

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

IV ANNO

C.I. “DIAGNOSTICA PER IMMAGINI E DI LABORATORIO” (7 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 specifici fattori. Il limite di rivelabilità; i limiti fiduciarci. 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 ed 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 ed 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 ed 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, deidratazione ed 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 docente riceve gli studenti tutti i giorni previo appuntamento.

Materiale didattico e di studio di riferimento.

- Metodologie biochimiche e biomolecolari, M. Maccarrone, Ed. Zanichelli,
- Metodologie di base per la biochimica e la biotecnologia, A.J. Ninfa, D.P. Ballou, Ed. Zanichelli;
- Biotecnologia molecolare, R.G. Glick, J.J. Pasternak, Ed. Zanichelli;
- Slide e appunti delle lezioni.