UNIVERSITÀ DI PISA

BIOLOGIA MOLECOLARE, BIOCHIMICA CLINICA E METODOLOGIE ANALITICHE

GIUSEPPE DANIELE

Anno accademico	2023/24
CdS	TECNICHE DI LABORATORIO BIOMEDICO (ABILITANTE ALLA PROFESSIONE SANITARIA DI TECNICO DI LABORATORIO BIOMEDICO)
Codice	017FE
CFU	9

Moduli	Settore/i	Tipo	Ore	Docente/i
BIOCHIMICA CLINICA	BIO/12	LEZIONI	24	GIUSEPPE DANIELE
BIOLOGIA MOLECOLARE	BIO/11	LEZIONI	24	SIMONA PIAGGI
METODOLOGIE E TECNICHE ANALITICHE IN BIOCHIMICA CLINICA	MED/46	LEZIONI	24	CRISTINA ROMEI

Obiettivi di apprendimento

Conoscenze
Lo studente avrà acquisito conoscenze sulla realtà del laboratorio dal punto di vista organizzativo e soprattutto in merito all' operatività.
Verranno approfonditi i principi che stanno alla base dei test di laboratorio impiegati in biochimica clinica.
Biologia molecolare: lo studente avrà acquisito le conoscenze di base sulla struttura, funzione e manipolazione degli acidi nucleici

Modalità di verifica delle conoscenze
Esame scritto

Capacità
lo studente sarà in grado di comprendere i principi che stanno alla base dei test eseguiti in laboratorio ed individuare eventuali azioni correttive per risoluzione delle problematiche.

Modalità di verifica delle capacità
Tirocinio in laboratorio

Comportamenti
Lo studente potrà acquisire conoscenze sulle principi che stanno alla base dei test esguiti in laboratoriorio di biochimica clinica e biologia molecolare. Inoltre, potrà sviluppare consapevolezza per risoluzione di problematiche inerenti il corretto svolgimento del proprio lavoro ed attendibilità dei risultati prodotti

Modalità di verifica dei comportamenti
La verifica dei comportamenti avverrà in aula con attraverso un confronto diretto tra docente e studenti.
Tale verifica sarà occasione per chiarire eventuali dubbi e risolvere criticità.

Prerequisiti (conoscenze iniziali)
Per seguire il corso non è necessaria alcuna conoscenza iniziale.

Corequisiti
Per seguire il corso non è necessario seguire alcun insegnamento parallelo

Prerequisiti per studi successivi
La frequenza del corso non costituisce un requisito obbligatorio per la frequenza di corsi successivi.

Indicazioni metodologiche
Sono previste lezioni frontali ed esercitazioni in aula o laboratorio

Programma (contenuti dell'insegnamento)
METODOLOGIE ANALITICHE

1. Cenni di organizzazione di laboratorio. Preanalitica e problematiche inerenti. Esami in regime di urgenza e di routine. Analisi decentrate. Esempi pratici e criticità. Controllo di qualità: Controllo di qualità interno ed esterno. Tipologie di errori. Accuratezza e precisione. Specificità e sensibilità.
2. Ripetibilità e riproducibilità. Controlli interlaboratorio e intralaboratorio. Limiti fiduciari. Carte di controllo: Levey e Jennings, carta delle somme cumulative. Come allestire un controllo di qualità con pool di sieri; esempio pratico. Regole di Westgard. Azioni correttive in caso di carta fuori controllo. Tecniche di centrifugazione (principi della sedimentazione). Tipologie di centrifughe e di rotori. Centrifugazione differenziale. Centrifugazione in gradiente di densità, isopicnica e zonale. Ultracentrifugazione.
3. Tecniche cromatografiche: Principi genarali. Selettività ed efficienza. Numero dei piatti teorici. Cromatografia su colonna, su strato sottile, su carta. Cromatografia d'adsorbimento. Cromatografia di ripartizione. Cromatografia a scambio ionico. Cromatografia ad esclusione. Cromatografia d'affinità. Gascromatografia. HPLC. Cenni sull'emoglobina glicata e descrizione dettagliata dello strumento HPLC 723G8. Interpretazione dei picchi cromatografici.
4. Tecniche immunochimiche: Antigeni ed Anticorpi. Legame antigene-anticorpo. Tecniche di immunoprecipitazione - immunodiffusione radiale semplice ed immunodiffusione doppia. Elisa competitivo, Elisa metodo del doppio anticorpo. RIA - metodi de separazione in fase liquida ed in fase solida. IRMA Cenni di radioprotezione. Immunofluorescenza, diretta ed indiretta.
5. Esempio pratico di come si esegue un test ELISA; significato della curva standard; come interpretare i valori di assorbanza, risalire ad eventuali concentrazioni degli analiti ricercati. Elettroforesi, principi di base. Elettroforesi capillare. Interpretazione dei risultati. Fondamenti di spettrofotometria. Lunghezza d'onda e frequenza. Luce monocromatica e policromatica. Analisi quantitativa e qualitativa. Spettri di emissione e di assorbimento. Trasmittanza, assorbanza e legge di Lambert e Beer. Principi di base. Generalità sugli spettrofotometri.
6. Cenni di microscopia ottica.

BIOLOGIA MOLECOLARE
Cenni storici. Gli acidi nucleici, struttura e funzioni. Organizzazione del genoma eucariotico, procariotico e mitocondriale. La replicazione del DNA. Paradosso C, K, N. Sistemi di riparazione del DNA. Tipi di RNA e loro funzioni. La trascrizione. Operone Lac e operone Trp. Regolazione della trascrizione nei procarioti: controllo epigenetico e fattori di trascizione. Cos'è l'imprinting. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) e superschift. Maturazione dell'mRNA (capping, poliadenilazione , splicing ed editing) e dell'rRNA. Il codice genetico. La traduzione. I miRNA, DROSHA, DICER, RISCH. Metodi di estrazione degli acidi nucleici (fenolo /cloroformio, Tryzol, salting out, kit commerciali con biglie magnetiche e colonnine). La precipitazione del DNA. western blotting cenni Qualità e quantificazione degli acidi nucleici: metodo spettrofotometrico e controllo elettroforetico. Elettroforesi degli acidi nucleici su gel di agarosio e su gel di poliacrilammide. Pulsed-field gel electroforesys (PFGE). L'ibridazione: curva di denaturazione del DNA, temperatura di melting. Tipi di sonde e fattori che influenzano l'iridazione. Il Southern blotting. Il Nothern blotting. La PCR. Touchdown PCR. Nested primer PCR. Come disegnare i primer. Tipi di contaminazioni possibili e organizzazione ottimale di un laboratorio di biologia molecolare. Reverese Trasciptase PCR. Real Time PCR. SYBR green, sonde specifiche (sonde Taq man, sonde FRET, molecular beacon). Analisi del segnale: curve di amplificazione e curve di melting. Quantificazione relativa e assoluta. Cenni sul modulo HRM. Enzimi di restrizione. La transfezione stabile e transiente. Metodi per transfettare. Tipi di vettori per il clonaggio: plasmidi, cosmidi, fagi, cromosoma batterico e di lievito. Il clonaggio del cDNA tramite enzimi di restrizione e topo cloning vector. Fase di screening mediante inattivazione inserzionale con doppio antibiotico e mediante inattivazione della beta-galattosidasi (colonie bianche/blu). Subclonaggio in vettori di espressione. Il sequenzaimento del DNA: il metodo di Sanger. I polimorfismi. *Ibridazione in situ*. PCR e RT-PCR in situ. Microarray. Editing genomico: CRISPR/Cas9.
BIOCHIMICA CLINICA
Aspetti generali di biochimica clinica. Preparazione del campione biologico. Principali alterazioni del campione biologico e approccio sistematico alla gestione del campione biologico. Bioregolatori: elettroliti e molecole volatili. Alterazione del bilancio idroelettrolitico, significato clinico e metodi di determinazione. Equilibrio acido base nel sangue, disordini acido-base e metodi di determinazione (emogasanalisi). Esame emocromocitometrico: caratteristiche principali e approccio clinico. Anemie, coagulazione e approccio alle principali alterazioni. Vitamine e valutazione delle principali alterazioni. Metabolismo dei Carboidrati. Studio di ipo- ed iperglicemie. Metodi di misurazione della glicemia. Lipoproteine e lipidi. Studio delle dislipidemie e disturbi aterosclerotici. Valutazione biochimica-funzionale del fegato (bilirubina totale diretta e indiretta, AST, GOT, LDH, ALP, ?GT).Valutazione biochimico-funzionale del rene (GRF, PRF, FG, FF, creatinina, acido urico, urea). Analisi delle urine. Aspetti generali dell'endocrinologia: ruolo dell'ipotalamo, Ipofisi, Tiroide, Paratiroide, Gonadi, Surrene, Corticosurrene e Pancreas. Marcatori tumorali: ruolo e utilizzo nella pratica clinica

Bibliografia e materiale didattico
Materiale didattico fornito dai docenti e bibliografia essenziale fornita all'inizio del ciclo di lezioni

UNIVERSITÀ DI PISA

Indicazioni per non frequentanti

Non sussistono variazioni per studenti non frequentanti in merito a: programma, modalità d'esame, bibliografia, svolgimento di progetti. La frequenza è consigliata.

Modalità d'esame

Esame scritto

Stage e tirocini

Non sono previste forme di stage, tirocini o collaborazioni con terzi durante lo svolgimento del corso.

Ultimo aggiornamento 14/02/2024 11:58