

Introduzione

I partecipanti sono stati invitati a titolare l'anti-A in tre campioni di plasma da testare contro globuli rossi di gruppo A₁ rr forniti con l'esercizio. Le titolazioni dovevano essere eseguite con metodiche e tecniche di routine (utilizzando quelle per valutare l'idoneità del paziente da sottoporre a trapianto di organo ABO incompatibile da vivente, ove appropriato nella pratica clinica), e utilizzando anche la tecnica standard BioRad, laddove le risorse necessarie fossero disponibili.

Erano inclusi tre campioni di globuli rossi paziente per la tipizzazione A₁, per i laboratori che effettuano questo test nella pratica clinica.

Materiale

È stato fornito il seguente materiale:

- Tre campioni plasma 'pazienti' (Pazienti 1, 2 e 3), tutti di gruppo O; i Pazienti 1 e 3 erano preparati dallo stesso pool di plasma di materiale con un piccolo volume di anti-c ad alto titolo aggiunto al Paziente 3
- Cellule di gruppo A₁ rr per la titolazione
- Tre campioni di globuli rossi in soluzione di Alsever (Paziente W, Y e Z) per la tipizzazione A₁.

Tutti i campioni di plasma sono stati preparati da plasma fresco congelato filtrato.

Assieme alle istruzioni dell'esercizio (vedi Appendice 1) sono state fornite le tecniche standard BioRad per DRT e IAT e queste sono indicate in questo report come tecniche "Standard".

Percentuale di restituzione / analisi dei dati

L'esercizio è stato distribuito a 115 laboratori, 34 nel Regno Unito (UK) e nella Repubblica d'Irlanda (ROI) e 81 fuori dal Regno Unito. I risultati sono stati restituiti da 110/115 (95.7%) laboratori entro la data di chiusura.

Un laboratorio ha restituito risultati solo per la tipizzazione A₁ e non è incluso nella percentuale di restituzione sopra indicata.

Una qualità soddisfacente dei campioni è stata registrata da più del 98% dei laboratori per i Pazienti 1 e 2. Ventuno laboratori hanno registrato una qualità dei campioni non soddisfacente per il Paziente 3; venti laboratori hanno indicato che il campione non era utilizzabile per la titolazione usando le cellule A₁ fornite a causa della presenza di un alloanticorpo.

Il Paziente 3 è stato rimosso dal punteggio per la titolazione IAT in quanto i risultati riportati non riflettono il contenuto di anti-A del campione.

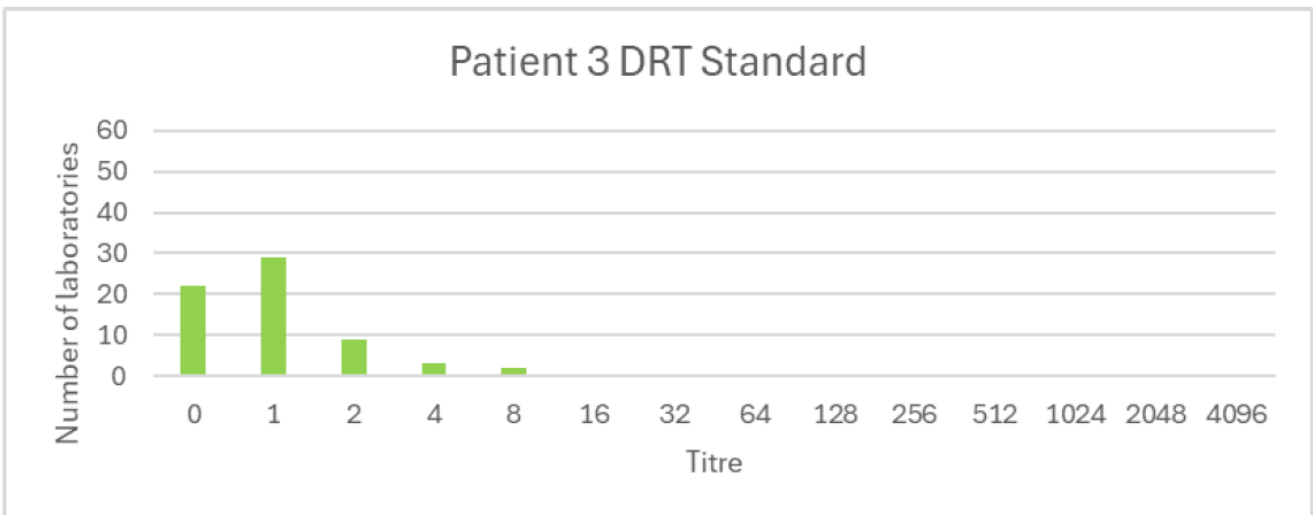
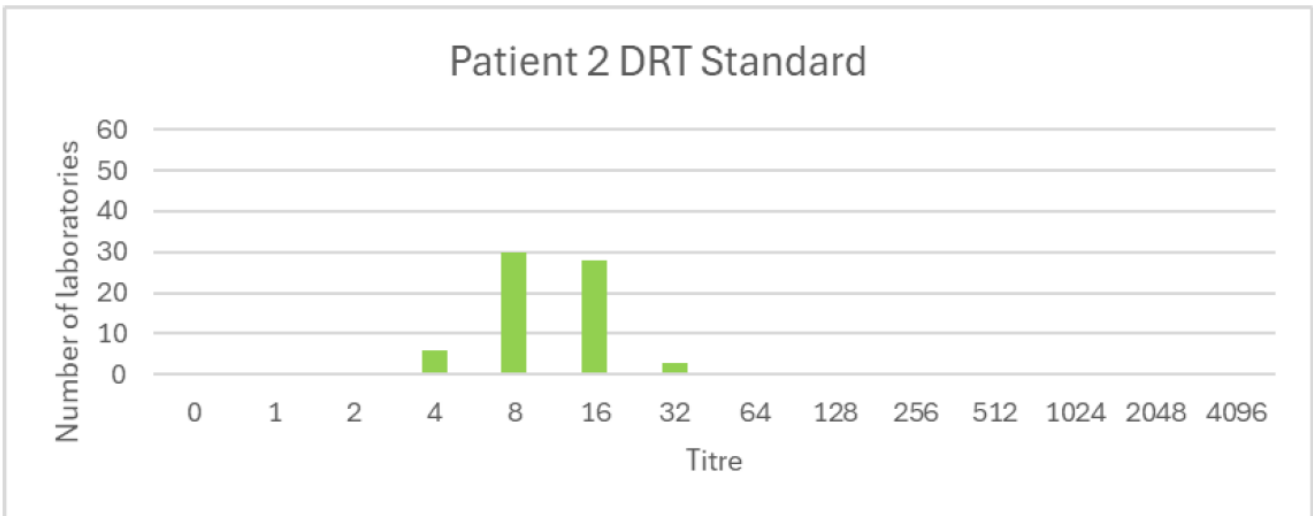
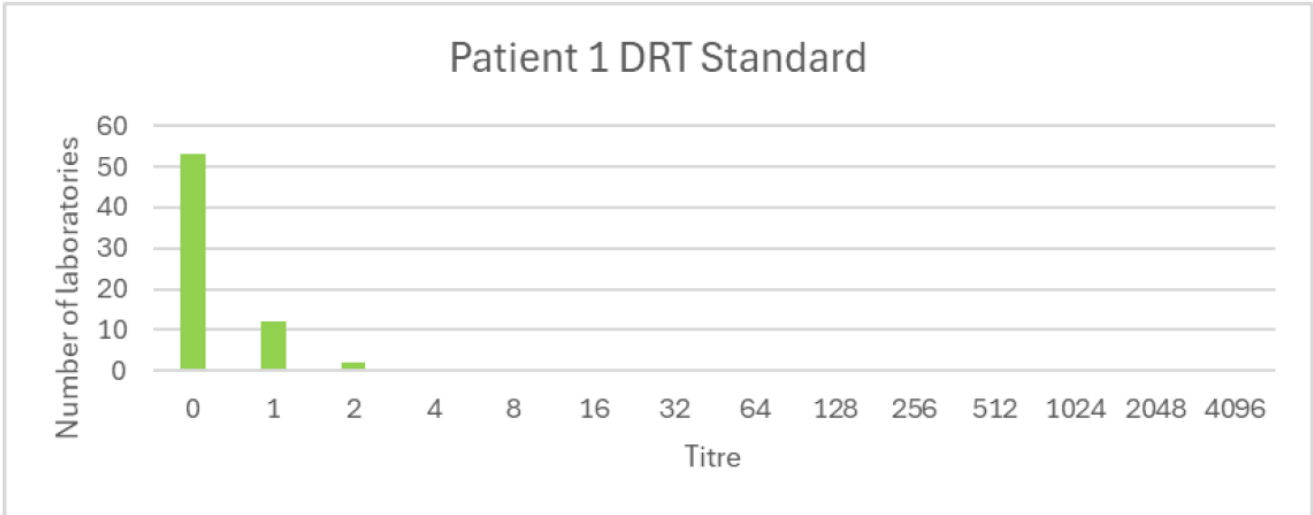
69/72 (95.8%) laboratori, riportando i risultati IAT Standard per entrambi i Pazienti 1 e 3, hanno riportato per il Paziente 3 risultati da quattro o più diluizioni più alte rispetto a quelle del Paziente 1.

La titolazione ABO viene eseguita per supportare programmi di trapianto ABO incompatibili in 89/110 (80.9%) laboratori che hanno risposto alla domanda; di questi, 57 supportano trapianti renali ABO incompatibili.

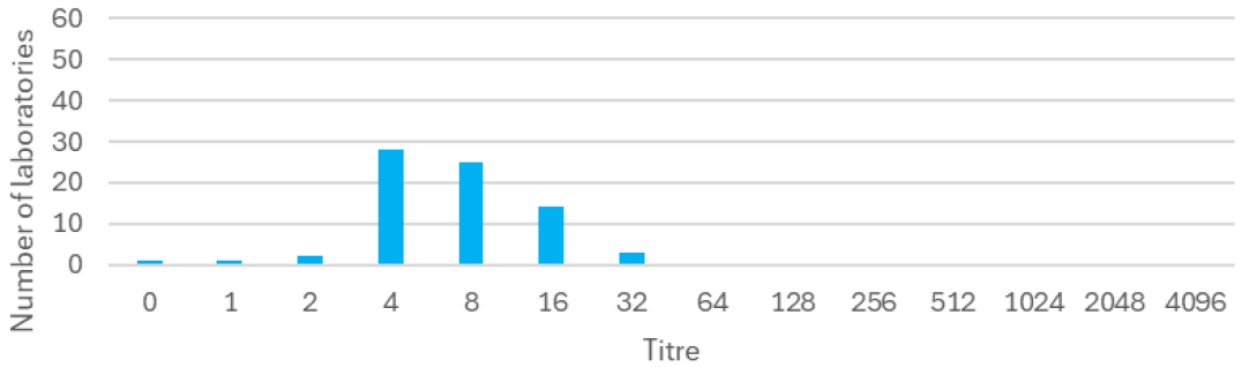
I risultati ottenuti utilizzando le tecniche 'standard' per DRT e/o IAT sono stati restituiti da 76 laboratori su 110 (69.1%). Trentaquattro di questi hanno anche restituito i risultati per un metodo DRT e/o IAT in-house. Trentaquattro laboratori hanno restituito i risultati solo per i metodi in-house.

La rappresentazione grafica dei risultati delle tecniche standard si trova alle pagine 2 e 3.

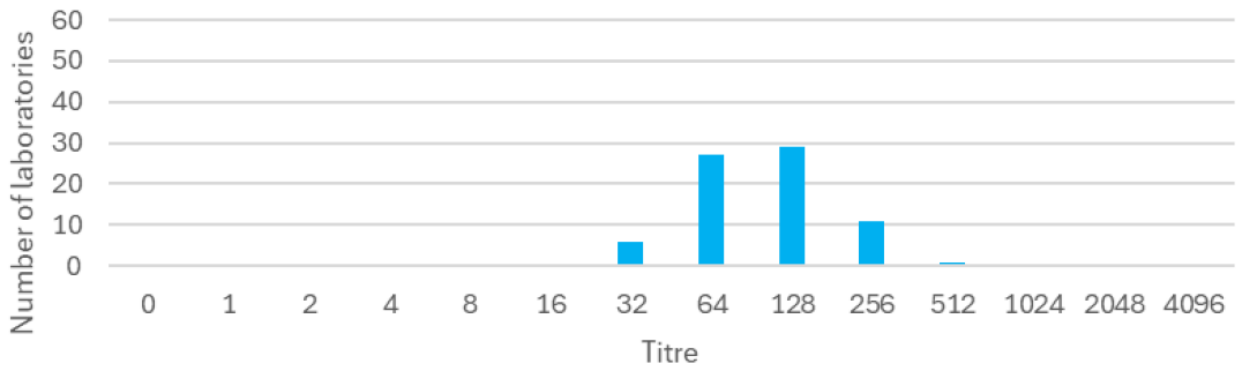
Non tutti i laboratori hanno testato sia con IAT che con DRT; i numeri dei risultati analizzati per ciascun metodo sono riportati nella Tabella 1.



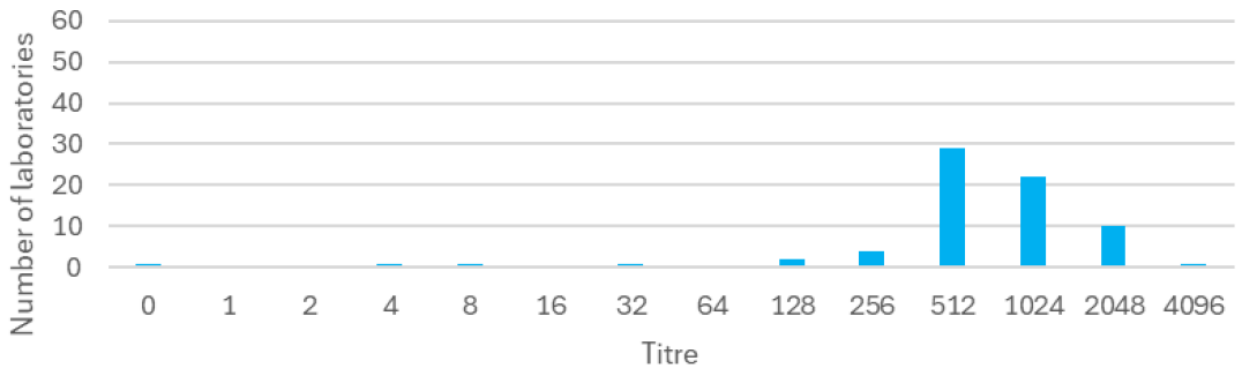
Patient 1 IAT Standard



Patient 2 IAT Standard



Patient 3 IAT Standard



Risultati titolazione

La tabella 1 mostra i risultati della titolazione con il metodo della mediana per DRT, per IAT usando plasma non trattato e per IAT usando plasma pre-trattato.

Tabella 1 - Risultato mediano titolazione e range, per metodo e tecnologia

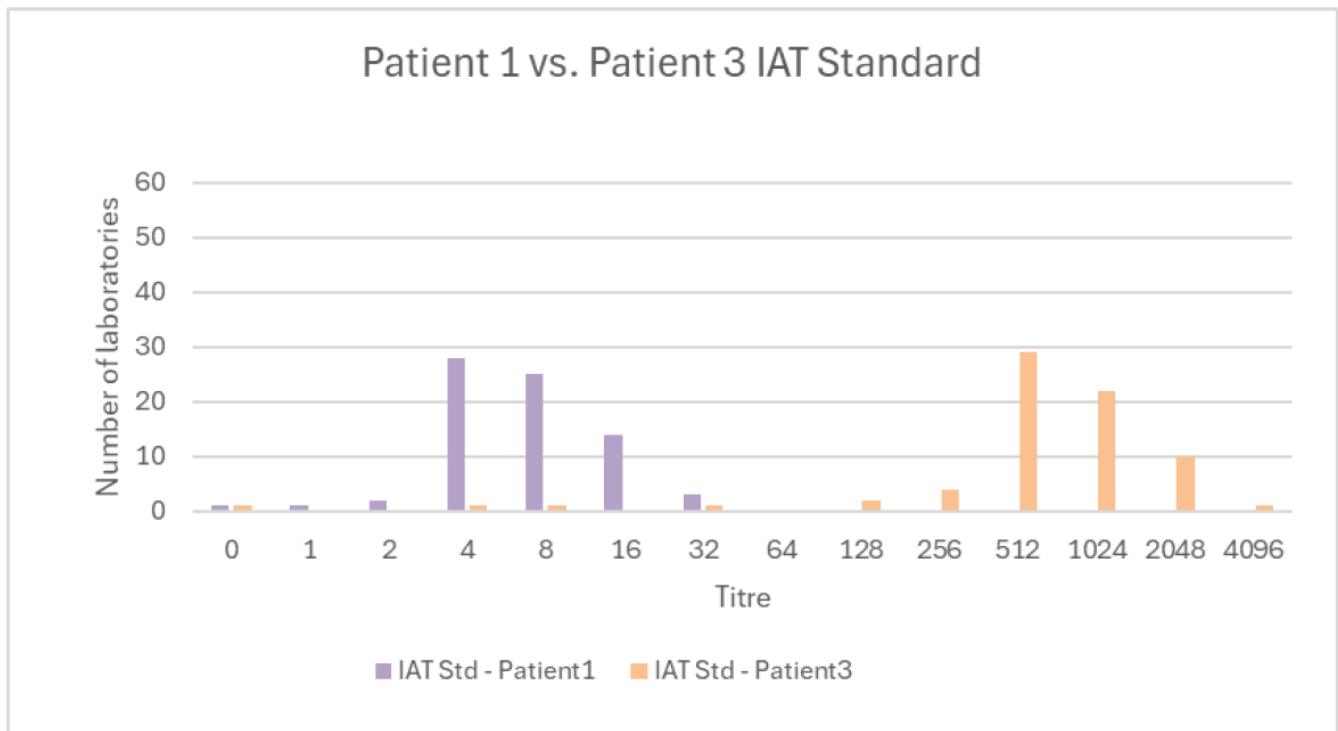
Technique	Titration result (range)					
	Patient1 number of results	Patient1 median (range)	Patient2 number of results	Patient2 median (range)	Patient3 number of results	Patient3 median (range)
DRT Standard	67	0 (0-2)	67	8 (4-32)	65	1 (0-8)
DRT In-house DiaMed	14	0 (0-1)	14	8 (4-64)	13	1 (0-4)
DRT In-house BioVue	11	0 (0-8)	11	16 (8-128)	11	1 (0-1024)
DRT In-house Grifols	13	1 (0-32)	13	16 (2-64)	13	4 (1-32)
DRT In-house Tube	10	0.5 (0-2)	10	8 (2-16)	10	1 (0-2)
DRT In-house Immucor	9	0 (0-0)	9	4 (2-8)	9	0 (0-0)
DRT In-house Other	4	0 (0-1)	4	12 (4-32)	4	9 (0-512)
IAT Standard	74	8 (0-32)	74	128 (32-512)	72	512 (0-4096)
IAT In-house (untreated) DiaMed	10	12 (8-32)	10	128 (64-256)	9	512 (16-1024)
IAT In-house (untreated) BioVue	9	32 (8-32)	9	256 (64-512)	9	512 (256-1024)
IAT In-house (untreated) Grifols	12	16 (8-128)	12	128 (8-256)	12	512 (8-2048)
IAT In-house (untreated) Tube	3	8 (4-32)	3	128 (64-1024)	3	128 (64-2048)
IAT In-house (untreated) Immucor	8	4 (2-16)	8	64 (32-128)	8	512 (256-512)
IAT In-house (untreated) Other	4	6 (2-64)	4	96 (64-512)	4	384 (8-1024)
IAT In-house DTT Treated (or equivalent) DiaMed	6	6 (0-8)	6	96 (8-256)	6	512 (8-4096)
IAT In-house DTT Treated (or equivalent) BioVue	4	8 (8-8)	4	128 (64-128)	4	256 (16-1024)
IAT In-house DTT Treated (or equivalent) Grifols	2	2.5 (1-4)	2	64 (64-64)	2	1024 (1024-1024)
IAT In-house DTT Treated (or equivalent) Tube	3	16 (8-32)	3	256 (32-1024)	3	1024 (8-2048)
IAT In-house DTT Treated (or equivalent) Immucor	1	16 (16-16)	1	128 (128-128)	1	512 (512-512)

Tabella 2 – I vostri risultati

Omissis

Discussione

Il Paziente 1 e il Paziente 3 sono stati inizialmente preparati dallo stesso pool, ma un piccolo volume di anti-c ad alto titolo era stato aggiunto al Paziente 3. I grafici seguenti confrontano i titoli IAT ottenuti per i Pazienti 2 e 3.



13/96 (13,5%) laboratori che hanno risposto alla domanda hanno indicato di non eseguire o di non ottenere risultati da uno screening/pannello anticorpale per i pazienti sottoposti a titolazione ABO; tre di questi (uno nel Regno Unito) sono tra gli 89 che supportano programmi di trapianto ABO incompatibili. Degli 83 laboratori che hanno indicato di aver eseguito uno screening di anticorpi, diciassette hanno indicato che questo non sarebbe stato eseguito su ogni campione. Tredici avrebbero eseguito uno screening solo sul primo campione, uno avrebbe eseguito uno screening aggiuntivo se ci fosse stata una storia di anticorpi o una trasfusione recente, uno avrebbe eseguito uno screening sul primo campione e se il paziente avesse avuto bisogno di trasfusione e due avrebbero eseguito uno screening anticorpale secondo un programma regolare, uno ogni sette giorni e uno ogni tre mesi.

In questo esercizio, le istruzioni richiedevano che i globuli rossi forniti fossero utilizzati per la titolazione e i risultati IAT suggeriscono che la maggior parte dei laboratori ha utilizzato queste cellule come indicato nelle istruzioni. In una situazione clinica, coloro che hanno eseguito uno screening anticorpale sarebbero stati consapevoli della necessità di selezionare una cellula c negativa per la titolazione e trenta laboratori hanno contattato lo Schema per indicare che questo sarebbe stato il caso. Tuttavia, se questa fosse stata una situazione clinica, è possibile che un titolo anti-A IAT falsamente alto avrebbe potuto essere segnalato per il paziente 3 nel 22,5% dei laboratori che supportano trapianti ABO incompatibili. Ciò potrebbe comportare inutilmente l'esclusione dei pazienti da alcuni programmi di trapianto o l'esposizione a misure inappropriate di riduzione degli anticorpi.

Il paziente 3 è stato rimosso dal punteggio per la titolazione IAT poiché i risultati segnalati non riflettono il contenuto anti-A del campione.

Si riporta una nota aggiuntiva rilasciata dal Team BTLP.

Per l'esercizio ABO Titration, UK NEQAS è solita inviare circa una volta l'anno un campione contaminato con anti-c. È fondamentale che i laboratori eseguano la titolazione utilizzando le cellule che vengono fornite con l'esercizio, poiché in questo modo, se tutti usano le cellule fornite da UK NEQAS, i risultati saranno tra di loro comparabili.

Poiché a volte qualche laboratorio esegue la titolazione utilizzando le proprie cellule e non quelle inviate da UK NEQAS, gli esercizi con i campioni addizionati con anti-c sono fuori punteggio e non vengono valutati ai fini della performance.

Lo scopo del campione addizionato con l'anti-c è sempre quello di sottolineare quanto sia importante eseguire uno screening anticorpale prima di eseguire la titolazione ABO.

Se i laboratori individuano l'anti-c e ce lo comunicano, noi di UK NEQAS ci complimentiamo con loro. In tutti i casi, indipendentemente dal fatto che i laboratori abbiano utilizzato le nostre o le loro cellule, non riceveranno alcun punteggio di penalità

Tipizzazione A₁

Il risultato di consenso per la tipizzazione A₁ per il paziente Y è stato negativo. Escludendo due laboratori che hanno registrato risultati positivi per tutti e tre i pazienti, sedici laboratori hanno registrato il paziente Y come A₁ positivo o "non determinato". È possibile che il paziente Y sia di fenotipo A intermedio (A_{int}). Non c'era alcuna correlazione tra il reagente utilizzato e il risultato fuori consenso/indeterminato.

I test interni hanno dato risultati positivi deboli con due reagenti su tre durante l'esercizio, ma le reazioni erano notevolmente più deboli dei controlli positivi. I gradi di reazione non vengono attualmente raccolti per i risultati della tipizzazione A₁ e la tipizzazione A₁ non è attualmente monitorata.

Ottenere il risultato corretto per la tipizzazione A₁ è importante quando un donatore A₁ negativo viene selezionato per un trapianto renale ABO non compatibile per ridurre al minimo il rischio di rigetto associato all'incompatibilità ABO. Quando si testa un donatore in questa situazione, ci sono rischi associati sia a risultati falsi positivi che a falsi negativi. Un risultato falso negativo potrebbe aumentare il rischio di rigetto dovuto all'incompatibilità ABO. Un risultato falso positivo presenta un rischio minore ma comunque significativo che un organo potenzialmente idoneo non venga utilizzato per il trapianto, causando un ritardo per il ricevente previsto.

Tabella 3 – Risultati della tipizzazione A₁

Campione	Risultati attesi	Risultati complessivi		
		A1 positivo	A1 negativo	A1 non determinato
Paziente W	Negativo	2 (2,13%)	90 (95,74%)	2 (2,13%)
Paziente Y	Negativo	13 (13,83%)	76 (80,85%)	5 (5,32%)
Paziente Z	Negativo	3 (3,19%)	91 (96,81%)	0 (0%)

Punteggio per la titolazione ABO

Categorie di monitoraggio delle performance

Differenza dal risultato della mediana per risultati ottenuti da:

1. Standard IAT
2. Standard DRT
3. Ogni altra tecnologia in house con più di 20 laboratori con test in IAT o DRT

Definizione di risultati soddisfacenti

Valore di titolazione entro 1 diluizione al raddoppio sul 'target', con il metodo della mediana.

Punteggi per i risultati 'outlying'

- Un punto per ogni diluizione al raddoppio > 1 dal 'target', ad esempio se il target era 32, un punto viene dato per risultati di 8 o 128, due punti per 4 o 256, tre punti per 2 o 512, etc.
- I punti saranno accumulati all'interno di ciascuna categoria, all'interno di ciascun esercizio.
- I punti saranno accumulati tra gli esercizi, anche per categoria.

Monitoraggio performance (solamente per Laboratori UK)

Definizione di performance non soddisfacente (UP)

- Un totale di tre punti dentro una categoria di test in un singolo esercizio
- Un totale di tre punti dentro una categoria di test su tre esercizi (quello corrente e i due precedenti per i quali sono stati inviati risultati).
- Nessun ritorno di risultati in due dei tre più recenti esercizi.

Definizione di performance persistentemente non soddisfacente (PUP)

- Più di un episodio di performance non soddisfacente in ogni categoria di test, entro 12 mesi.
- Due episodi di UP dovuti a un non invio di risultati in un periodo di 12 mesi.
- Un episodio di UP da ognuno dei precedenti entro un periodo di 12 mesi.

Appendice 1

Tecniche "Standard" 24ABOT3

- Preparare le diluizioni del plasma in soluzione salina (PBS o NaCl) utilizzando un metodo di diluizione al raddoppio. Fare le diluizioni con un volume minimo di 200µl, usando una pipetta automatica. Utilizzare un nuovo puntale per dispensare ogni diluizione.
- Preparare una sospensione allo 0,8 - 1% di eritrociti in CellStab (usare ID-Diluent 2 se il CellStab non è disponibile).
- Leggere il punto finale della titolazione come ultima reazione debole.

Test all'antiglobulina indiretto (**IAT**) con LISS utilizzando schedine IgG o schedine polispecifiche

- a. Aggiungere in ciascun microtubo 50µL di sospensione di cellule in CellStab o ID-diluent 2
- b. Aggiungere 25µL di ogni diluizione del plasma nel microtubo corrispondente
- c. Incubare a 37 °C per 15'
- d. Centrifugare 10' nella centrifuga DiaMed

Agglutinazione diretta a temperatura ambiente (**DRT**), utilizzando schedine NaCl

- a. Aggiungere in ogni microtubo 50µL di sospensione di cellule in CellStab o ID-diluent 2
- b. Aggiungere 50µL di ogni diluizione del plasma nel microtubo corrispondente
- c. Incubare a temperatura ambiente per 15'
- d. Centrifugare 10' nella centrifuga DiaMed

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