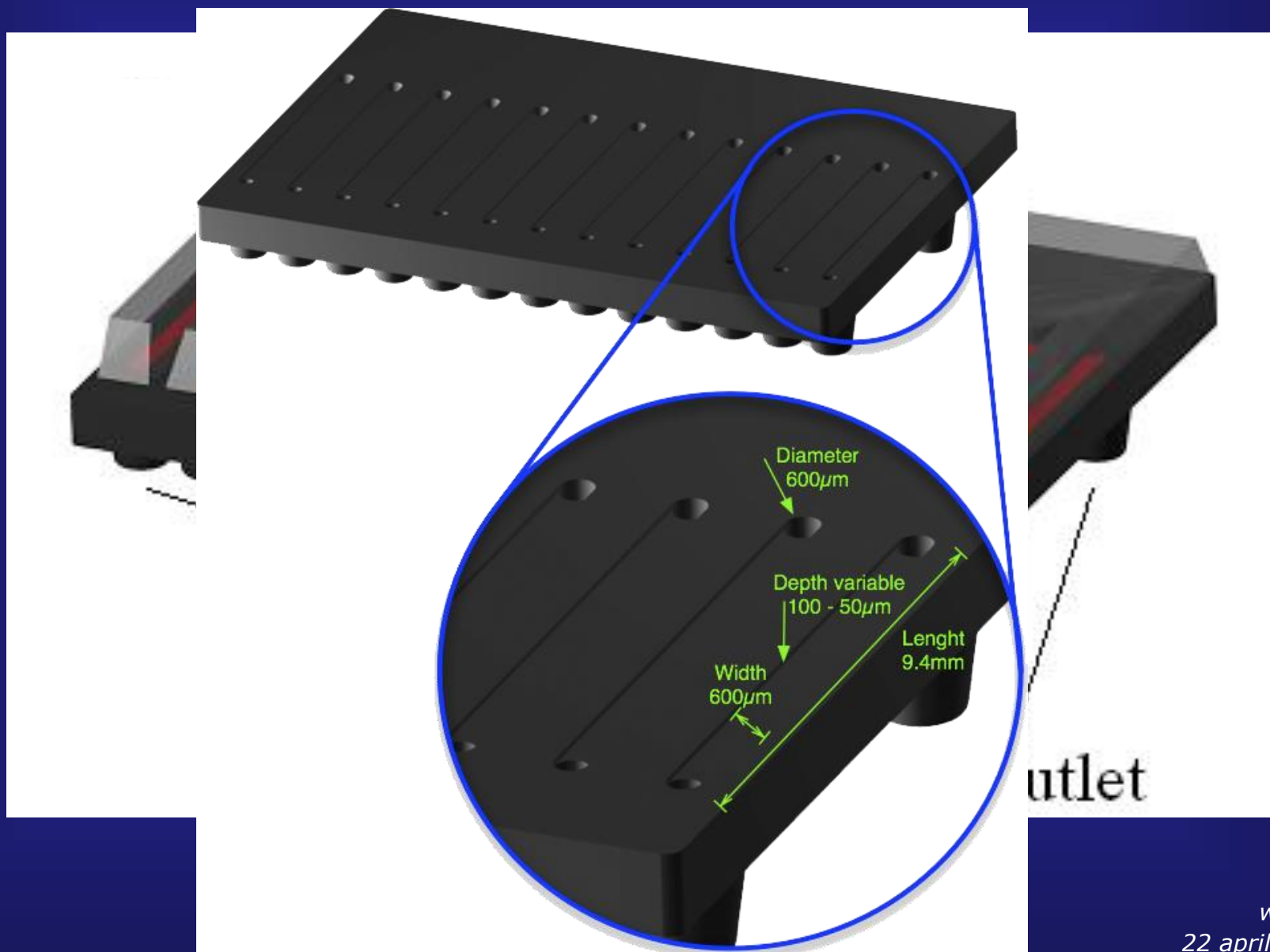
Un fluoroforo non emette fluorescenza in maniera isotropa quando si trova ad una distanza da un'interfaccia dielettrica dell'ordine o più piccola della lunghezza d'onda di emissione



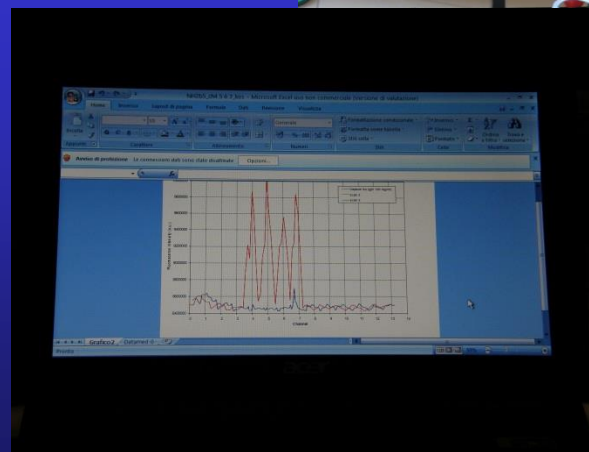
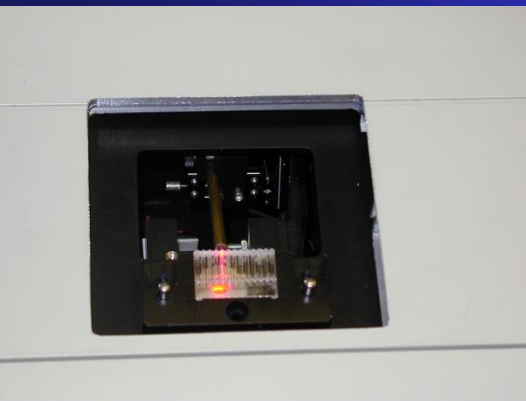
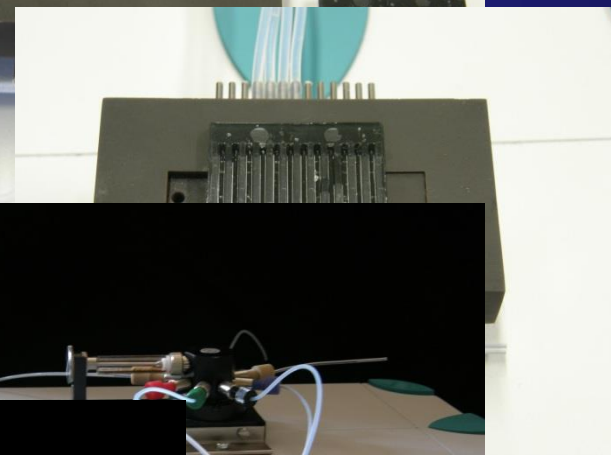
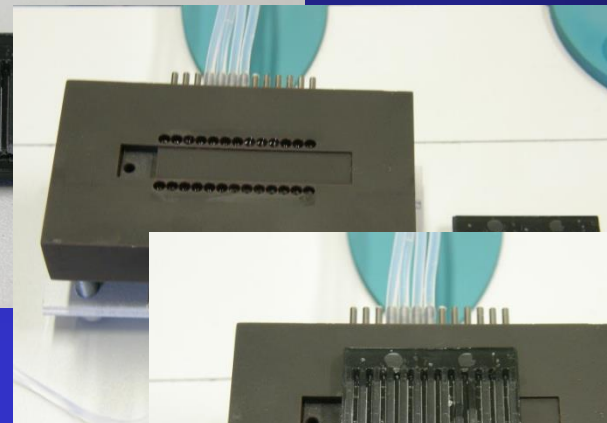
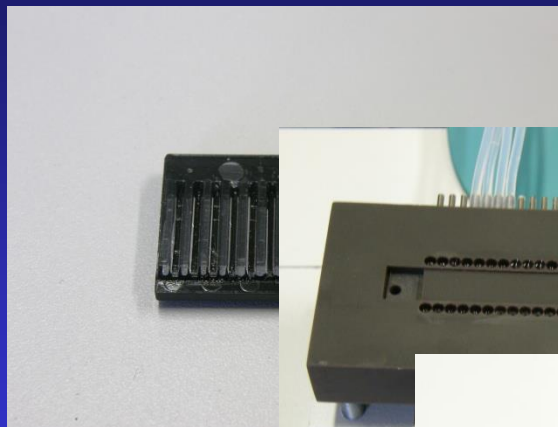
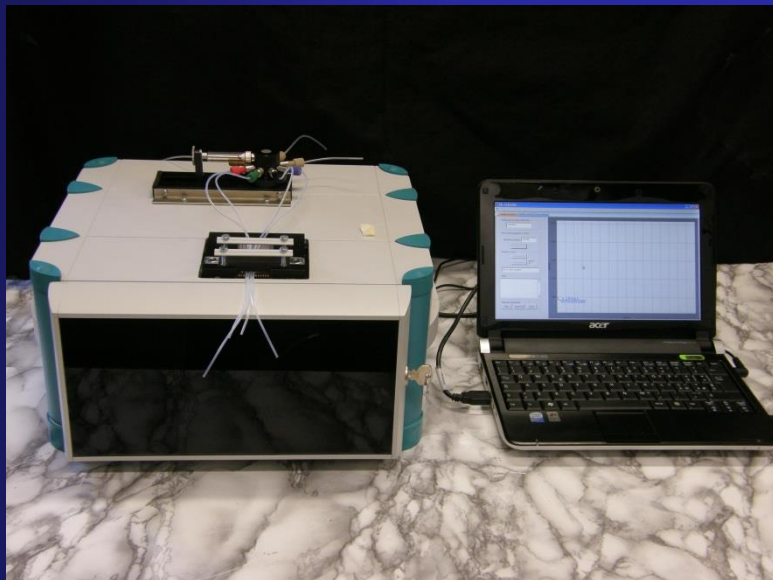
Il chip ottico basato sulla anisotropia di fluorescenza



Chip ottico prodotto mediante stampo con tredici canali



Prototipo portatile



Conclusioni

Sensori ottici vicino al letto del paziente

- *Sensori invasivi*
fibre ottiche offrono prestazioni uniche
- *Sensori minimamente invasivi*
ottica combinata con la microdialisi – il nuovo catetere intravascolare può aprire nuovi orizzonti
- *Sensori non invasivi*
biochip ottici: mercato in continua crescita negli ultimi anni

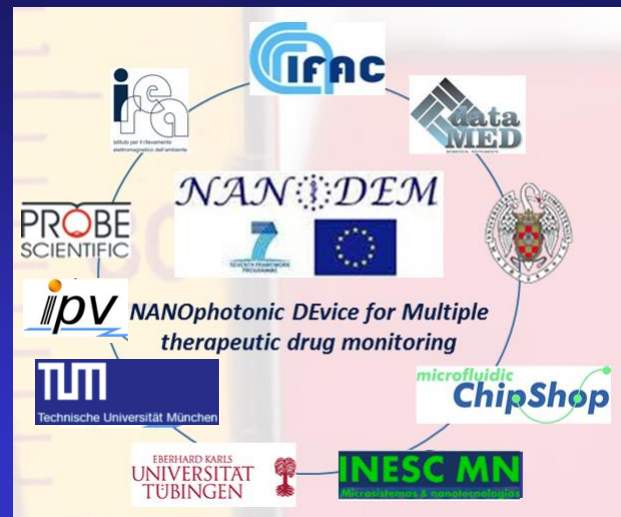
- Sensori disponibili sul mercato: POCHI
- Prototipi da laboratorio non trasferiti sul mercato: TANTI



Coordinato da Joanneum Research (Graz, Austria)



Coordinato da EKUT (Tübingen, Germany)



Coordinato da IFAC-CNR (Firenze, Italy)



Coordinated da IPHT (Jena, Germany)



OPTIMO
Coordinato da IFAC-CNR (Firenze, Italy)





Francesco Baldini



Ambra Giannetti



Cosimo Trono



Sara Tombelli



Simone Berneschi



Francesco Chiavaioli



Barbara Adinolfi