

Validazione delle analisi infettivologiche
HIV, HCV e HBV
sull'apparecchio Beckman Access2

Lavoro di Diploma

Tiziana Mengozzi

Scuola Superiore Medico Tecnica TAB3

Responsabile Dott.ssa C. Steinemann

Laboratorio Ospedale Regionale di Lugano Sede Civico

Locarno 2012/2013

Riassunto

È conosciuto che i virus del HIV, HCV ed HBV sono infettivi in caso di trasfusioni di sangue, aferesi ed in caso di contatto accidentale. Ora le analisi per questi virus sono fatte su Axsym della ditta Abbott, ma l'apparecchio dovrà essere sostituito con Access2 della ditta Beckman. L'obiettivo del lavoro è di validare l'apparecchio Access2 assicurandosi che produca gli stessi risultati dell'Axsym. L'Access2 sarà utilizzato dal laboratorio TTD del Servizio Trasfusionale CRS della Svizzera Italiana per le analisi di aferesi d'urgenza e dal laboratorio Ospedale Regionale di Lugano (ORL) in caso di contatto accidentale e per partorienti che non hanno mai fatto le analisi del HBV. Le analisi da introdurre sono: HIV1/2, HCV, HBsAG, HBc Ab ed anti-HBs.

Per validare le analisi sono a disposizione cinque kits d'analisi per i differenti marcatori, campioni dalla sieroteca ORL del Servizio Trasfusionale CRS SI. Per queste analisi è usato siero e plasma che è stato in precedenza analizzato su Axsym. I cinque kits sono stati calibrati su Access2. I campioni erano congelati, sono stati scongelati, centrifugati ed analizzati su Access2.

I risultati sono stati comparati con quelli dell'apparecchio Axsym usando il test di Kappa di Cohen, Bland-Altman e la Passing & Bablok.

Le analisi statistiche confermano che i due apparecchi eseguono le analisi nello stesso modo producendo gli stessi risultati. Per questa ragione le cinque analisi sono validate su Access2. Ora le analisi per HIV, HCV e HBV sono eseguite sul nuovo apparecchio. L'obiettivo dello studio è stato raggiunto.

Abstract

It has long been known that HIV, HCV and HBV are infectious viruses in the case of blood transfusions, apheresis and in case of accidental contact. Now analyses are made with Axsym, from Abbott, but the machine will be replaced with the machine Access2 from Beckman. The purpose of this study is to evaluate whether Access2 produces the same results as Axsym. Access2 will be used in the TTD laboratory of Blood Transfusion of Swiss Red Cross (CRS) of Italian Switzerland for analyses of urgent apheresis and in the Regional Hospital of Lugano (ORL) laboratory in case of accidental contact and for pregnant women that have never had HBV analyses. The analyses to be introduced are: HIV1/2, HCV, HBsAG, HBc Ab and anti-HBs.

In order to evaluate the analyses five kits are available for the different markers as well as different patients are from the ORL serum bank and Blood Transfusion CRS of Italian Switzerland. For this analyses serum and plasma were used, they were previously analyzed on Axsym. Five kits were installed on Access2. Frozen samples were thawed, centrifuged and subsequently analyzed.

The results obtained were compared with Axsym results. For the comparison the statistics analyses of Kappa Test of Cohen, Bland-Altman test and Passing & Bablok test were used.

The statistics analyses confirm that the two machine produced comparable results. For this reason the five analyses are suitable for Access2. Now the analysis for HIV, HCV and HBV are made with the new machine. The purpose of the study is been reached.

INDICE

1	Introduzione.....	5
1.1	Virus dell'Immunodeficienza Umana.....	5
1.2	Epatiti.....	6
1.2.1	Virus dell'epatite C.....	7
1.2.2	Virus dell'epatite B.....	7
1.3	Obiettivo.....	9
2	Materiale e metodi.....	11
2.1	Access2 Immunoassay System.....	11
2.2	HIV1/2 Combo.....	11
2.3	HCV Ab PLUS.....	13
2.4	HBsAG.....	14
2.5	HBc Ab.....	15
2.6	Anti-HBs.....	15
2.7	Procedura analitica.....	16
2.8	Analisi statistiche.....	16
2.8.1	Test di Kappa di Cohen.....	16
2.8.2	Coefficiente di variazione.....	17
2.8.3	Bland-Altman.....	17
2.8.4	Passing & Bablok.....	17
3	Risultati.....	18
3.1	HIV1/2.....	18
3.2	HCV.....	18
3.3	HBsAG.....	19
3.4	HBc Ab.....	19
3.5	Anti-HBs.....	19
4	Discussione.....	21
5	Conclusione.....	23
6	Ringraziamenti.....	24
7	Bibliografia.....	25
8	Allegati.....	26
8.1	Allegato 1.....	26
8.2	Allegato 2.....	27
8.3	Allegato 3.....	28

8.4	Allegato 4	29
8.5	Allegato 5	30

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1: HIV [3]	5
Figura 2: Replicazione HIV [4].....	6
Figura 3: HCV [7].....	7
Figura 4: HBV [9].....	8
Figura 5: Concentrazione ematica degli antigeni e degli anticorpi del HBV [10].....	8
Figura 6: HIV1/2 Combo.....	12
Figura 7: HCV Ab Plus	13
Figura 8: Diagramma Bland-Altman per anti-HBs	20
Figura 9: Grafico Passing & Bablok per anti-HBs.....	20

1 Introduzione

1.1 Virus dell'Immunodeficienza Umana

La Sindrome di Immunodeficienza Acquisita (AIDS) è una malattia di origine virale causata dal Virus dell'Immunodeficienza Umana (HIV). Il virus infetta i linfociti umani portanti l'antigene CD4 e produce un deficit nell'immunità cellulare. Dai linfociti o dai precursori linfocitari dei pazienti affetti da AIDS, sono stati isolati due tipi di virus affini al gruppo dei lentivirus: HIV di tipo 1 e HIV di tipo 2.

HIV-1 è stato isolato in Francia e successivamente negli USA, mentre HIV-2 è stato identificato in due malati di origine africana e si è rilevato responsabile della pandemia nell'Africa occidentale. [1]

È un lentivirus della classe dei retrovirus. Attacca le cellule del sistema immunitario, linfociti T CD4+, e si integra nel loro genoma dove può persistere per anni.

Il virus possiede una membrana lipidica (envelope) con proteina gp120, core con antigene p24 e un genoma di due molecole di RNA singola catena positivo. [2]

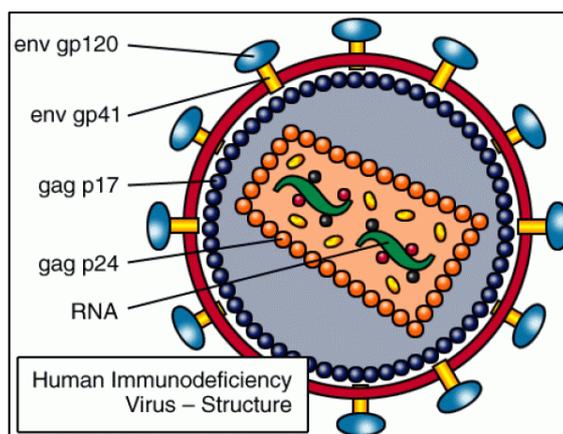


Figura 1: HIV [3]

La replicazione inizia con il legame tra la proteina gp120 del virus al recettore cellulare CD4 del linfocita T. Il virus entra poi nella cellula e si libera dell'involucro. L'RNA genomico è retroscritto nel DNA provirale che si integra nel genoma cellulare. Segue la sintesi e la maturazione dei nuovi virioni che escono dalla cellula per gemmazione. [2]

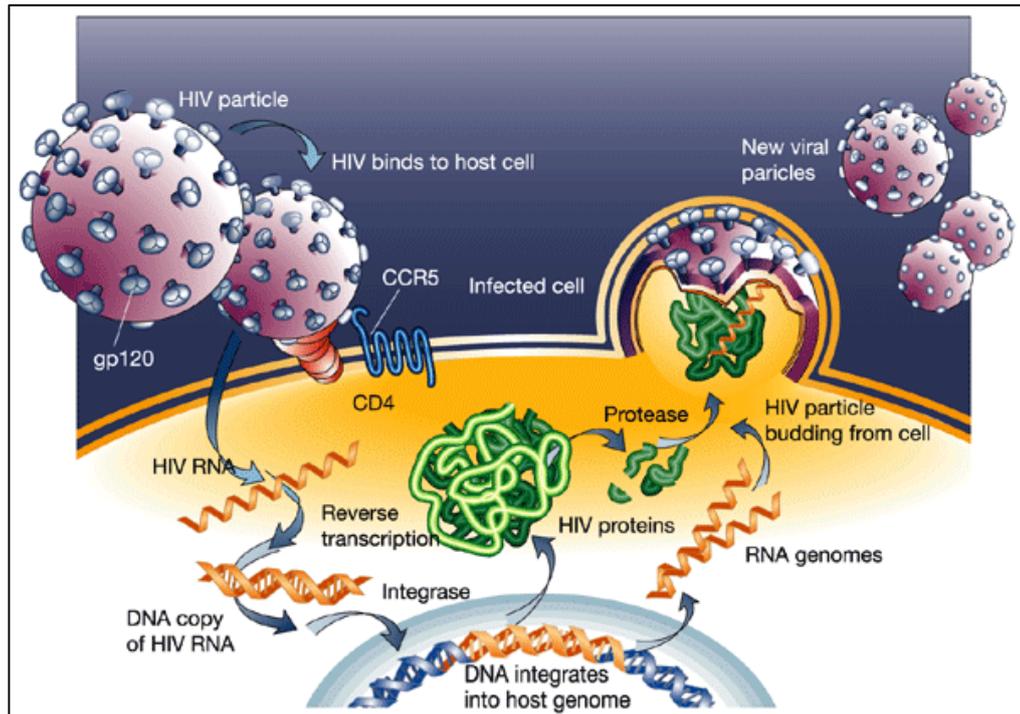


Figura 2: Replicazione HIV [4]

La trasmissione del virus può avvenire per via sessuale, trasfusioni di sangue o derivati sanguigni e per trasmissione parenterale. [2]

34 milioni di persone nel mondo avevano l'AIDS nel 2011 di cui 1.7 milioni ne sono decedute. [5]

1.2 Epatiti

Fino alla seconda guerra mondiale le epatiti non erano classificate, ma venivano chiamate nella letteratura: "infectious hepatitis", "epidemic hepatitis" o "catarrhal jaundice".

Durante la seconda guerra mondiale si distinguevano due tipi di epatiti: l'epatite A e l'epatite B. Fu poi scoperto nel 1977 il virus dell'epatite D, e solo alla fine degli anni '80 il virus dell'epatite C e dell'epatite E. [6]

Epatite: infiammazione del fegato con necrosi degli epatociti. Può essere causata da farmaci, alcool, virus...

Viene classificata in:

- Acuta: si risolve entro 6-12 mesi
- Cronica: persiste per oltre 6-12 mesi
- Fulminante: danno acuto associato ad importante insufficienza epatica

Ad eccezione di quella fulminante, si manifesta in modo caratteristico con: ittero, urine ipercromiche, feci ipocromiche ed aumento delle transaminasi. [2]

1.2.1 Virus dell'epatite C

Il virus dell'epatite C (HCV) appartiene alla famiglia delle Flaviviridae. Ha un involucro costituito da lipidi e come genoma un RNA a singola catena (ssRNA).

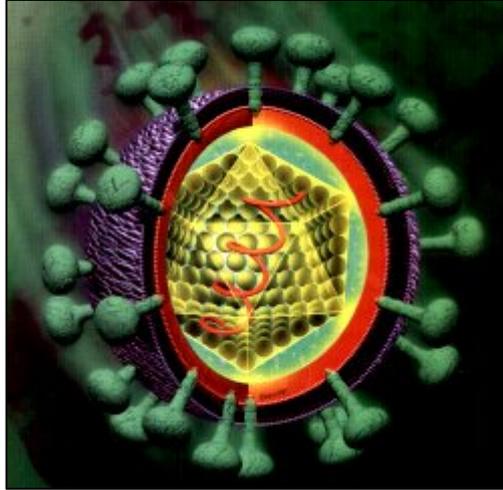


Figura 3: HCV [7]

È un virus che può essere trasmesso tramite sangue. Si trova anche nel latte materno, liquido seminale o nella saliva. Le vie di trasmissione possono essere: percutanea (aghi contaminati, emodialisi, trapianti o trasfusioni, agopuntura, tatuaggi body-piercing) o permucosa (rapporti sessuali, perinatale e contatti con oggetti d'igiene personale). [6]

Durante l'analisi di sierologia infettiva, la rilevazione degli anticorpi anti-HCV è indice di infezione da virus dell'epatite C. La maggior parte dei pazienti con infezione da virus HCV svilupperà poi un'infezione cronica (ca 70%), con il rischio d'evoluzione in cirrosi ed epatocarcinoma. Al giorno d'oggi la cura dell'infezione da HCV è possibile nella maggior parte dei casi.

Individuare la presenza degli anticorpi anti-HCV è indispensabile per diagnosticare un'infezione remota o presente e per evitare i contagi per via ematica e parenterale. [8]

Ogni anno 3-4 milioni di persone sono infettate dal virus HCV nel mondo. Circa 150 milioni delle persone infettate sviluppano o hanno sviluppato un'infezione cronica con rischio di cirrosi ed epatocarcinoma e ne muoiono circa 350'000 ogni anno. [5]

1.2.2 Virus dell'epatite B

Il virus dell'epatite B (HBV) fa parte della famiglia delle Hepadnaviridae. Ha un involucro che contiene l'antigene di superficie (HBs Ag). All'interno è presente un core centrale composto da antigene core (HBc Ag) che contiene a sua volta un DNA circolare e la DNA polimerasi. [6]

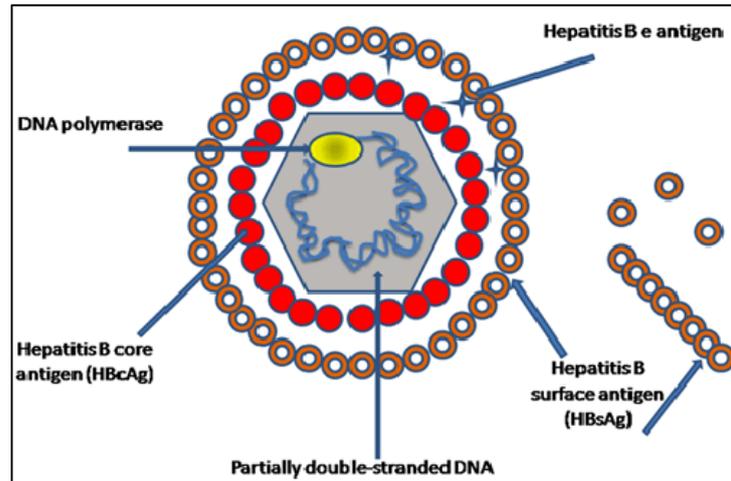


Figura 4: HBV [9]

È un virus ematico che può essere trasmesso tramite liquidi biologici. Le vie di trasmissione possono essere: percutanea (aghi contaminati, emodialisi, trapianti o trasfusioni, agopuntura, tatuaggi body-piercing) o permucosa (rapporti sessuali, perinatale e contatti con oggetti di igiene personale). [6]

A livello mondiale, circa 2 miliardi di persone sono state infettate con il virus dell'epatite B e più di 240 milioni presentano un'infezione cronica del fegato. Circa 600'000 persone muoiono ogni anno a causa delle conseguenze acute o croniche dell'epatite B.

Dal 1982 è disponibile un vaccino contro l'epatite B. Il vaccino, dagli anni 90, è costituito da peptidi sintetici ed ha un'efficacia del 95% nel prevenire l'infezione e le sue conseguenze croniche. [5]

Per la rilevazione dell'epatite B nel sangue vengono utilizzati dei marcatori specifici. Durante il corso dell'infezione acuta o cronica sono presenti nel siero marcatori diversi.

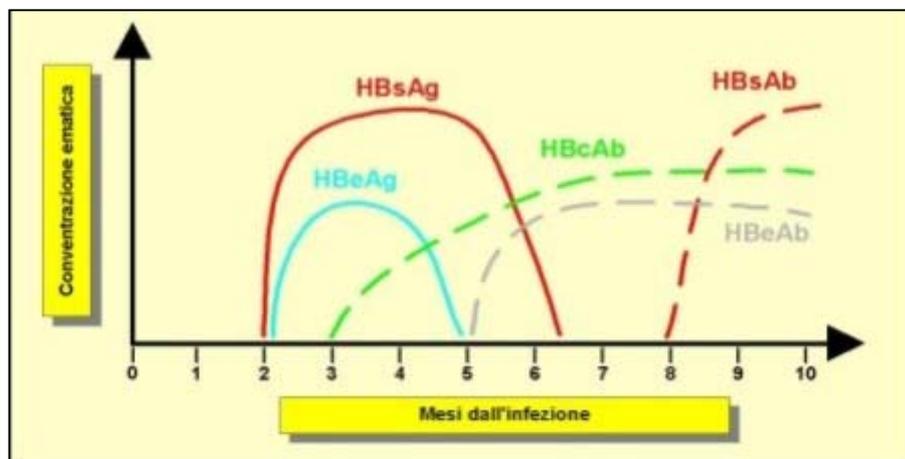


Figura 5: Concentrazione ematica degli antigeni e degli anticorpi del HBV [10]

I marcatori che sono stati presi in considerazione per il lavoro sono:

- Antigene di superficie HBs (HBsAG)
- Anticorpi anti-antigene core (HBc Ab)
- Anticorpi anti-antigene di superficie Hbs (anti-HBs)

1.3 Obiettivo

Durante lo stage presso l'Ospedale Regionale di Lugano (ORL) sede Ospedale Civico in EOLAB sono stata incaricata d'introdurre alcune analisi infettivologiche per rilevare la presenza del virus HIV, del virus dell'epatite C ed epatite B sullo strumento Access2 della ditta Beckman. Le analisi di sierologia infettiva, al momento, vengono effettuate sullo strumento Axsym della ditta Abbott.

Da gennaio 2013 l'Istituto Cantonale di Microbiologia (ICM) di Bellinzona è stato integrato in EOLAB e l'esecuzione delle analisi di sierologia infettiva sul sangue dei pazienti avviene a Bellinzona. Per questo cambiamento l'apparecchio Axsym non è più in servizio presso il laboratorio OCL di EOLAB.

Questo mio lavoro di diploma consiste nel validare e confrontare dei test di sierologia infettiva con lo strumento Access2 in base ai risultati precedentemente ottenuti (positivo, dubbio e negativo) su Axsym. Se con questa validazione e con questo confronto dei test sierologici posso dimostrare che i risultati sono da ritenere conformi, i test potrebbero essere introdotti sullo strumento Access2 per i prelievi di donazioni in urgenza da parte del Servizio Trasfusionale CRS della Svizzera Italiana per i tre marcatori principali HBsAG, anti-HCV e HIV1/2, come anche per una conferma di queste analisi sulle donazioni risultate ripetutamente reattive in sierologia infettiva sull'Autoanalyser Evolis. Questi 3 marcatori vengono giornalmente eseguiti in routine nel laboratorio TTD (laboratorio dei marcatori di malattie trasmissibili per via trasfusionale) del Servizio Trasfusionale CRS della Svizzera Italiana. Inoltre per il laboratorio ORL di EOLAB, lo strumento potrebbe essere utilizzato per l'analisi anti-HBs d'urgenza sul personale ospedaliero nel caso di contatto accidentale con liquido biologico di un paziente, o per eventuali analisi del HBsAG nelle ore notturne o nel fine settimana per le partorienti che non hanno mai fatto questa analisi durante la gravidanza.

Per questi motivi è stato necessario sostituire l'Axsym con uno strumento presente nella sede di Lugano che possa eseguire le analisi infettivologiche in poche ore. L'unico strumento nel laboratorio ORL che si presta per le analisi HBsAG, anti-HCV e HIV1/2, analisi che sono elencate nella attuale lista ufficiale del BSD SRK (Blutspendedienst Schweiz Rotes Kreuz) e quindi conformi all'uso previsto, sono i test Access della ditta Bio-Rad per anti-HCV e HIV1/2, e i test Access HBsAG, anti-HBs ed HBc Ab della ditta Beckman.

Le analisi introdotte:

- HIV1/2: ricerca di antigeni del virus HIV e degli anticorpi anti-HIV1/2.
- Epatite C: ricerca di anticorpi anti-HCV
- Epatite B antigene HBs (HBsAG): ricerca dell'antigene HBs.
- Epatite B anticorpi anti-Core (HBc Ab): ricerca degli anticorpi anti-Core del HBV.
- Epatite B anticorpi anti-HBs (anti-HBs): ricerca degli anticorpi anti-HBs del HBV.

Per questo, l'obiettivo del mio Lavoro di Diploma è quello di validare cinque analisi di sierologia infettiva (HIV1/2, HCV, HBsAG, HBc Ab e anti-HBs) sull'apparecchio Access2 della ditta

Beckman, confrontando i risultati con quelli ottenuti in precedenza sull'apparecchio Axsym della ditta Abbott.

2 Materiale e metodi

2.1 Access2 Immunoassay System

Metodo analitico che usa una reazione antigene-anticorpo per rilevare uno specifico antigene o anticorpo in un campione biologico.

Access2 immunoassay system usa particelle paramagnetiche in fase solida nella reazione ed un enzima che produce una reazione chemiluminescente nella fase di lettura.

L'antigene o l'anticorpo presente nel campione reagisce con il coniugato ed il reagente specifico creando un immunocomplesso. Questo complesso viene legato a particelle paramagnetiche che sono legate ad antigeni o anticorpi a loro volta marcati con l'enzima fosfatasi alcalina. Successivamente un campo magnetico separa il complesso dagli altri componenti in eccesso che vengono eliminati nella fase di lavaggio. Nella fase di rilevazione un substrato chemiluminescente è aggiunto al complesso. Il substrato reagisce con la fosfatasi alcalina presente nell'immunocomplesso producendo una reazione chimica che emette luce. Il luminometro misura la luce emessa e la converte in Relative Light Units (RLU). La luce emessa è proporzionale o inversamente proporzionale alla quantità di analita presente nel campione a dipendenza del tipo di reazione.

Il sistema supporta tre tipi di calibrazione: quantitativa, qualitativa, e semi-quantitativa.

- **Quantitativa:** La calibrazione si basa su una curva a più punti. Il sistema usa la curva di calibrazione per convertire la misurazione in RLU in una concentrazione di analita espressa in unità numeriche.
- **Semi-Quantitativa:** Durante la calibrazione si forma una curva di calibrazione a più punti. Il sistema usa la curva di calibrazione per convertire la misurazione in RLU in una concentrazione di analita espressa in unità numeriche. Questa reazione permette un risultato quantitativo con un'interpretazione qualitativa come reattivo, non-reattivo o dubbio.
- **Qualitativa:** Durante la calibrazione è prodotto un valore di cut-off basato su una formula predefinita. Il sistema compara il risultato in RLU del test con il valore di cut-off per classificare il risultato reattivo o non-reattivo per l'analita. Mostra il risultato in signal/cut-off (S/CO) ed in base a questo valore mostra se un campione è reattivo, non-reattivo o dubbio per l'analita. [11]

2.2 HIV1/2 Combo

Viene utilizzato un metodo immunoenzimatico di tipo sandwich a due fasi in chemiluminescenza con particelle paramagnetiche per l'individualizzazione qualitativa dell'antigene p24 e degli anticorpi anti-HIV-1 e anti HIV-2.

Nella prima fase vengono combinati il campione, particelle paramagnetiche rivestite, anticorpi anti-Ag p24 ed additivo particelle. Le particelle paramagnetiche sono rivestite con proteina ricombinante HIV-1, polipeptidi HIV-O/HIV-2 ed anticorpi monoclonali contro l'antigene HIV-1 e p24.

Nella seconda fase vengono aggiunti 3 polipeptidi, streptavidina coniugata a fosfatasi alcalina ed additivo coniugato.

Dopo lavaggio viene aggiunto un substrato chemiluminescente. La produzione di luce è proporzionale alla quantità di coniugato enzimatico presente al termine della reazione. La quantità di luce misurata per un campione consente di determinare la presenza di anticorpi anti-HIV-1 o anti-HIV-2 e/o dell'antigene p24, confrontando il valore di cut-off determinato durante la calibrazione del test sullo strumento. Se la produzione di luce è uguale o superiore al valore di cut-off, il campione è considerato reattivo.

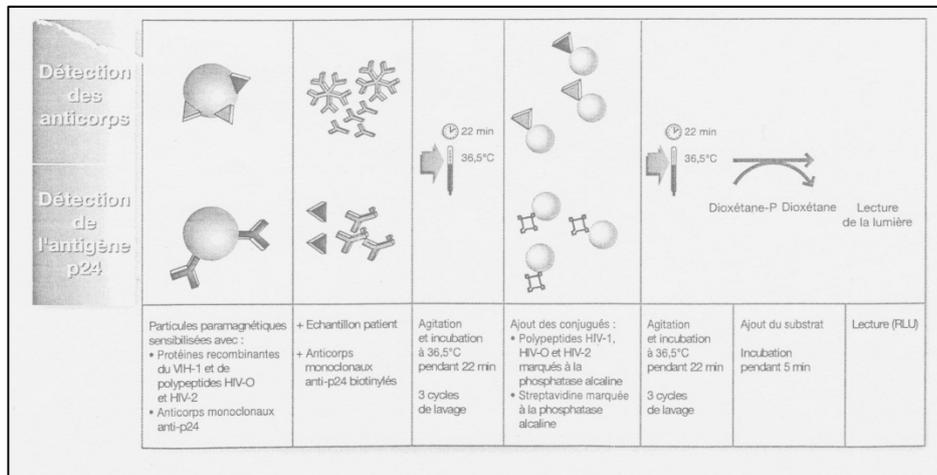


Figura 6: HIV1/2 Combo

L'analisi è effettuata con il kit di reagenti Access HIV Combo della ditta Bio-Rad. Esso è adatto alla determinazione degli anticorpi anti-HIV-1 ed anti-HIV-2 e degli antigeni p24 nel siero e nel plasma umani. A disposizione 150 test.

Access HIV Combo Calibrators della ditta Bio-Rad sono impiegati per eseguire la calibrazione per il dosaggio Access HIV Combo. Vengono eseguiti per stabilire il valore di cut-off.

- C0: negativo
- C1: positivo

Access HIV combo QC della ditta Bio-Rad sono utilizzati per i controlli di qualità. I controlli di qualità sono: QC1, QC2 e QC3. [1]

Come campioni vengono utilizzati siero e plasma positivi e negativi presi dalla sieroteca del ORL, dalla sieroteca del Centro Trasfusionale CRS SI e per quanto riguarda i campioni positivi dalla sieroteca del Servizio di Microbiologia di EOLAB. Sono stati analizzati 48 campioni.

2.3 HCV Ab PLUS

Viene usata una tecnica immunoenzimatica in chemiluminescenza con particelle paramagnetiche per l'individualizzazione degli anticorpi anti-HCV nel siero e nel plasma umani.

Il test è un dosaggio immunoenzimatico indiretto. In una cuvette di reazione, ad un campione vengono aggiunte delle particelle paramagnetiche con un peptide che mima alcuni epitopi della capsida del virus dell'epatite C. Durante l'incubazione le IgG e le IgM presenti nel campione vengono captate dalla fase solida.

Dopo lavaggio, in una seconda fase, vengono aggiunti anticorpi anti-IgG umane legati a fosfatasi alcalina. Dopo incubazione e dopo lavaggio viene aggiunto substrato chemiluminescente ed i fotoni prodotti vengono misurati mediante luminometro. L'intensità del segnale emesso in RLU è proporzionale alla quantità di anticorpi anti-HCV presenti nel campione. Confrontando la misurazione con il valore cut-off si può determinare la presenza o l'assenza degli anticorpi anti-HCV nel campione.

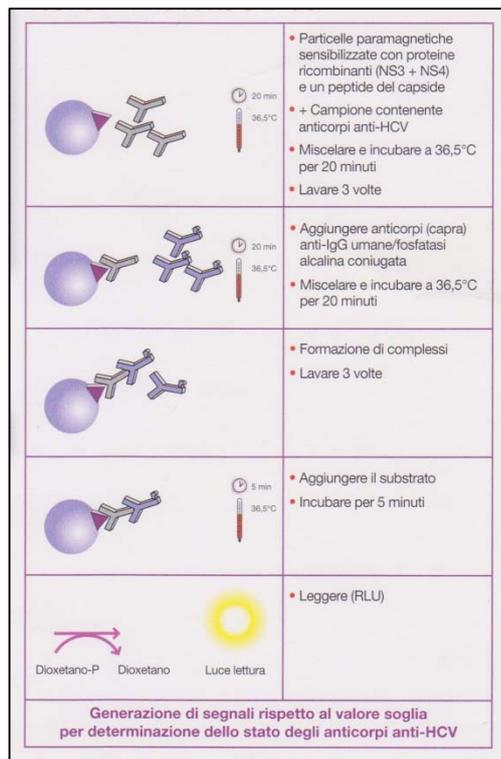


Figura 7: HCV Ab Plus

L'analisi è effettuata con il kit di reagenti Access HCV Ab PLUS della ditta Bio-Rad. Esso è adatto alla determinazione degli anticorpi anti-HCV nel siero e nel plasma umani. A disposizione 150 test.

I Calibratori Access HCV Ab Plus della ditta Bio-Rad sono impiegati per effettuare la calibrazione del test Access HCV Ab Plus. Vengono eseguiti per stabilire il valore di cut-off. Mettono a confronto l'intensità della luce generata da un campione a quella del valore soglia.

- C0: negativo agli anticorpi anti-HCV

- C1: positivo agli anticorpi anti-HCV

I controlli Access HCV Ab PLUS QC della ditta Bio-Rad sono impiegati come controllo di qualità. Questi sono:

- QC1: controllo negativo
- QC2: controllo positivo [8]

I campioni utilizzati sono siero e plasma positivi e negativi presi dalla sieroteca del ORL e dalla sieroteca del Centro Trasfusionale CRS SI. Sono stati analizzati 72 campioni.

2.4 HBsAG

Il test è un immunodosaggio in chemiluminescenza con particelle paramagnetiche per la determinazione qualitativa dell'antigene di superficie HBs del virus dell'epatite B. Il dosaggio immunoenzimatico è a una sola fase ("sandwich").

In una cuvette di reazione vengono aggiunte un campione con una soluzione diluente per campioni. Poi vengono aggiunte particelle paramagnetiche rivestite di anticorpi monoclonali HBsAg-specifici, quindi coniugato fosfatasi alcalina ricombinante-altro anticorpo monoclonale HBsAg-specifico. Durante incubazione l'HBsAG presente nel campione si lega sia alla fase solida che al coniugato. Dopo incubazione e dopo lavaggio si aggiunge substrato chemiluminescente, la luce generata dalla reazione enzimatica viene misurata con luminometro ed espressa in Relative Light Units (RLU). Confrontando l'intensità luminosa con il valore di cut-off determinato durante la calibrazione, è possibile determinare la presenza o l'assenza dell'antigene HBs nel campione. Se la produzione di fotoni è pari o superiore al valore di cut-off, il campione è considerato reattivo per l'HBsAG.

L'analisi è effettuata con il kit di reagenti Access HBs Ag della ditta Beckman Coulter. Esso è adatto alla determinazione degli antigeni HBs nel siero e nel plasma umani. A disposizione 100 test.

HBs Ag Calibrators della ditta Beckman Coulter sono utilizzati per la calibrazione e quindi per determinare il valore di cut-off.

- C0: negativo
- C1: positivo

Access HBs Ag QC della ditta Beckman Coulter sono utilizzati come controlli di qualità. Questi sono:

- QC1: Negativo
- QC2: Positivo [12]

Come campioni sono utilizzati siero e plasma positivi e negativi presi dalla sieroteca del ORL e dalla sieroteca del Centro Trasfusionale CRS SI. Sono stati analizzati 50 campioni.

2.5 HBc Ab

È un dosaggio immunoenzimatico qualitativo basato sul principio dell'immuncattura delle immunoglobuline del siero sulla fase solida. In una cuvette di reazione si aggiungono particelle paramagnetiche rivestite di proteina A, in seguito il campione con una soluzione di pretrattamento ed il coniugato. Le immunoglobuline del campione vengono catturate dalla fase solida, ma solo gli anticorpi specifici anti-core del virus dell'epatite B sono individuati dall'antigene HBc del coniugato alla fosfatasi alcalina.

Quindi un substrato chemiluminescente viene aggiunto e la luce generata dalla reazione è misurata dal luminometro.

La produzione di luce è proporzionale alla quantità di coniugato enzimatico presente al termine della reazione e quindi alla concentrazione di anticorpi anti-HBc presenti nel campione in esame.

Confrontando l'intensità luminosa con il valore di cut-off determinato durante la taratura del test sullo strumento, è possibile stabilire la presenza o l'assenza di anticorpi anti-HBc nel campione.

L'analisi è effettuata con il kit di reagenti Access HBc Ab della ditta Beckman Coulter. Esso è adatto alla determinazione degli anticorpi anti-HBc nel siero e nel plasma umani. A disposizione 100 test.

HBc Ab Calibrators della ditta Beckman Coulter vengono usati per la calibrazione e quindi per stabilire il valore di cut-off. Calibratori:

- C0: negativo agli anticorpi Anti-HBc
- C1: positivo agli anticorpi Anti-HBc

Access HBc Ab QC della ditta Beckman Coulter sono utilizzati con controllo di qualità. Controlli:

- QC1: Negativo
- QC2: Positivo [13]

Campioni di siero e plasma positivi e negativi sono presi dalla sieroteca del ORL e dalla sieroteca del Centro Trasfusionale CRS SI. Sono stati analizzati 43 campioni.

2.6 Anti-HBs

È un dosaggio immunoenzimatico ad una sola fase ("Sandwich") in chemiluminescenza.

Un campione viene aggiunto ad una cuvette di reazione contenente coniugato antigene di superficie dell'epatite B-fosfatasi alcalina e particelle paramagnetiche rivestite di antigene di superficie dell'epatite B. Il complesso antigene HBs-fosfatasi alcalina ed anticorpo specifico si legano all'HBs Ag sulla superficie delle particelle paramagnetiche. Dopo incubazione e lavaggio viene aggiunto substrato chemiluminescente. La produzione di luce è proporzionale alla concentrazione di coniugato enzimatico presente al termine della reazione. La determinazione quantitativa degli anticorpi anti-HBs nel campione viene determinata mediante una curva di calibrazione a più punti memorizzata nel sistema.

L'analisi serve per quantificare gli anticorpi anti-HBs presenti nel campione. La presenza di anticorpi può essere data da un'infezione persistente da HBV o da vaccinazione contro il virus dell'epatite B.

L'analisi è effettuata con il kit di reagenti Access HBs Ab della ditta Beckman Coulter. Esso è adatto alla determinazione quantitativa degli anticorpi anti-HBs nel siero e nel plasma umani. A disposizione 100 test.

HBs Ab Calibrators della ditta Beckman Coulter sono utilizzati come calibratori. Questi contengono concentrazioni note di analita (calibratori d'analisi) e vengono testati come campioni di pazienti al fine di misurare la risposta. Si stabilisce così la curva di calibrazione che viene poi usata per convertire le misure RLU dei campioni di paziente in concentrazioni quantitative (mIU/mL) specifiche di analita.

Calibratori: S0, S1, S2, S3, S4 e S5.

Limiti del metodo: circa 750 mIU/mL. Se la concentrazione di un campione supera i 750 mIU/mL si può diluire il campione con siero umano negativo e testarlo nuovamente al fine di ottenere una concentrazione effettiva.

Access HBs Ab QC della ditta Beckman Coulter sono utilizzati come controllo di qualità.

Controlli:

- QC1: Negativo
- QC2: Positivo [14]

Campioni di siero e plasma positivi e negativi sono utilizzati per l'analisi. Questi sono presi dalla sieroteca del ORL e dalla sieroteca del Centro Trasfusionale CRS SI. Sono stati analizzati 37 campioni.

2.7 Procedura analitica

I campioni analizzati sono stati eseguiti in precedenza su Axsym. I risultati sono stati quindi cercati in LAB400 per quanto riguarda i campioni della sieroteca ORL, mentre per i campioni della sieroteca del Centro Trasfusionale CRS SI i risultati sono stati cercati in Progesa.

In seguito i campioni sono stati scongelati a temperatura ambiente e poi centrifugati per 15 minuti a 3000g. Un'aliquota di campione è stata pipettata in una cuvette di reazione e caricata su Access2.

2.8 Analisi statistiche

I risultati sono stati protocollati in un foglio di lavoro Excel e da questi sono state fatte le analisi statistiche tramite il software Analyse-it® (versione 2.20).

2.8.1 Test di Kappa di Cohen

Si utilizza una sola variabile per valutare il grado di "accordo" tra due metodiche. Il coefficiente kappa di Cohen è una misura della concordanza (*coefficient of agreement*) tra le risposte

qualitative o di un apparecchio (*inter-observer variation*) oppure del medesimo apparecchio in momenti differenti (*intra-observer variation*). In questo caso viene misurato il *coefficient of agreement* (coefficiente K) tra Axsym e Access2.

Il valore di k teoricamente può variare tra -1 e $+1$. In realtà l'indice k ha significato solo quando è positivo. Più il coefficiente K si avvicina a $+1$, più i risultati sono concordanti. [15]

2.8.2 Coefficiente di variazione

È stato calcolato un coefficiente di variazione (CV%) inter-assay e uno intra-assay.

Il coefficiente di variazione inter-assay consiste nella misurazione per dieci giorni dello stesso campione sull'apparecchio. Il CV% viene calcolato tramite il valore S/CO emesso dall'apparecchio nelle diverse misurazioni.

Il coefficiente di variazione intra-assay consiste nel misurare dieci volte consecutive lo stesso campione sull'apparecchio. Il CV% viene calcolato tramite il valore S/CO emesso dall'apparecchio nelle diverse misurazioni.

2.8.3 Bland-Altman

Con l'analisi statistica di Bland-Altman vengono comparati due metodi differenti di analisi con determinazione quantitativa dove vengono effettuate le misure su n campioni indipendenti per verificare se esista una relazione di tipo lineare tra le coppie di risultati ottenuti sugli stessi campioni. L'analisi statistica tiene in considerazione la media tra le due misurazioni dello stesso campione e la differenza che c'è tra di essi. [15]

2.8.4 Passing & Bablok

La Passing & Bablok è una analisi statistica non parametrica per confrontare due metodi differenti di analisi con determinazione quantitativa dove vengono effettuate le misure su n campioni indipendenti per verificare se esista una relazione. I dati vengono divisi in ranghi. Si sostituiscono i numeri in ranghi per poi fare una regressione

3 Risultati

Per le cinque analisi sono stati analizzati in totale 250 campioni di pazienti del OCL, del CT-CRS SI e dal Servizio di Microbiologia EOLAB. Tutti i campioni sono stati analizzati sia sull'apparecchio Axsym che sull'Access2. Inoltre sono stati effettuati regolarmente i controlli di qualità forniti dalla ditta BioRad e dalla ditta Beckman Coulter.

3.1 HIV1/2

Sono stati analizzati 48 campioni (Allegato 1) per i quali è stato calcolato il coefficiente di *agreement* tramite test di Kappa di Cohen dato che si tratta di un risultato qualitativo, cioè reattivo o negativo. Inoltre è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV%) intra e inter-assay tramite i valori Signal/Cut-Off (S/CO) dati dall'Access2.

		Axsym	
		Negativi	Reattivi
Access	Negativi	24	0
	Reattivi	0	24

Tabella 1: Risultati per Axsym e Access2 per l'analisi HIV1/2

Coefficiente K=1 con intervalli di confidenza al 95% da 1.00 a 1.00

CV% inter-assay: 5.36%

CV% intra-assay: 6.04%

3.2 HCV

Sono stati analizzati 72 campioni (Allegato 2) per i quali è stato calcolato il coefficiente di *agreement* tramite test di Kappa di Cohen ed è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV%) intra e inter-assay.

		Axsym	
		Negativi	Reattivi
Access	Negativi	39	2
	Reattivi	2	29

Tabella 2: Risultati per Axsym e Access2 per l'analisi del HCV

Coefficiente K=0.99 con intervalli di confidenza al 95% da 0.78 a 0.99

CV inter-assay: 5.55%

CV intra-assay: 0.76%

3.3 HBsAG

Sono stati analizzati 50 (Allegato 3) campioni di cui è stato calcolato il coefficiente di *agreement* tramite test di Kappa di Cohen ed è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV%) intra e inter-assay.

		Axsym	
		Negativi	Reattivo
Access	Negativi	32	0
	Reattivo	0	18

Tabella 3: Risultati per Axsym e Access2 per l'analisi HBsAG

Coefficiente K=1 con intervalli di confidenza al 95% da 1.00 a 1.00

CV inter-assay: 2.33%

CV intra-assay: 1.92%

3.4 HBc Ab

Sono stati analizzati 43 (Allegato 4) campioni, è stato calcolato il coefficiente di *agreement* tramite test di Kappa di Cohen ed è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV%) intra e inter-assay.

		Axsym	
		Negativi	Positivi
Access	Negativi	21	0
	Positivi	0	22

Tabella 4: Risultati per Axsym e Access2 per l'analisi HBc Ab

Coefficiente K=1 con intervalli di confidenza al 95% da 1.00 a 1.00

CV inter-assay: 3.88%

CV intra-assay: 8.55%

3.5 Anti-HBs

Sono stati analizzati 37 (Allegato 5) campioni, con i risultati ottenuti è stata fatta l'analisi statistica di Bland-Altman e di Passing & Bablok ed è stato calcolato il coefficiente di variazione intra e inter-assay.

Effettuando l'analisi statistica di Bland-Altman si hanno questi risultati:

- Bias: 17.87
- 95% Limits di agreement da -95.29 a 131.03

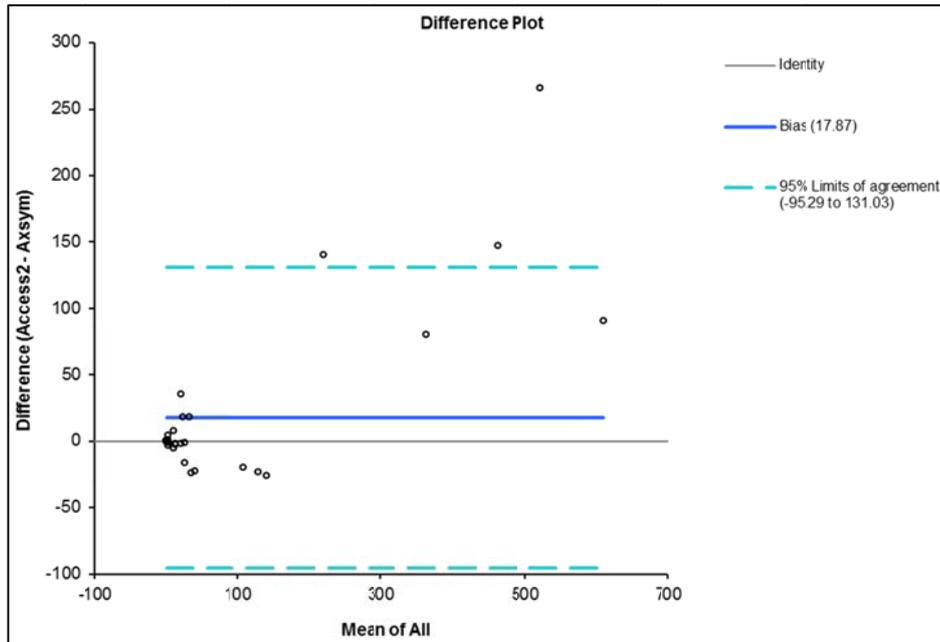


Figura 8: Diagramma Bland-Altman per anti-HBs

Mentre effettuando l'analisi statistica di Passing & Bablok si hanno questi risultati:

	Valore	95% CI
Costante	0.00	0.00- 0.10
Proporzionale	1.13	0.84-1.38

Tabella 5: valori ed intervalli di confidenza della regressione Passing & Bablok per anti-HBs

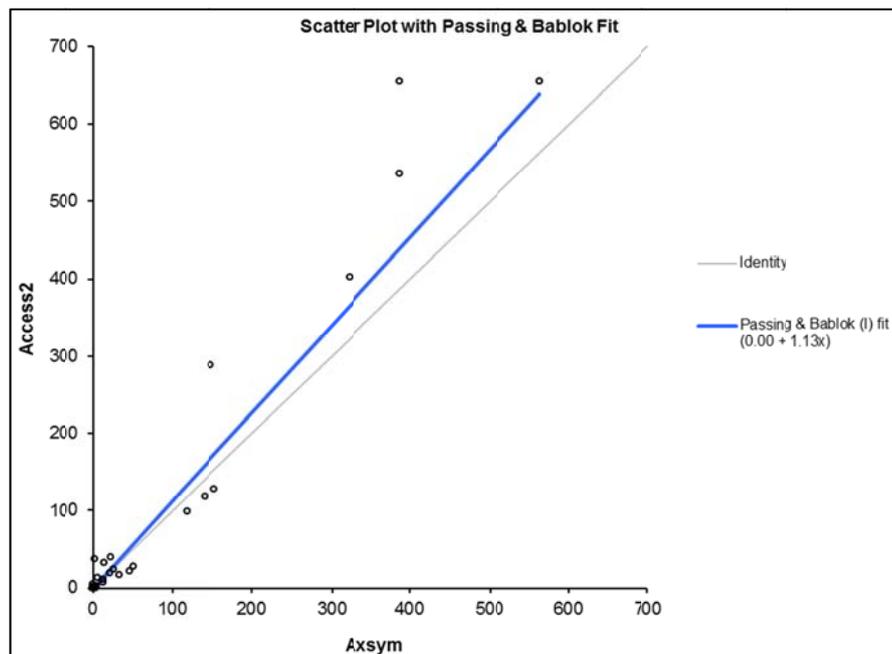


Figura 9: Grafico Passing & Bablok per anti-HBs

CV inter-assay: 4.52%

CV intra-assay: 4.72%

4 Discussione

Per quanto riguarda l'analisi del HIV1/2, il test statistico Kappa di Cohen mostra un valore $K=1$ con CI (intervalli di confidenza) al 95% da 1.00 a 1.00, questo significa che tutti i risultati di analisi dati da Axsym e da Access2 concordano, come si può vedere nella tabella 1. Tre dei risultati negativi sia per Axsym che Access2, avevano in realtà risultato dubbio su Axsym. Per questi campioni è stato effettuato un test di conferma presso l'Istituto Cantonale di Microbiologia (ICM) con risultato negativo. Questi sono stati messi tra i risultati negativi per ragioni statistiche in quanto sono realmente negativi. Dato che il valore di K è uguale a 1 si deve assumere l'assoluta uguaglianza di misurazione dei due apparecchi.

L'analisi statistica di Kappa di Cohen per l'analisi dell'HCV, mostra un valore $K=0.99$ con degli intervalli di confidenza (CI) al 95% da 0.78 a 0.99, questo vuole dire che ci sono delle discordanze minori tra i due apparecchi, ma che la maggior parte dei risultati sono concordanti, come mostrato nella tabella 2. Dato che il valore di K è molto vicino a 1 gli apparecchi lavorano in maniera paragonabile. Due dei risultati messi in tabella 2 tra i campioni negativi sia su Axsym che su Access2, risultavano in realtà dubbi su Axsym ma con conferma immunoblot negativo. I due campioni sono stati classificati in questo modo in tabella 2 per ragioni statistiche essendo realmente negativi per il virus dell'epatite C. Due risultati discordanti in tabella 2, cioè i due campioni risultati reattivi su Axsym e negativi su Access2 hanno dato un test di conferma immunoblot indeterminato ma PCR eseguita presso l'ICM negativa. Quindi questi pazienti sono realmente negativi per l'HCV. Per gli altri due risultati discordanti mostrati in tabella 2, cioè i due campioni risultati negativi su Axsym e reattivi su Access2 si può dire che: uno dei due campioni risultava in realtà dubbio su Axsym, con conferma immunoblot indeterminata e PCR eseguita presso l'ICM negativa. È stato classificato in questo modo in quanto negativo per l'HCV. L'altro campione negativo su Axsym e reattivo su Access2 non ha nessun test di conferma in quanto risultava negativo su Axsym.

L'analisi statistica di Kappa di Cohen per l'analisi del HBsAG mostra un valore $K=1$ con intervalli di confidenza (CI) al 95% da 1.00 a 1.00. Questo significa che tutti i risultati di analisi dati da Axsym e da Access2 concordano, come mostrato nella tabella 3. Dato che il valore di K è uguale a 1 si deve assumere l'assoluta uguaglianza di misurazione dei due apparecchi.

L'analisi statistica di Kappa di Cohen per l'analisi del HBc Ab mostra un valore $K=1$ con intervalli di confidenza (CI) al 95% da 1.00 a 1.00. Questo significa che tutti i risultati di analisi dati da Axsym e da Access2 concordano, come mostrato nella tabella 4. Dato che il valore di K è uguale a 1 si deve assumere l'assoluta uguaglianza di misurazione dei due apparecchi.

Per l'analisi anti-HBs è stata eseguita un'analisi statistica del Bland-Altman ed una Passing & Bablok.

L'analisi statistica di Bland-Altman mostra un bias di 17.87. La figura 8 mostra il diagramma di Bland-Altman dove si può notare il bias a 17.87 ed i limiti di *agreement* posti a -95.29 e a

131.03. L'analisi del Bland & Altman ci mostra che le differenze tra i due metodi con una probabilità al 95% si situa tra -95.29 e 131.03.

L'analisi statistica di Passing & Bablok ci mostra un'intercetta (costante) di 0.00 con intervalli di confidenza (CI) al 95% da 0.00 e 0.10 ed una pendenza (proporzionale) di 1.13 con intervalli di confidenza (CI) al 95% da 0.84 a 1.38. Inoltre nella Figura 9 si può vedere una retta definita *Identity* con funzione $f(x):y+x$, una retta della Passing & Bablok con funzione $f(x):y+1.13x$ e i punti delle singole analisi. La retta *Identity* ci mostra come dovrebbe essere l'analisi statistica se i due apparecchi non avessero differenze per ogni singola analisi. La retta data dalla regressione di Passing & Bablok ci mostra una delle possibili rette che si può formare tenendo in considerazione tutti i punti mostrati nella Figura 9. Si può notare che la retta passa comunque per il punto (0;0) ma che ha una pendenza diversa da 1, questa infatti è 1.13. Tenendo in considerazione però gli intervalli di confidenza che contengono 1 per la pendenza e 0 per l'intercetta non è possibile escludere che le misurazioni effettuate sui due apparecchi siano identiche.

Per tutte le analisi, i coefficienti di variazione inter e intra-assay sono inferiori al 10%, solitamente per questo tipo di analisi sierologiche si accettano dei coefficienti di variazione del 10-20%. Si può quindi affermare che l'Access2 non ha variazioni significative tra un'analisi e l'altra e con il passare dei giorni.

5 Conclusione

Durante lo stage presso l'Ospedale Regionale di Lugano (ORL) sede Ospedale Civico in EOLAB sono stata incaricata d'introdurre alcune analisi infettivologiche per rilevare la presenza del virus HIV (Human Immunodeficiency Virus), del virus dell'epatite C ed epatite B sullo strumento Access2 della ditta Beckman. Le analisi di sierologia infettiva, al momento, vengono effettuate sullo strumento Axsym della ditta Abbott.

L'obiettivo del mio Lavoro di Diploma era quello di validare cinque analisi di sierologia (HIV1/2, HCV, HBsAG, HBc Ab ed anti-HBs) sull'apparecchio Access2 della ditta Beckman confrontando i risultati con quelli ottenuti in precedenza sull'apparecchio Axsym della ditta Abbott.

I risultati per le diverse analisi mostrano come i due apparecchi lavorino in modo uguale. Infatti per l'analisi del HIV1/2, del HBsAG e del HBc Ab non ci sono state discordanze. Per l'analisi del HCV ci sono state delle discordanze, ma malgrado questo la analisi statistiche dimostrano che l'Access2 non ha differenze rilevanti rispetto all'Axsym. Infatti la maggior parte dei campioni che discordano hanno un risultato di conferma che concorda con il risultato dell'Access2. L'analisi statistica per anti-HBs dimostra che i risultati tra i due apparecchi non sono significativamente diversi.

Per queste ragioni le analisi sono state validate su Access2 della ditta Beckman. Inoltre l'Access2 sostituisce ora l'apparecchio Axsym della ditta Abbott.

Per quanto riguarda il laboratorio TTD del Servizio Trasfusionale CRS della Svizzera Italiana, sull'Access2 vengono effettuate le analisi di campioni di donatori ripetutamente positive su sull'Autoanalyser Evolis e per i campioni per le analisi di aferesi d'urgenza.

Per il laboratorio ORL di EOLAB, l'apparecchio Access2 della ditta Beckman è utilizzato per le analisi d'urgenza nel caso di contatto accidentale con liquido biologico per il personale EOC per l'analisi anti-HBs, o per eventuali analisi del HBsAG nelle ore notturne o nel fine settimana per le partorienti che non hanno mai fatto l'analisi durante la gravidanza.

Dati i risultati di validazione, l'obiettivo del mio lavoro è stato raggiunto, le analisi sono validate su Access2 della ditta Beckman. L'Access2 è ora in funzione nel laboratorio ORL di EOLAB e per il laboratorio TTD del Servizio Trasfusionale CRS della Svizzera Italiana.

6 Ringraziamenti

Ringrazio coloro che mi hanno aiutato per questo lavoro. In primo luogo ringrazio il Dr. Franco Keller Capo dipartimento di medicina di laboratorio dell'EOC per avermi concesso di effettuare il lavoro di diploma in EOLAB. Ringrazio inoltre Giorgio Dal Bò capo laboratorio dell'Ospedale Regionale di Lugano per aver permesso che effettuassi il lavoro di diploma nel suo laboratorio. Ringrazio la Dott.ssa Claudia Steinemann, mia responsabile durante il lavoro di diploma, per tutti i consigli, per l'aiuto durante il lavoro pratico e per l'aiuto della stesura del lavoro. Inoltre ringrazio il Dr. Mauro Iperiali per il grande aiuto con le analisi statistiche, la loro interpretazione e per aver corretto il mio lavoro.

Ringrazio Barbara Guggiari per l'aiuto durante alcune fasi della parte pratica e per l'appoggio durante alcune fasi critiche del lavoro. Ringrazio inoltre tutti i TAB del laboratorio ORL per l'appoggio e l'aiuto durante il mio lavoro.

Ringrazio gli docenti di metodologia Dr. Mauro Gola, Sonja Marci e Claudio Naiaretti.

Ringrazio la docente d'inglese Susan Gilbert per l'aiuto nella stesura dell'abstract.

Infine, ma non da ultimo, ringrazio il docente Giovanni Togni per la correzione del mio lavoro di diploma.

7 Bibliografia

- [1] Bio-Rad, *Access Immunoassay System HIV combo*.
- [2] A. Demarta, *Dispense Microbiologia*, Corso 2010-2012.
- [3] «www.avert.org,» 2013. [Online]. Available: <http://www.avert.org/media-gallery/image-115-the-structure-of-hiv>. [Consultato il giorno 5 Marzo 2013].
- [4] «<http://www.nature.com>,» 2001. [Online]. Available: http://www.nature.com/embor/journal/v4/n6s/fig_tab/embor857_F2.html. [Consultato il giorno 15 Aprile 2013].
- [5] «www.who.int,» 2013. [Online]. Available: <http://www.who.int/gho/hiv/en/>;
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>;
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>. [Consultato il giorno 5 marzo 2013].
- [6] Abbott Diagnostic, *Hepatitis Learning Guide*, 2011.
- [7] «wanglab.medicine.ufl.edu,» 6 gennaio 2013. [Online]. Available: <http://wanglab.medicine.ufl.edu/index.php>. [Consultato il giorno 5 marzo 2013].
- [8] Bio-Rad, *Access HCV Ab PLUS*.
- [9] «www.medlibes.com,» 5 agosto 2010. [Online]. Available: <http://medlibes.com/entry/hepatitis-b>. [Consultato il giorno 5 marzo 2013].
- [10] «www.atlantemedicina.wordpress.com,» 24 ottobre 2009. [Online]. Available: <http://atlantemedicina.wordpress.com/category/medicina-di-laboratorio/>. [Consultato il giorno 5 marzo 2013].
- [11] Beckman Coulter, *Manuale Access2*.
- [12] Beckman Coulter, *Access Immunoassay System HBs Ag*, 2011.
- [13] Beckman Coulter, *Access Immunoassay System HBc Ab*, 2011.
- [14] Beckman Coulter, *Access Immunoassay System HBs Ab*, 2011.
- [15] L. Soliani, «<http://www.dsa.unipr.it/soliani>,» Aprile 2005. [Online]. Available: <http://www.dsa.unipr.it/soliani/capu20.pdf>; <http://www.dsa.unipr.it/soliani/capu24.pdf>. [Consultato il giorno 8 aprile 2013].

8 Allegati

8.1 Allegato 1

Risultati HVI1/2

Paziente	Access2	Axsym
21030033	Negativo	Negativo
21030036	Negativo	Negativo
21030037	Negativo	Negativo
21105030	Negativo	Negativo
21106002	Negativo	Negativo
21106001	Negativo	Negativo
21105026	Negativo	Negativo
21105025	Negativo	Negativo
21106012	Negativo	Dubbio
21106015	Negativo	Negativo
21106017	Negativo	Negativo
21127005	Negativo	Negativo
21127004	Negativo	Negativo
21126002	Negativo	Negativo
21125001	Negativo	Negativo
21124002	Negativo	Negativo
21123020	Negativo	Negativo
21123015	Negativo	Negativo
21123019	Negativo	Negativo
21121016	Negativo	Negativo
20728010	Reattivo	Reattivo
21009029	Reattivo	Reattivo
20926023	Reattivo	Reattivo
21031015	Reattivo	Reattivo
21106012	Negativo	Dubbio
21114015	Negativo	Dubbio
21127017	Reattivo	Reattivo
21024003	Reattivo	Reattivo
V8	Reattivo	Reattivo
V9	Negativo	Negativo
7313	Reattivo	Reattivo
4641	Reattivo	Reattivo
3842	Reattivo	Reattivo
705	Reattivo	Reattivo
1768	Reattivo	Reattivo
5590	Reattivo	Reattivo
6472	Reattivo	Reattivo
7200	Reattivo	Reattivo
7250	Reattivo	Reattivo
6286	Reattivo	Reattivo
2510	Reattivo	Reattivo
11112	Reattivo	Reattivo
7426	Reattivo	Reattivo

7429	Reattivo	Reattivo
7968	Reattivo	Reattivo
2012-407	Negativo	Negativo
2012-408	Reattivo	Reattivo
2012-409	Reattivo	Reattivo

8.2 Allegato 2

Risultati HCV

Paziente	Access2	Axsym	Commenti	
21031002	Negativo	Negativo		
21030013	Negativo	Negativo		
21030029	Negativo	Negativo		
21031011	Reattivo	Reattivo	Pz Nota	
21031021	Reattivo	Reattivo	Pz Nota	
21029003	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
21025027	Reattivo	Reattivo	Pz Noto	
21106012	Negativo	Negativo		
21106015	Negativo	Negativo		
21106017	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
21003004	Reattivo	Reattivo		
21011012	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
21025002	Reattivo	Reattivo	Pz Noto	
21105028	Negativo	Negativo		
21105030	Negativo	Negativo		
21003003	Reattivo	Reattivo	Pz Noto	
20929001	Negativo	Reattivo	Test Conf. Indeterminato	PCR Negativo
20928010	Reattivo	Dubbio	Test Conf. Indeterminato	PCR Negativo
20913023	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
20913003	Negativo	Dubbio	Test Conferma Negativo	
20912001	Reattivo	Reattivo	Pz Noto	
20904003	Reattivo	Reattivo	Pz Nota	
20903013	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
20823002	Reattivo	Reattivo	Pz Noto	
20720010	Reattivo	Reattivo	Pz Noto	
20719012	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
20718001	Reattivo	Reattivo	Pz Nota	
20709018	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
20705006	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
H009008091824	Negativo	Dubbio	Test Conferma Negativo	Ripeto
H009011135127	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
H009006059408	Reattivo	Negativo		Ripeto
H009006059408	Reattivo		Dopo Ripetizione	
6042004	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
6424003	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
20929001	Negativo	Reattivo	Test Conf. Indeterminato	PCR Negativo
6310005	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
H009012149242	Negativo	Negativo		
H009012149066	Negativo	Negativo		
H009012149053	Negativo	Negativo		

H009012149051	Negativo	Negativo		
H009012149361	Negativo	Negativo		
H009012149103	Negativo	Negativo		
H009012149102	Negativo	Negativo		
H009012149072	Negativo	Negativo		
H009008091824	Negativo		Dopo Ripetizione	
H009012149355	Negativo	Negativo		
H009012149347	Negativo	Negativo		
H009012149132	Negativo	Negativo		
H009012149189	Negativo	Negativo		
H009012149075	Negativo	Negativo		
H009012149079	Negativo	Negativo		
H009012148823	Negativo	Negativo		
H009012148818	Negativo	Negativo		
H009012149362	Negativo	Negativo		
H009012148822	Negativo	Negativo		
H009012148820	Negativo	Negativo		
H009012148668	Negativo	Negativo		
H009012148691	Negativo	Negativo		
H009012148667	Negativo	Negativo		
H009012148545	Negativo	Negativo		
H009012148586	Negativo	Negativo		
H009012148544	Negativo	Negativo		
H009012149636	Negativo	Negativo		
H009012149632	Negativo	Negativo		
2012-401 QcEst	Reattivo	Reattivo		
2012-402 QcEst	Negativo	Negativo		
2012-403 QcEst	Reattivo	Reattivo		
V8 CqEst	Reattivo	Reattivo		
V9 CqEst	Negativo	Negativo		
20720022	Reattivo	Reattivo	Pz Noto	
20730003	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo	
20703037	Reattivo	Reattivo	Pz Nota	
21123016	Negativo	Negativo		

8.3 Allegato 3

Risultati HBsAG

Paziente	Access2	Axsym	Commento
H00901214910322	Negativo	Negativo	
H00901214910222	Negativo	Negativo	
H00901214907222	Negativo	Negativo	
H00901214906622	Negativo	Negativo	
H00901214905322	Negativo	Negativo	
H00901214905122	Negativo	Negativo	
H00901214936122	Negativo	Negativo	
H00901214936222	Negativo	Negativo	
H00901214935522	Negativo	Negativo	
H00901214934722	Negativo	Negativo	
H00901214913222	Negativo	Negativo	

H00901214918922	Negativo	Negativo	
H00901214907522	Negativo	Negativo	
H00901214907922	Negativo	Negativo	
H00901214882322	Negativo	Negativo	
H00901214881822	Negativo	Negativo	
H00901214882222	Negativo	Negativo	
H00901214882022	Negativo	Negativo	
H00901214866822	Negativo	Negativo	
H00901214869122	Negativo	Negativo	
H00901214866722	Negativo	Negativo	
H00901214854522	Negativo	Negativo	
H00901214858622	Negativo	Negativo	
H00901214854422	Negativo	Negativo	
H00901214963622	Negativo	Negativo	
H00901214963222	Negativo	Negativo	
20808006	Reattivo	Reattivo	Pz Noto
20911028	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo
20917010	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo
20917021	Reattivo	Reattivo	Pz Nota
21024011	Reattivo	Reattivo	Pz Noto
21004005	Reattivo	Reattivo	Test Conferma Positivo
21106036	Reattivo	Reattivo	Pz Noto
21010006	Negativo	Negativo	
30.05.1975	Reattivo	Reattivo	
61010003	Reattivo	Reattivo	
H00900808655022	Reattivo	Reattivo	
H00901113539822	Reattivo	Reattivo	
80215009	Reattivo	Reattivo	
H00901214107522	Negativo	Negativo	
H00901012205122	Reattivo	Reattivo	
H00900606261722	Reattivo	Reattivo	
H00900606562522	Reattivo	Reattivo	
V8 CqEst	Reattivo	Reattivo	
V9 CqEst	Negativo	Negativo	
2012-404 CqEst	Reattivo	Reattivo	
2012-405 CqEst	Reattivo	Reattivo	
2012-406 CqEst	Negativo	Negativo	
21127005	Negativo	Negativo	
21124002	Negativo	Negativo	

8.4 Allegato 4

Risultati HBc Ab

Paziente	Access2	Axsym
21113021	Negativo	Negativo
21112007	Negativo	Negativo
21112005	Negativo	Negativo
21109015	Positivo	Positivo
21108006	Positivo	Positivo

21107008	Positivo	Positivo
21103002	Positivo	Positivo
21102006	Negativo	Negativo
21019007	Positivo	Positivo
21102002	Negativo	Negativo
21030019	Positivo	Positivo
21018008	Positivo	Positivo
21102004	Negativo	Dubbio
20827001	Negativo	Dubbio
21018014	Negativo	Negativo
61010003	Positivo	Positivo
H00900808655022	Positivo	Positivo
H00901113539822	Positivo	Positivo
80215009	Positivo	Positivo
H00901214107522	Negativo	Negativo
H00901012205122	Positivo	Positivo
H00900606261722	Positivo	Positivo
H00900606562522	Positivo	Positivo
21122021	Positivo	Positivo
21122007	Negativo	Negativo
21122004	Negativo	Negativo
21120018	Negativo	Negativo
21120019	Negativo	Negativo
21119026	Negativo	Negativo
21115011	Positivo	Positivo
21109015	Positivo	Positivo
21019007	Positivo	Positivo
21016002	Negativo	Negativo
21016001	Negativo	Negativo
21015010	Positivo	Positivo
21015007	Negativo	Negativo
21012003	Positivo	Positivo
21012004	Negativo	Negativo
21011027	Negativo	Negativo
21011009	Negativo	Negativo
21011008	Negativo	Negativo
2012-404 CqEst	Negativo	Negativo
2012-405CqEst	Positivo	Positivo
2012-406CqEst	Positivo	Positivo
21124002	Negativo	Negativo

8.5 Allegato 5

Risultati anti-HBs

Paziente	Access2	Axsym
21110213	>787	5423.8
21112007	0	0
21112006	127.3	153.3
21112005	0	0
21109029	117.4	140.3

21109026	>787	510.6
21109025	>787	>25000
H009012149632	13.4	5.7
H009012149610	654.2	388
H009012149610	535.4	388
H009012148668	>787	25000
61010003	0.9	0.2
H00900808655022	0	0
H00901113539822	4.5	0
80215009	0	0
H00901214107522	0	0
H00900606261722	1	0
H00901012205122	0.4	0
H00900606562522	0.1	0
21108025	40.3	22.4
21108020	98.5	117.9
21108016	0.4	1.3
21107004	19.6	21.2
21106015	24.5	25.5
21106011	1.2	2.6
21030036	21.8	45.5
21030035	27.3	50
2012-404 CqEst	0.1	0
2012-405 CqEst	0.1	3.5
2012-406 CqEst	654.2	563.2
21126004	288.6	148.5
21124003	402.7	322.7
21124002	0.2	0
21123015	10.7	13
21122021	37.2	2.1
21122017	2.9	4.2
21122020	16.9	33
21121012	3	2
21122006	32	14.2
21120013	7.4	12.8
21123015	11.2	13