
 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna</p> <p>Policlinico S. Orsola-Malpighi</p> <p>Medicina Interna - Bianchi</p>	<p>ISTRUZIONE OPERATIVA di SERVIZIO</p> <p>Generalità e metodiche utilizzate in Laboratorio</p>	<p>IOS01LAB</p> <p>Rev. 0</p> <p>Pag. 1/8</p>
--	---	---

SOMMARIO

1.0 DOCUMENTI DI RIFERIMENTO.....	2
2.0 DEFINIZIONI.....	2
3.0 CONTENUTO.....	3
4.0 ALLEGATI E MODULI UTILIZZABILI	8

STATO	DATA	FIRMA
Approvato		
Data di applicazione:		

 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna</p> <p>Policlínico S. Orsola-Malpighi</p> <p>Medicina Interna - Bianchi</p>	<p>ISTRUZIONE OPERATIVA di SERVIZIO</p> <p>Generalità e metodiche utilizzate in Laboratorio</p>	<p>IOS01LAB</p> <p>Rev. 0</p> <p>Pag. 2/8</p>
--	---	---


1.0 DOCUMENTI DI RIFERIMENTO

Riferimenti bibliografici:

- Vergani D, Alvarez F, Bianchi FB, Cançado EL, Mackay IR, Manns MP, Nishioka M, Penner E; International Autoimmune Hepatitis Group. Liver autoimmune serology: a consensus statement from the committee for autoimmune serology of the International Autoimmune Hepatitis Group. *J Hepatol* 2004 Oct;41(4):677-83.
- Bogdanos DP, Invernizzi P, Mackay IR, Vergani D. Autoimmune liver serology: current diagnostic and clinical challenges. *World J Gastroenterol* 2008 Jun 7;14(21):3374-87.
- Meda F, Zuin M, Invernizzi P, Vergani D, Selmi C. Serum autoantibodies: a road map for the clinical hepatologist. *Autoimmunity* 2008 Feb;41(1):27-34.
- Aleanzi M. et Al. Coeliac disease: antibody recognition against native and selectively deamidated gliadin peptides. *Clin Chem* 2001; 47(11):2023-8
- Zauli D, Grassi A, Ballardini G, Bianchi FB. Testing for antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Am J Clin Pathol.* 2000 Mar;113(3):455-6.
- Volta U, Granito A, Fiorini E, Parisi C, Piscaglia M, Pappas G, Muratori P, Bianchi FB. Usefulness of antibodies to deamidated gliadin peptides in celiac disease diagnosis and follow-up. *Dig Dis Sci.* 2008 Jun;53(6):1582-8.

2.0 DEFINIZIONI

Le definizioni sono specificate all'interno del contenuto.

 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna</p> <p>Policlínico S. Orsola-Malpighi</p> <p>Medicina Interna - Bianchi</p>	<p align="center">ISTRUZIONE OPERATIVA di SERVIZIO</p> <p align="center">Generalità e metodiche utilizzate in Laboratorio</p>	<p align="center">IOS01LAB</p> <p align="center">Rev. 0</p> <p align="center">Pag. 3/8</p>
--	---	--

3.0 CONTENUTO

Metodiche utilizzate nel laboratorio di analisi:

--SIERAGGIO:

al ricevimento di un prelievo di sangue intero che soddisfi tutte le condizioni di idoneità alla processazione si procede con l'accettazione ed il sieraggio:

i dati del paziente (nome, cognome, data di nascita, provenienza, data di ricevimento, esami richiesti) sono riportati su un registro interno al laboratorio, e ad ogni prelievo viene assegnato un codice alfanumerico crescente che ne rende possibile l'immediata identificazione;

la provetta viene centrifugata ad una velocità di 1,0 r.c.f (2500 r.p.m.) per un tempo variabile dai 5 ai 7 minuti. Una volta ottenuta la separazione della parte corpuscolata dal siero, il siero viene aliquotato in provette recanti il corrispondente codice alfanumerico di identificazione (nel caso pervengano prelievi già sierati e/o aliquote di siero si procederà nello stesso modo evitando il passaggio in centrifuga);

le aliquote di siero così ottenute vengono conservate in apposita cella frigorifera ad una temperatura di +4 °C fino alla processazione.

--STOCCAGGIO:

una volta effettuati gli esami richiesti le aliquote di siero vengono conservate in apposita cella frigorifera ad una temperatura di +4°C per un tempo variabile fino ad un massimo di mesi 3, per poi essere trasferite ad una temperatura di -20°C e conservati fino ad un massimo di anni 10.


--RICERCA ANTICORPI NON ORGANO SPECIFICI (aNOS):

per la ricerca dei NOS viene utilizzata una tecnica di immunofluorescenza indiretta utilizzando come substrato sezioni di organi di ratto (stomaco, rene e fegato) prodotte "in house" e fatte aderire a vetrino portaoggetti.

Eseguita la metodica, il risultato viene refertato entro 5 giorni lavorativi dal ricevimento del prelievo, salvo problematiche riscontrate al momento della lavorazione (ad es. ripetizione del test).

Questa indagine è un test di I livello e consente di indagare la presenza nel siero di anticorpi anti nucleari (ANA), anticorpi anti mitocondriali (AMA), anticorpi anti muscolo liscio (SMA-V, SMA-G, SMA-T), anticorpi anti ribosoma, anticorpi anti reticolina, anticorpi anti microsomi di fegato e rene (LKM-1) e anticorpi anti citosol di cellule epatiche (LC-1).

L'indagine in oggetto è di tipo semiquantitativo ed il referto viene riportato

 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna</p> <p>Policlinico S. Orsola-Malpighi</p> <p>Medicina Interna - Bianchi</p>	<p>ISTRUZIONE OPERATIVA di SERVIZIO</p> <p>Generalità e metodiche utilizzate in Laboratorio</p>	<p>IOS01LAB</p> <p>Rev. 0</p> <p>Pag. 4/8</p>
--	---	---

in una scala di +, dove --- corrisponde alla negatività del test, +--- corrisponde a debole positività, ++- indica una positività moderata, +++ indica una forte positività.

--RICERCA ANTICORPI ANTI NUCLEARI (ANA):


per la ricerca degli ANA viene utilizzata una tecnica di immunofluorescenza indiretta utilizzando come substrato cellule di una linea tumorale epiteliale (HEp-g2) fissate su vetrini commerciali acquistati da ditta accreditata. La metodica viene eseguita entro 5 giorni dal ricevimento del prelievo, il risultato dell'indagine viene refertato entro 15 giorni dall'esecuzione del test, salvo problematiche connesse alla lavorazione. Questa è un'indagine di II livello che consente la caratterizzazione della positività per anticorpi antinucleari, apportando criteri di sensibilità e specificità più elevati rispetto ad indagini di I livello. Questa indagine è di tipo semiquantitativo ed il referto viene riportato in una scala di + che va da 0 (---) a tre + (+++).

--RICERCA DI ANTICORPI ANTI ds-DNA:

la ricerca di anticorpi anti ds-DNA (double stranded DNA, DNA a doppia elica, DNA nativo) viene effettuata su vetrini commerciali acquistati da ditta accreditata che utilizzano come substrato organismi monocellulari di *Crithidia luciliae* utilizzando una metodica di immunofluorescenza indiretta. L'esame viene eseguito entro 5 giorni dal ricevimento del prelievo, il risultato dell'indagine viene refertato entro 15 giorni dall'esecuzione del test, salvo problematiche connesse alla lavorazione. Questa indagine consente di determinare la presenza nel siero di anticorpi diretti contro il DNA nativo ed è di tipo quantitativo in quanto in caso di riscontro di positività il laboratorio procede automaticamente alla determinazione del titolo anticorpale del siero. Il referto emesso riporta il titolo anticorpale del siero in esame.

--RICERCA DI ANTICORPI ANTI ANTIGENI CITOPLASMATICI DEI NEUTROFILI (ANCA):

la ricerca di anticorpi anti citoplasma dei neutrofili viene effettuata su vetrini prodotti "in house" su cui vengono fissati i neutrofili estratti da sangue prelevato da volontario sano. La metodica utilizzata è l'immunofluorescenza indiretta, e viene eseguita entro 14 giorni dal ricevimento del campione ed il risultato dell'indagine viene refertato entro 3 giorni dall'esecuzione del test, salvo problematiche connesse alla lavorazione. La metodica permette di individuare tre pattern di positività: perinucleare (p-ANCA), citoplasmatica (c-ANCA) e perinucleare atipica (p-ANNA).

 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna</p> <p>Policlinico S. Orsola-Malpighi</p> <p>Medicina Interna - Bianchi</p>	<p>ISTRUZIONE OPERATIVA di SERVIZIO</p> <p>Generalità e metodiche utilizzate in Laboratorio</p>	<p>IOS01LAB</p> <p>Rev. 0</p> <p>Pag. 5/8</p>
--	---	---

Questa indagine è di tipo semiquantitativo ed il referto viene espresso in una scala di +, con negativo a 0 + (----) e positivo massimo a 4 + (++++).

--RICERCA DI ANTICORPI ANTI ENDOMISIO (EMA):


la ricerca di anticorpi anti endomisio si esegue su vetrini prodotti “in house” su cui vengono poste sezioni di cordone ombelicale umano. Per effettuare questo tipo di test si utilizza la metodica dell’immunofluorescenza indiretta. Il test viene eseguito e refertato entro 20 giorni dal ricevimento del prelievo, salvo complicazioni inerenti alla lavorazione del campione. L’indagine consente di discernere tra campioni positivi (POS) e negativi (NEG) ed è di tipo quantitativo con evidenza sul referto del titolo anticorpale del campione preso in esame.

--RICERCA DI ANTICORPI ANTI TRANSGLUTAMINASI TISSUTALE UMANA (tTG):

questo test viene utilizzato per la determinazione quantitativa nel campione di anticorpi di classe IgA diretti contro l’enzima transglutaminasi tissutale. Il dosaggio si basa su una metodica di tipo immunoenzimatico sandwich (metodica ELISA) le cui componenti sono fornite da ditta esterna accreditata. Il test viene eseguito e refertato entro 30 giorni dal ricevimento del prelievo, salvo complicazioni inerenti alla lavorazione del campione. L’indagine è di tipo quantitativo ed il referto riporta il valore della quantità di anticorpo presente nel campione, espresso in Unità/ml e riferito ad una scala fornita con il kit diagnostico tale per cui valori < 9.0 U/ml vengono considerati negativi, valori compresi tra 9.0 U/ml e 15.9 U/ml si considerano borderline e valori ≥ 16.0 U/ml sono da considerarsi positivi.

--RICERCA DI ANTICORPI ANTI NEURONE:

per la ricerca di anticorpi anti neurone vengono impiegati vetrini disponibili in commercio e forniti da ditta accreditata. I suddetti vetrini sono composti da parti di cervelletto di primate e da parti di cervelletto di ratto ed i sieri in esame vengono testati contemporaneamente per entrambi i substrati. Il test consente l’individuazione nel campione di anticorpi anti neuronali diretti contro le cellule del Purkinje e/o contro i nuclei delle cellule dello strato granulare e della corteccia cerebellare di classe IgG, utilizzando una metodica di immunofluorescenza indiretta. L’esame viene eseguito e refertato entro 15 giorni dalla ricezione del prelievo, salvo problematiche connesse alla lavorazione. Il referto riporta un valore semiquantitativo della positività riscontrata espresso in una scala di più, dove 0 + (---) corrisponde alla negatività del campione e tre + (+++) indica il valore massimo di positività riscontrata.

 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna</p> <p>Policlinico S. Orsola-Malpighi</p> <p>Medicina Interna - Bianchi</p>	<p>ISTRUZIONE OPERATIVA di SERVIZIO</p> <p>Generalità e metodiche utilizzate in Laboratorio</p>	<p>IOS01LAB</p> <p>Rev. 0</p> <p>Pag. 6/8</p>
--	---	---

--RICERCA DI ANTICORPI ANTI ENTEROCITI:


questo esame sfrutta una metodica di immunofluorescenza indiretta per riscontrare la presenza di anticorpi anti enterociti nel siero in esame. Il test viene effettuato su vetrini disponibili in commercio e forniti da ditta accreditata che utilizzano come substrato sezioni di digiuno di primate. Questo esame è in grado di evidenziare l'eventuale presenza di anticorpi sia di classe IgA che di classe IgG. Il referto riporta un valore di positività di tipo quantitativo, in quanto dopo aver riscontrato l'eventuale positività alla diluizione iniziale di 1:10 si procede alla titolazione del siero in esame utilizzando la procedura delle diluizioni scalari. L'esame viene effettuato quando viene raggiunto un numero soglia di campioni da indagare, e comunque il referto viene emesso entro 20 giorni dalla ricezione del prelievo, salvo problematiche connesse alla lavorazione del campione.

--RICERCA DI ANTICORPI ANTI PEPTIDI DEAMIDATI DI GLIADINA (DGP):

questo tipo di test viene utilizzato per la determinazione quantitativa nel siero di anticorpi diretti contro peptidi di gliadina che sono stati deamidati dalla transglutaminasi tissutale attraverso la trasformazione di una molecola di glutammina in acido glutammico. Il dosaggio viene effettuato utilizzando una metodica di tipo immunoenzimatico sandwich (ELISA) ed i kit per effettuare la rilevazione sono forniti da ditta esterna accreditata presso il nostro istituto. Questo test esiste in due varianti in grado di evidenziare rispettivamente anticorpi di classe IgA o di classe IgG (rende quindi possibile identificare indirettamente anche eventuali deficit IgA-specifici nei sieri testati). Il risultato del test viene espresso in Unità/ml ed i valori ottenuti vengono confrontati con intervalli di riferimento forniti con i kit. Nello specifico:
per la ricerca di anticorpi IgA: < 5.5 U/ml NEG; ≥ 5.5 U/ml POS;
per la ricerca di anticorpi IgG: < 10 U/ml NEG; ≥ 10 U/ml POS. Questo esame è in via di standardizzazione presso la nostra struttura, per cui per il momento non è possibile richiederlo in via routinaria ma solo previa accordi diretti con il dott. U. Volta, responsabile di settore. Non è altresì possibile indicare riferimenti temporali per l'esecuzione di questa metodica.

--LIVER PROFILE:

il liver profile è un test eseguito con una metodica di Immunoblotting che utilizza diversi antigeni purificati per la ricerca nel siero di specifici anticorpi diretti verso questi ultimi. Il test viene effettuato su strip di

 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna</p> <p>Policlinico S. Orsola-Malpighi</p> <p>Medicina Interna - Bianchi</p>	<p>ISTRUZIONE OPERATIVA di SERVIZIO</p> <p>Generalità e metodiche utilizzate in Laboratorio</p>	<p>IOS01LAB</p> <p>Rev. 0</p> <p>Pag. 7/8</p>
--	---	---

nitrocellulosa adsorbite con i vari antigeni, che vengono acquistate da ditta accreditata. Il test consente l'individuazione di anticorpi anti-mitochondriali, anti-Sp100, anti-PML, anti-gp210, anti-SSA-Ro/52, anti-SLA, anti-LC1, anti-LKM1 ed attualmente rappresenta il massimo livello ottenibile di sensibilità e specificità (metodica di III livello).

Questo esame viene effettuato solo previo contatto con il laboratorio, solo in presenza di un sospetto clinico congruo e solo nel caso in cui non sia stato possibile o sufficiente l'utilizzo di metodiche di livello inferiore per dipanare il dubbio.

Il test viene inoltre eseguito solamente al raggiungimento di un numero soglia minimo (cinque) di quesiti da indagare, e comunque non oltre i 30 giorni dal ricevimento della richiesta.

Il referto viene espresso in una scala semiquantitativa di + che va da 0 (---) a 3+ (+++) per ognuno degli antigeni indagati.

--ENA BLOT (Antigeni Nucleari Estraibili – profile 3):

il test per la ricerca degli Antigeni Nucleari Estraibili viene eseguito con una metodica di Immunoblotting che utilizza diversi antigeni purificati per la ricerca nel siero di specifici anticorpi di classe IgG diretti verso questi ultimi. Il test viene effettuato su strip di nitrocellulosa adsorbite con i vari antigeni, che vengono acquistate da ditta accreditata. Il test consente l'individuazione di anticorpi anti-nRNP/Sm, anti-Ro52, anti-PM-Scl, anti-Sm, anti-dsDNA, anti-SSA, anti-Nucleosomi, anti-SSB, anti-Prot-P-rib, anti-PCNA, anti-CENPB, anti-Scl70, anti-Jo-1, anti-Istoni, anti-M2 ed attualmente, al pari del test per il Liver Profile rappresenta il massimo livello ottenibile di sensibilità e specificità (metodica di III livello).


Questo esame viene effettuato solo previo contatto con il laboratorio, solo in presenza di un sospetto clinico congruo e solo nel caso in cui non sia stato possibile o sufficiente l'utilizzo di metodiche di livello inferiore per dipanare il dubbio.

Il test viene inoltre eseguito solamente al raggiungimento di un numero soglia minimo (cinque) di quesiti da indagare, e comunque non oltre i 30 giorni dal ricevimento della richiesta.

Il referto viene espresso in una scala semiquantitativa di + che va da 0 (---) a 3+ (+++) per ognuno degli antigeni indagati.

--INVIO REFERTI:

I referti degli esami richiesti dalle UU.OO. interne all'azienda vengono presi in consegna dal personale del coordinamento al momento della consegna dei prelievi presso la nostra accettazione (alle ore 10:30) e vengono smistati e consegnati ai vari reparti di provenienza entro la mattinata.

 <p>SERVIZIO SANITARIO REGIONALE EMILIA-ROMAGNA Azienda Ospedaliero - Universitaria di Bologna</p> <p>Policlinico S. Orsola-Malpighi Medicina Interna - Bianchi</p>	<p align="center">ISTRUZIONE OPERATIVA di SERVIZIO</p> <p align="center">Generalità e metodiche utilizzate in Laboratorio</p>	<p>IOS01LAB</p> <p>Rev. 0</p> <p>Pag. 8/8</p>
---	---	---

I referti di pazienti provenienti da aziende sanitarie o da istituti ospedalieri al di fuori del policlinico S.Orsola-Malpighi vengono inviati via fax alla struttura inviante nel caso sia possibile risalire ad un recapito fax. Nel caso sia impossibile l'invio via fax il personale di laboratorio provvede a contattare l'istituto o l'azienda ospedaliera richiedente al fine di reperire le informazioni necessarie all'invio ed al corretto recapito del referto. Non è possibile comunicare direttamente tramite telefono i risultati degli esami, nel rispetto della normativa vigente in fatto di privacy del paziente. **N.B. i prelievi provenienti da qualsivoglia altro istituto che non sia l'azienda ospedaliera S.Orsola-Malpighi devono SEMPRE essere accompagnati dall'autorizzazione della prestazione laboratoristica rilasciata dalla direzione sanitaria della struttura inviante. Non verranno spediti referti di sieri o prelievi non accompagnati da autorizzazione.**

--CQI; Controllo di Qualità Interno:

ognuno dei test qui elencati effettuati presso la nostra struttura è soggetto **ogni singola volta** ad un controllo di qualità interno alla struttura stessa che, grazie all'utilizzo di sieri di controllo riconosciuti come standards internazionali (forniti da NIBSC, National Institute for Biological Standards and Controls), di sieri di controllo forniti con gli stessi kit utilizzati o di sieri di controllo di cui è stata appurata una riconosciuta, marcata e specifica positività è in grado di fornire informazioni utili a riconoscere il corretto svolgimento della seduta di esame, l'idoneità del substrato utilizzato per l'analisi nonché un riferimento ottico per stabilire il cut-off ed il livello di positività massima riscontrabile nella seduta di lavoro. E' inoltre sempre presente in ogni seduta effettuata un controllo negativo, costituito da un siero la cui negatività sia stata appurata in modo certo e ripetutamente, o da un controllo fornito con il kit utilizzato di modo da fornire indicazioni e cut-off per la determinazione della negatività dei campioni in oggetto.

4.0 ALLEGATI E MODULI UTILIZZABILI

- R01/IOS01LAB** Modulo richieste per la determinazione di autoanticorpi.
- R02/IOS01LAB** Recapiti di laboratorio per interpretazione referti e chiarimenti.
- R03/IOS01LAB** Specifica metodologie utilizzate nello stoccaggio dei materiali.
- R04/IOS01LAB** Specifica criteri di accettazione/non-conformità dei prelievi ricevuti.