

Report dell'esercizio pilota per il Test all'Antiglobulina Diretto (DAT) 16R4 distribuito il 18 Aprile 2016

Introduzione

Dopo il risultato favorevole dei campioni pre-pilota DAT inviati con gli esercizi 15R7 e 15R9, UKNEQAS (BTLP) ha preso la decisione di procedere verso un esercizio pilota completo per il DAT. L'obiettivo principale dell'esercizio pilota DAT inviato con l'esercizio 16R4, era di valutare la stabilità degli eritrociti rivestiti con complemento, in termini di qualità del campione per un periodo di tempo di due settimane, per l'inserimento futuro del DAT in un programma BTLP completo. Questo è stato il primo esercizio di un ciclo di quattro esercizi del 2016-17.

Ai partecipanti è stato richiesto di testare i due campioni etichettati come DAT 1 e DAT 2 allo stesso modo di come farebbero per dei campioni clinici per i quali è richiesto un DAT. I partecipanti sono stati invitati a testare i campioni non appena possibile dopo la ricezione (settimana 1) e a ripetere il test nella settimana 2, come parte della stabilità del test.

I risultati sono stati raccolti attraverso un questionario on-line SurveyMonkey.

La conferma della registrazione dei partecipanti ai programmi BTLP ha dato la possibilità di essere inclusi nello studio pilota DAT, e lo schema ha visto una grande diffusione. La maggior parte dei laboratori partecipanti è situata nel Regno Unito e nella Repubblica d'Irlanda (ROI), e la sezione 1 della presente relazione mostra l'analisi dei dati di questi laboratori. I campioni pilota sono stati inviati anche a sessantasei laboratori all'estero. La sezione 2 include i dati provenienti da questi laboratori non britannici.

Questi dati sono stati analizzati e riportati separatamente come dati grezzi, in quanto nessun follow-up di risultati apparentemente anomali è stato eseguito. La sezione 3 della presente relazione contiene la discussione e le conclusioni tratte dall'analisi dei dati restituiti.

Materiale

E' stato fornito il seguente materiale:

- Due campioni di globuli rossi (sospesi in plasma e soluzione di Alsever) per il test diretto all'antiglobulina (DAT).
- DAT 1 era DAT negativo
- DAT 2 era rivestito con C3d per dare una reazione 2+.

I gradi di reazione citati si basano su test di pre-accettazione eseguiti in-house.

I campioni DAT dovevano essere preparati a seconda della tecnologia utilizzata.

Sezione 1 – Risultati DAT 16R4 DAT in UK e ROI (Repubblica di Irlanda)

Percentuale di risposta

I campioni sono stati distribuiti a 225 laboratori nel Regno Unito e nella Repubblica d'Irlanda (ROI). La percentuale di ritorno dei dati per i laboratori del Regno Unito e ROI è stata di 178/225 (79,1%), con un laboratorio britannico che ha restituito due serie di risultati (per due diverse tecnologie).

Tutti i laboratori hanno riferito che avevano ricevuto i campioni tra il 18/04/2016 e il 24/04/2016, vale a dire durante la settimana 1. Di questi, 131/178 (73,6%) ha riferito di aver testato entrambi i campioni durante la settimana 1 e ancora una volta durante la settimana 2 (dal 25/04/2016 al 03/05/2016), e fornito i risultati del test. Il report per il DAT pre-pilota, inviato con gli esercizi 15R7 e 15R9, includeva solo i risultati dei laboratori che avevano testato i campioni nei tempi giusti e che avevano fornito i risultati del test. Questo rapporto include tutti i risultati inviati, anche quelli testati una sola volta. I laboratori del Regno Unito e della ROI sono stati contattati per telefono per chiarire gli errori di trascrizione e di trasposizione.

Qualità riportata dei campioni

Dei 175 laboratori che hanno restituito una risposta sulla qualità dei campioni durante la settimana 1, 164 (93,7%) hanno riferito una qualità soddisfacente per entrambi i campioni DAT sulla prima ispezione durante la settimana 1. Degli 11 laboratori che hanno segnalato come non soddisfacente la qualità del campione durante la settimana 1, 2 hanno segnalato lieve emolisi in entrambi i campioni, e 7 hanno riportato emolisi solamente nel campione DAT 2. I rimanenti 2 laboratori hanno restituito come risposta di 'altro', affermando che la concentrazione di entrambi i campioni era troppo scarsa.

Dei 170 laboratori che hanno restituito una risposta sulla qualità del campione durante la settimana di 2, 120 (70,6%) hanno riferito una qualità del campione soddisfacente per entrambi i campioni DAT sulla nuova ispezione durante la settimana 2. Dei 50 laboratori che hanno segnalato una qualità del campione non soddisfacente durante la settimana 2, 18 hanno segnalato lieve o significativa emolisi in entrambi i campioni, 29 solo nel campione DAT 2 e 3 hanno segnalato come risposta di 'altro', affermando che le sospensioni cellulari erano troppo scarse o i campioni erano stati smarriti.

Risultati dei test in house

I risultati del DAT con i test eseguiti in-house con Bio-Rad alla distribuzione e alla chiusura dell'esercizio 16R4 hanno dimostrato che il DAT 1 era negativo e che il DAT 2 era negativo vs. anti-IgG e positivo 2+ vs. anti-C3d.

Partecipanti risultati DAT

Risultati DAT 1 (negativo)

Un totale di 107 laboratori ha riportato i risultati contro AHG polispecifiche per DAT 1 alla settimana 1 o 2 o per entrambe. Un laboratorio ha riportato un falso risultato positivo vs. AHG polispecifiche nella settimana 1 e un risultato negativo alla settimana 2. Quando contattato, questo laboratorio ha confermato che la reazione era molto debole e che le schedine erano state lette e interpretate con un metodo manuale. Questo laboratorio ha inoltre registrato reazioni negative vs. anti-IgG e anti-C3d.

Un totale di 100 laboratori ha riportato risultati vs. anti-C3d per DAT 1 sia nella settimana 1 o 2 o per entrambi. Un laboratorio ha riportato un falso risultato positivo contro anti-C3d in settimana 1 solo e un altro laboratorio solamente in settimana 2. Entrambi i laboratori hanno riportato un risultato negativo vs. anti-C3d nel corso della settimana alterna. Quando contattati, entrambi i laboratori hanno confermato di aver fatto errori di immissione dei dati, uno di trascrizione, e l'altro di trasposizione con i risultati per DAT 2.

Risultati DAT 2 (positivo 2+ vs anti-C3d)

Le tabelle da 1 a 4 mostrano i gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. AHG polispecifiche e anti-C3d in settimana 1 e in settimana 2 per tutti i laboratori che hanno restituito i risultati.

Tabella 1. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. AHG polispecifiche in settimana 1 (n=139)

Reaction grade	Number of results
3+	7
2+	29
1+	43
Weak	2
Mixed field	1
Negative	4
Not tested	53

Tabella 2. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. anti-C3d in settimana 1 (n=139)

Reaction grade	Number of results
4+	1
3+	19
2+	55
1+	46
Negative	2
Not tested	16

Tabella 3. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. AHG polispecifiche in settimana 2 (n=171)

Reaction grade	Number of results
4+	1
3+	7
2+	24
1+	47
Weak	16
Mixed field	2
Negative	6
Not tested	68

Tabella 4. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. anti-C3d in settimana 2 (n=171)

Reaction grade	Number of results
3+	24
2+	46
1+	67
Weak	6
Negative	2
Not tested	26

In totale, undici laboratori hanno riportato una o più reazioni negative vs. AGH polispecifiche o anti C3d in settimana 1 o 2 , o in entrambe. Di questi, tre laboratori hanno testato vs. solo AHG polispecifiche, e riferito reazioni negative in entrambe le settimane. Uno di questi laboratori quando contattato, ha confermato che non era in grado di utilizzare la loro automazione e invece aveva utilizzato un metodo manuale. 2/11 laboratori hanno riportato il DAT 2 come negativo vs. anti-C3d nella settimana 1 e registrato il campione come positivo alla settimana 2, ed entrambi questi laboratori, quando contattati hanno riferito di aver commesso errori di trasposizione sull' inserimento dei dati, uno con i risultati vs. anti-IgG per DAT 2 e uno per il risultato per il DAT 1, come sopra descritto. I restanti 3/11 laboratori che hanno riportato reazioni negative vs. AGH polispecifiche o anti-C3d nella settimana 2 avevano riferito reazioni positive nella settimana 1.

Le tabelle 5 e 6 mostrano i gradi di reazione ottenuti per DAT 2 nella settimana 1 rispetto a quelli ottenuti nella settimana 2 vs. AHG polispecifiche e anti-C3d, rispettivamente. Le celle ombreggiate rappresentano reazioni identiche in entrambe le settimane.

Tabella 5. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. AHG polispecifiche in settimana 1 vs. settimana 2 (n=139)

No. results	DAT 2 vs Polyspecific AHG							
	Result week 1	Result week 2						
		3+	2+	1+	Weak	MF	Neg	Not tested
7	3+	3	3	0	0	0	0	1
29	2+	2	18	5	2	0	1	1
43	1+	0	0	30	13	0	0	0
2	Weak	0	0	2	0	0	0	0
1	Mixed field	0	0	0	0	1	0	0
4	Negative	0	0	0	0	0	3	1
53	Not tested	0	0	0	0	0	0	53

Tabella 6. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. anti-C3d in settimana 1 vs. settimana 2 (n=139)

No. results	DAT 2 vs Anti-C3d only						
	Result week 1	Result week 2					
		3+	2+	1+	Weak	Neg	Not tested
1	4+	1	0	0	0	0	0
19	3+	11	4	1	0	0	3
55	2+	2	35	11	3	2	2
46	1+	0	1	41	2	0	2
2	Negative	0	1	1	0	0	0
16	Not tested	0	0	1	0	0	15

Escludendo un possibile errore di trasposizione, un totale di 15 laboratori ha riportato falsi risultati positivi contro anti- IgG, in una o entrambe le settimane. Di questi, dieci laboratori hanno riportato una reazione positiva con il reagente di controllo negativo, e tutti questi utilizzano la tecnologia BioVue. Tre laboratori hanno proceduto a segnalare una reazione di controllo negativa quando hanno ripetuto il test in provetta con cellule lavate, e un altro laboratorio ha registrato una riduzione del grado di reazione del controllo sul nuovo test anche con le cellule lavate. Quattro altri laboratori hanno segnalato che avrebbero inviato un campione clinico simile a un laboratorio di riferimento per ricerca / conferma.

La tabella 7 riassume il numero di laboratori che hanno registrato una reazione di grado più forte, invariata o più debole nella settimana 2 rispetto a quella registrata per la settimana 1, laddove i laboratori hanno riportato un set completo di risultati durante il periodo di tempo specificato corretto. Coloro che dichiarano reazioni incoerenti a causa errori di trascrizione o di trasposizione, e quelli che hanno cambiato una reazione MF (a campi misti) nella settimana 2, sono stati esclusi.

Tabella 7. Numero di risultati dei laboratori che hanno registrato una reazione di grado più forte, invariata o più debole nella settimana 2 rispetto alla settimana 1 (n=191)

Results	Reaction grade recorded in week 2 compared to week 1		
	Stronger	Unchanged	Weaker
DAT 2 vs. polyspecific AHG (n=78)	4	50	24
DAT 2 vs. anti-C3d (n=113)	3	86	24

Qualità dei campioni riportata vs risultati

I dati provenienti dai 37 laboratori che hanno segnalato una qualità del campione insoddisfacente per DAT 2 solamente nella settimana 2 (pari a 48 risultati) sono stati analizzati per vedere se ci fosse qualche correlazione tra il deterioramento del campione (esaminato dalla qualità del campione riportata) e un grado di reazione più debole riportato nella settimana 2. Per questi 37 laboratori, i risultati di 9/48 (18,8%) erano stati più deboli nella settimana 2 in confronto ai risultati di 37/135 (27,4%) dei 90 laboratori che avevano segnalato una qualità del campione soddisfacente in entrambe le settimane.

Sezione 2 – Risultati DAT 16R4 DAT per i laboratori esteri

Percentuale di risposta

I risultati sono stati restituiti da 59/66 laboratori (89,4%). Di questi 59 laboratori, 48 (81,4%) hanno riferito che avevano ricevuto i campioni tra il 18/04/2016 e il 24/04/2016, vale a dire durante la settimana 1. Di questi, 45/48 (93,8%) ha riferito di aver testato entrambi i campioni durante la settimana 1 e di nuovo durante la settimana 2 (25/04/2016- 03/05/2016), e fornito i risultati dei test. Questo rapporto, tuttavia, include tutti i risultati inviati, anche se testati solo una volta. I laboratori non sono stati contattati telefonicamente per chiarire errori di trascrizione e di trasposizione.

Qualità riportata dei campioni

Il 96% dei laboratori esteri ha riportato una risposta alla domanda sulla qualità dei campioni. 50/57 (87,7%) hanno risposto che la qualità era soddisfacente per entrambi i campioni alla settimana 1. 7/57 laboratori (12,3%) hanno risposto che la qualità era insoddisfacente per uno o entrambi i campioni alla settimana 1, tutti segnalando una lieve emolisi. 18/57 laboratori (31,6%) hanno riportato una qualità insoddisfacente del campione per uno o entrambi i campioni alla settimana 2, segnalando la presenza di emolisi da leggera a evidente.

Risultati DAT partecipanti

Risultati DAT 1 (negativo)

Un totale di 54 laboratori ha riportato i risultati vs. AHG polispecifiche per DAT 1 sia alla settimana 1 o alla settimana 2 o in entrambe. Tutti i laboratori che hanno riportato i risultati vs. AHG polispecifiche e/o antisieri monospecifici hanno registrato un risultato negativo.

Risultati DAT 2 (positive 2 + vs anti-C3d)

Le tabelle da 8 a 11 mostrano i gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. AHG polispecifiche e anti-C3d alla settimana 1 e alla settimana 2 per tutti i laboratori che hanno inviato i risultati.

Tabella 8. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. AHG polispecifiche in settimana 1 (n=49)

Reaction grade	Number of results
4+	1
3+	2
2+	15
1+	21
Weak	3
Mixed field	2
Negative	0
Not tested	5

Tabella 9. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. anti-C3d in settimana 1 (n=49)

Reaction grade	Number of results
3+	3
2+	23
1+	11
Weak	2
Negative	2
Not tested	8

Tabella10. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. AHG polispecifiche in settimana 2 (n=56)

Reaction grade	Number of results
3+	2
2+	13
1+	21
Weak	10
Mixed field	3
Negative	2
Not tested	5

Tabella 11. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. anti-C3d in settimana 2 (n=56)

Reaction grade	Number of results
3+	1
2+	17
1+	22
Weak	3
Negative	2
Not tested	11

Le tabelle 12 e 13 mostrano i gradi di reazione ottenuti per DAT 2 alla settimana 1 vs. quelli ottenuti alla settimana 2 vs. AHG polispecifiche e anti-C3d, rispettivamente. Le celle ombreggiate rappresentano reazioni identiche in entrambe le settimane.

Tabella 12. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. AHG polispecifiche in settimana 1 vs settimana 2 (n=59)

No. results	DAT 2 vs Polyspecific AHG							
	Result week 1	Result week 2						
		3+	2+	1+	Weak	MF	Neg	Not tested
1	4+	0	1	0	0	0	0	0
2	3+	1	1	0	0	0	0	0
15	2+	0	7	5	1	2	0	0
21	1+	0	2	12	5	0	0	2
3	Weak	0	0	0	2	0	1	1
2	Mixed field	0	1	0	0	1	0	0
0	Negative	0	0	0	0	0	0	0
15	Not tested	1	1	4	2	0	1	6

Tabella13. Gradi di reazione ottenuti per DAT 2 vs. anti-C3d in settimana 1 vs settimana 2 (n=59)

No. results	DAT 2 vs anti-C3d						
	Result week 1	Result week 2					
		3+	2+	1+	Weak	Neg	Not tested
3	3+	1	2	0	0	0	0
23	2+	0	9	11	2	0	1
11	1+	0	1	8	1	0	1
2	Weak	0	1	0	0	0	1
2	Negative	0	0	0	0	1	1
18	Not tested	0	4	3	0	1	10

Sezione 3 - Discussione e conclusioni dei risultati UK

Discussione

Lo scopo primario di questo esercizio pilota DAT è stato quello di valutare la stabilità dei globuli rossi rivestiti con complemento, prima dell'introduzione di un sistema completo per DAT come esercizio EQA.

Qualità riportata dei campioni

Per l'esercizio 16R4, una qualità soddisfacente dei campioni è stata riportata dal 93,2% dei laboratori alla settimana 1, con il 27,6% che ha segnalato alcune emolisi per uno o entrambi i campioni alla settimana 2. Non c'era alcuna correlazione tra la qualità del campione riportata e i gradi di reazione segnalati.

Gradi di reazione ottenuti

La maggior parte delle classi di reazione riportate dai singoli laboratori per il campione positivo DAT (DAT 2) è rimasta invariata tra la settimana 1 e la settimana 2.

I risultati hanno dimostrato che vi è un *bias* verso la registrazione di reazioni più deboli alla settimana 2, con un complessivo 25% di reazioni registrate che si riduce. La segnalazione di un grado reazione più basso alla settimana 2 non appare essere collegata a qualche tecnologia specifica.

Risultati imprevisti

Ci sono stati pochissimi risultati falsi positivi riportati per DAT 1 sia alla settimana 1 o 2. Un laboratorio, che è stato costretto a utilizzare un metodo manuale, ha riferito una reazione debolmente positiva vs. AHG polispecifiche, ma ha riportato reazioni negative vs. anti-IgG e anti-C3d. I restanti risultati falsi positivi per DAT 1 sono stati rivelati essere dovuti a errori di trascrizione e di trasposizione. Nel complesso, escludendo un possibile errore di trascrizione, 15 laboratori hanno riportato una falsa reazione positiva vs. anti-IgG per DAT 2 in uno o entrambe le settimane. Dieci di questi laboratori, tutti utilizzatori BioVue, hanno continuato a segnalare una reazione positiva (debole 2+) in un pozzetto di controllo interno negativo. Una minoranza di laboratori ha riportato una forte reazione positiva in un controllo reagente interno, forse dopo un'incomprensione della domanda su SurveyMonkey.

L'inserimento dei risultati del DAT nel sistema gestionale informatico in un laboratorio clinico può essere un processo manuale, o in alcuni casi i gradi di reazione possono essere trasmessi automaticamente al sistema, ma richiedono l'immissione manuale dell'interpretazione del DAT. E' richiesta particolare cura in caso di inserimento manuale e/o di interpretazione dei risultati di qualsiasi test in un sistema gestionale informatico, e dovrebbe sempre essere presente una fase di verifica come parte della buona pratica di laboratorio.

La sezione 2 mostra i dati ottenuti dai laboratori esteri, i cui risultati generalmente riflettono quelli riportati dai laboratori di Regno Unito e ROI.

Conclusioni

I risultati restituiti hanno mostrato che i campioni hanno dimostrato una ragionevole buona stabilità in un periodo di due settimane, anche se c'è stata una certa riduzione nel grado di reazione alla settimana 2. La riduzione associata al grado di reazione per la degradazione del campione vista in esercizi precedenti non era evidente in questo esercizio. Nel complesso, i dati raccolti per le cellule rivestite con complemento supportano quanto trovato negli esercizi 15R7 e 15R9 con cellule rivestite con IgG, che per gli esercizi futuri sarebbe opportuno un periodo di test di una settimana.

Il referente italiano UK NEQAS
for Blood Transfusion Laboratory Practice
Dott. Francesco Bennardello