

ALBO CITOMETRISTI CERTIFICATI GIC: ARGOMENTI DI ESAME

Programma d'Esame Generale

1. Basi essenziali di biologia cellulare. Nozioni generali di citologia con particolare riferimento ai componenti di membrana e intracellulari di interesse citometrico; nozioni sulle principali funzioni cellulari per le quali la citometria ha un ruolo (ad es. proliferazione, differenziamento, morte cellulare-apoptosi e necrosi).
2. Principi di base della fluorescenza e della interazione luce-particella: Conoscenze generali dei fenomeni ottici di assorbimento, riflessione, rifrazione, diffusione (“scattering”), fluorescenza e fosforescenza; approfondimento delle proprietà e caratteristiche dei fenomeni di fluorescenza che interessano la microscopia a fluorescenza e la citometria (spettri assorbimento/emissione, efficienza quantica, fotodecomposizione, riassorbimento, metacromasia, “*energy-transfer*”); cenni alle diverse tecniche di microscopia ottica (campo chiaro, campo scuro, interferenziale, contrasto di fase) con particolare riferimento alla microscopia a fluorescenza (sorgenti, filtri e loro utilizzo in funzione dei marcatori utilizzati).
3. Principi di base della citometria: Concetti generali che sono alla base del funzionamento del citometro a flusso e quali sono i principali parametri ottici misurabili in citometria.
4. Strumentazione - parte ottica: Struttura e funzioni generali degli elementi del sistema ottico; sorgenti di eccitazione (lampade, laser, diodi), filtri di eccitazione e misura, specchi dicroici, fotorivelatori (fotomoltiplicatori e fotodiodi); concetti di analisi multiparametrica a singola e multi eccitazione ed impatto nella compensazione.
5. Strumentazione - parte fluidica: Struttura e funzioni generali degli elementi del sistema fluidico; concetto di focalizzazione idrodinamica.
6. Strumentazione - parte elettronica: Struttura e funzioni generali degli elementi del sistema elettronico , ad es. rivelatori fotoelettronici (fotodiodi, fotomoltiplicatori) amplificatori lineari e logaritmici; sistemi digitali e analogici.
7. Strumentazione - parte di setting: Procedure di controllo della strumentazione (calibrazione, taratura, linearità); impostazione della soglia di analisi, compensazione.

8. Preparazione del campione: conoscenze di base sulle tecniche piu' importanti per la preparazione dei campioni da analizzare; campioni freschi, fissati o congelati
9. Sonde fluorescenti in citometria: Nozioni generali sui coloranti per gli acidi nucleici, per le proteine e per la misura delle principali funzionalità cellulari; nozioni generali sui fluorocromi più adatti all'impiego in citometria in funzione delle bande di eccitazione (ad es. le sonde in ultravioletto per la lampada) ed in funzione delle varie applicazioni (sonde per il DNA e fluorocromi sopravvitali, anticorpi monoclonali coniugati con fluorocromi e conoscenza delle loro caratteristiche principali , come ad esempio il rapporto F/P); problematiche relative ai tandem-coniugati.
10. Gestione ed Analisi dei dati generati: Concetti principali connessi con l'analisi di un file citometrico: nozioni sulle diverse modalità di *gating* (ad es. gate fisico *Vs* gate immunologico); compensazione off-line delle fluorescenze; controllo isotipico ed isoclonico, *fluorescence minus one* (FMO); Criteri per la valutazione della positività; principali tipologie di rappresentazione dei dati citometrici: istogrammi, dot plot, density plot, etc; calcoli statistici: media, mediana, picco, deviazione standard, CV, etc; analisi di istogrammi del contenuto di DNA: stima delle frazioni cellulari nelle diverse fasi del ciclo (applicazione di modelli matematici).
11. Conta assoluta in citometria: Conoscenza delle principali procedure di conta assoluta in citometria.
12. Il *cell sorting* : Concetti generali sul principio alla base del sorting, cenni sulla struttura dei *cell sorters*.
13. Argomenti di esame riservati ai soli candidati afferenti al settore Ematologia: Principali marcatori immunofenotipici utilizzati in oncoematologia: specificità e significato diagnostico; strategie di applicazione dei pannelli di anticorpi in diagnostica; principali elementi pre-analitici nella diagnostica citometrica in ematologia (conservazione e preparazione del campione); principali strategie di *gating* per la identificazione e la analisi delle popolazioni cellulari; nozioni di morfologia e di citochimica degli elementi del sangue e del midollo osseo; modalità per la descrizione e la misura della espressione dei marcatori immunofenotipici; Classificazione WHO 2008 delle malattie onco-ematologiche con particolare riferimento al contributo dell'immunofenotipo in citometria a flusso; significato clinico e biologico della malattia residua minima in oncoematologia; principali requisiti tecnici e metodologici per lo studio della malattia residua minima in oncoematologia mediante citometria a flusso.

14. Argomenti di esame riservati ai soli candidati afferenti al settore Immunologia: Conoscenza dei principali *subsets* cellulari coinvolti nella risposta immune innata ed acquisita; nozioni sulle dinamiche della risposta immune; conoscenza dei principali cluster di differenziazione degli elementi cellulari del sistema immunitario e relative strategie di *gating* per l'identificazione e per il sorting; conoscenza dei protocolli di preparazione dei campioni cellulari per studi funzionali mediante citometria a flusso (proliferazione, citotossicità, produzione di citochine, attivazione, apoptosi); conoscenza delle principali linee guida utilizzate per valutazioni immunologiche.
15. Argomenti di esame riservati ai soli candidati afferenti al settore Ricerca (comprensivo di scienze ambientali e biomedicina): approfondimenti sulle tematiche “Proliferazione e ciclo cellulare” e metodologie citometriche per lo studio di questi eventi biologici (fluorocromi intercalanti e non-intercalanti e loro problematiche applicative, fluorocromi sopravitali); tecniche di incorporazione e rivelazione di marcatori di proliferazione es. BrdU, analisi multiparametrica e strategie di acquisizione dei dati e calcolo delle fasi del ciclo; approfondimenti sui temi morte cellulare-necrosi-apoptosi e relative tecniche di analisi in citometria a flusso/microscopia; manipolazione di linee cellulari in coltura e loro preparazione per indagini citometriche (con particolare riferimento alle colture in adesione: distacco, fissazione, ecc); trattamento ed analisi di campioni (biopsie) di tessuti solidi con particolare riferimento alle varie tecniche di disaggregazione; problematiche relative alla valutazione della ploidia citometrica (standard di riferimento, risoluzione analitica, CV ecc); interpretazione e valutazione critica dei risultati.

Nota:

Per i candidati al livello base gli argomenti di cui ai punti 13, 14 e 15 saranno oggetto di esame solo nella prova orale, mentre per i candidati al livello avanzato tali argomenti saranno oggetto di esame sia nella prova scritta (20 domande) che nella prova orale.