

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TERAMO
CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN MEDICINA VETERINARIA

IV ANNO

C.I. “SEMEIOTICA, PATOLOGIA E DIAGNOSTICA MEDICA VETERINARIA”
(14 CFU)

MODULO: BASI DI DIAGNOSTICA DI LABORATORIO

2 CFU - 14 ORE

(10 ORE DI LEZIONE FRONTALE E 4 ORE DI LEZIONE PRATICA)

DOCENTE: ROBERTO GIACOMINELLI STUFFLER

OBIETTIVI DEL MODULO

Si descrive il controllo di qualità di un laboratorio di diagnostica e si analizzano le principali tecniche di biochimica clinica e di biologia molecolare clinica. La biochimica clinica e la biologia molecolare clinica studiano il singolo soggetto malato per raccogliere dati che abbiano valore di prove semeiologiche a favore o contrarie alla diagnosi formulata dal clinico. Lo studente dovrà avere la capacità critica di interpretare i dati derivanti dagli esami laboratoristici, incrociandoli con quelli clinici.

IL LABORATORIO DI DIAGNOSTICA E IL CONTROLLO DI QUALITÀ

Le modalità di raccolta e conservazione dei materiali biologici dopo l'effettuazione del prelievo. Gli anticoagulanti utilizzabili. Le possibili cause di variazioni pre-analitiche. La natura delle variazioni: fisica, chimico-fisica, biochimica. Esempi di conservazione di materiali biologici. La temperatura di conservazione dei campioni biologici. La variabilità analitica; l'attendibilità è determinata da specificati fattori. Il limite di rivelabilità; i limiti fiduciari. La classificazione degli errori di misura. Il coefficiente di variazione. La deviazione percentuale e i limiti accettabili di errore. Il controllo dei metodi impiegati in un laboratorio di diagnostica; la loro classificazione in base all'accuratezza; il coefficiente di correlazione. Come aumentare la specificità di un metodo. La sicurezza della qualità nel laboratorio; il controllo interno di qualità. Le caratteristiche di un campione di controllo. Le carte di controllo della media: provvedimenti per eventuali anomalie. Il metodo della somma cumulativa. Il controllo di qualità esterno. La variabilità biologica e i valori di riferimento. I fattori che influenzano i valori di riferimento: genetico, fisiologico, esogeno. La presentazione dei valori di riferimento. La logica diagnostica per l'individuazione della diagnosi; sensibilità e specificità diagnostica. Test ideale o patognomonico con sensibilità e specificità clinica del 100%.

LA BIOCHIMICA CLINICA

Le misure spettrofotometriche, la legge di Lambert-Beer. Lo spettrofotometro; assorbanza e trasmittanza. Le curve standard. La retta di taratura. I metodi fotometrici; analisi fotometrica diretta e analisi fotometrica indiretta. I metodi immunochimici. Le diverse tipologie di dosaggio immunologico: gli immunodosaggi competitivi (RIA), i dosaggi immunometrici (IRMA, sandwich-ELISA), i dosaggi di immunoassorbimento con enzimi (ELISA diretto e indiretto). Gli isoenzimi. Gli enzimi e la diagnostica clinica: esempi. I metodi di misura dell'attività enzimatica nei fluidi biologici: il sistema di misura a due punti e in continuo. Il test ottico semplice e con indicatore. La proteomica applicata alla diagnostica. Tipi di gel per elettroforesi applicabili alle proteine. Il gel di poliacrilammide: preparazione. La mobilità elettroforetica. L' SDS-PAGE (metodo discontinuo): stacking gel e resolving gel. I metodi di colorazione delle proteine. Il principio del Western Blotting. La isoelettrofocalizzazione (IEF); i suoi impieghi. L'elettroforesi bidimensionale su gel. Perché studiare la proteomica? L'analisi dell'immagine. L'identificazione di una proteina. Il principio della spettrometria di massa. Il principio e gli usi della MALDI-TOF

(desorbimento/ionizzazione laser assistito da matrice); strumentazione. La proteomica Multiplexed (MP).

LA BIOLOGIA MOLECOLARE CLINICA

Gli enzimi di restrizione; enzimi di restrizione di tipo I, II, III, estremità protruding e blunt. Isocaudameri e isoschizomeri. Le tecniche per la diagnosi molecolare: la PCR. La reazione della PCR (polymerase chain reaction) nella diagnostica clinica: i materiali e gli strumenti necessari per l'effettuazione della PCR. La Taq polimerasi. Il principio della PCR, la sua natura esponenziale; verifica dei risultati della PCR; le sue applicazioni (analitica e preparativa). La RT-PCR (Reverse transcriptase-polymerase chain reaction). La Real-Time PCR. Il SYBR Green: il principio. Le sonde specifiche marcate con fluorocromi (Reporter e Quencher). Le sonde fluorogeniche TaqMan. Le sonde fluorogeniche QuantiProbe. Le sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer); fluorocromi donatore e accettore. Le sonde fluorogeniche Molecular Beacons. La strumentazione della Real-Time PCR. L'interpretazione dei risultati; il Reporter normalizzato. Il ciclo soglia; Real-Time PCR multiplex. Le applicazioni della PCR quantitativa. La quantificazione relativa e assoluta. La prevenzione da contaminazioni relative alla PCR: contaminazione da carry-over, contaminazione crociata, contaminazione nella fase di rivelazione.

DOSAGGIO DEL GLUCOSIO NEL SIERO EQUINO (LEZIONE PRATICA)

La determinazione del glucosio è importante principalmente nella determinazione del diabete mellito nel quale i livelli di glucosio nel sangue sono elevati. Altre malattie quali ipertiroidismo, iperpituitarismo, nefriti severe, pancreatiti, asfissia, anestesia, pneumonia, disidratazione e alcuni particolari disordini epatici conducono ugualmente all'iperglicemia. L'obiettivo è quello di fornire allo studente informazioni utili sulla diagnosi di laboratorio basata su studi di laboratorio quali l'esame di campioni clinici come sangue, feci e urine. Tali analisi vengono effettuate mediante tecniche biochimiche.

Modalità di accertamento della preparazione

L'esame verte su una prova orale.

Il voto finale del corso integrato deriva dalla media pesata dei suoi quattro moduli.

Il docente riceve gli studenti tutti i giorni previo appuntamento.

Materiale didattico e di studio di riferimento.

- Metodologie biochimiche e biomolecolari, M. Maccarrone, Ed. Zanichelli,
- Slide e appunti delle lezioni.