

Controllo di qualità nazionale della tipizzazione HLA genomica

Giovanni Battista FERRARA

*Laboratorio di Immunogenetica, Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro
c/o Centro di Biotecnologie Avanzate, Genova
Centro Ricerche Immunoematologiche, AVIS, Bergamo*

Riassunto. - Il Laboratorio di Immunogenetica dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro presso il Centro di Biotecnologie Avanzate di Genova, in collaborazione con il Centro Ricerche Immunoematologiche dell'Associazione Volontari Italiani del Sangue (AVIS) di Bergamo organizza a partire dal 1996 a tutt'oggi, per l'Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti (AIBT) e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) il controllo di qualità della tipizzazione HLA genomica per gli antigeni di classe I e II per i laboratori che tipizzano per i trapianti d'organo e di midollo osseo. Vengono qui riportati e commentati i risultati del controllo di qualità 1997 e alcuni dei dati generali di questi anni.

Parole chiave: DNA tipizzazione HLA, controllo di qualità DNA, DNA trapianti, accreditamento HLA per tipizzazione DNA.

Summary (*National quality control of HLA genomic typing*). - Since 1996 the Immunogenetics Laboratory of the National Cancer Institute/CBA, Genoa, in collaboration with the Immunohematology Research Centre of Bergamo has organized on behalf of Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti (AIBT) and Istituto Superiore di Sanità (ISS) the quality control programme of HLA genomic typing for class I and II antigens for the laboratories performing HLA typing for organ and bone marrow transplantations. Herewith are reported the results and comments to the 1997 quality control programme along with some overall data.

Key words: DNA HLA typing, HLA DNA quality control, DNA transplantation, EFI and ASHI accreditation.

Introduzione

Dal 1996, il Laboratorio di Immunogenetica dell'Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro presso il Centro di Biotecnologie Avanzate di Genova, grazie soprattutto alla collaborazione del Centro Ricerche Immunoematologiche dell'Associazione Volontari Italiani del Sangue (AVIS) di Bergamo, organizza per l'Associazione Italiana di Immunogenetica e Biologia dei Trapianti (AIBT) e l'Istituto Superiore di Sanità (ISS) il controllo di qualità della tipizzazione HLA genomico dei laboratori italiani che tipizzano per i trapianti di organi solidi e per i trapianti di midollo.

I responsabili dei laboratori che tipizzano per i trapianti di organi solidi sono membri nella maggior parte dei casi della Consulta Tecnica Permanente sui Trapianti. I laboratori che tipizzano donatori volontari per i trapianti di midollo fanno capo al registro nazionale.

Scopo del controllo di qualità è quello di dare ai laboratori partecipanti un messaggio sulle tipizzazioni effettuate, sulle metodologie utilizzate e sugli eventuali aggiustamenti da fare all'interno del proprio sistema.

Come conseguenza ne deriverà che nel tempo i donatori e riceventi dei trapianti d'organo o di midollo verranno tipizzati a livelli sempre più ottimali e scelti in

base alla massima compatibilità a livelli nazionale e/o internazionale.

Due organizzazioni internazionali sono deputate a concedere "l'accREDITAMENTO" ai laboratori che fanno parte di queste due categorie per poter eseguire tipizzazioni per i trapianti di organi solidi e poter inserire donatori nei registri nazionali e internazionali di donatori di midollo osseo: l'European Federation for Immunogenetics (EFI) e l'American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI).

La necessità di istituire il controllo di qualità nazionale in questa "area" richiedeva alcune caratteristiche peculiari: a) un controllo di qualità assolutamente cieco; b) un numero aperto di laboratori a cui fosse possibile partecipare.

E' del tutto inutile commentare i due punti sopra citati essendo di per sé esplicativi.

Materiali e metodi

Venti donatori volontari del Centro Ricerche Immunoematologiche dell'AVIS di Bergamo sottoscrivono il loro impegno all'inizio dell'anno per sottoporsi

Tabella 1. - Risultati di classe II dei 44 laboratori di 1 dei 20 donatori (donatore 7)

Lab.	Sig.	DRB1		DRB3		DRB4	DRB5	DQA1	DQB1	DPB1	
51	M	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
52	D	11	13								
53	C	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
54	T	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
55	F	1101	1303	0101	0202				0301		
56	C	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
57	M	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
58	O	11	13	01	02						
59	N	1101	1303	0101	0202			0501	0301	0301	1401
60	F	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
61	V	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
62	C	1101	1303	0101	0202				0301		
63	P	nd	nd	nd	nd						
64	G	11(*)	1303	0101	0202			05(*)	0301	0301	
65	G	11	13	B3				0501	0301		
66	C	1101	1303	0101	0202			0501	0301	5001	1401
67	A	nd	nd	nd	nd			nd	nd		
68	G	1101	1303	0101	02				0301		
69	V	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
70	A	1101	1303	0101	0202			0501	0301	0301	1401
71	L	1101	1303	0101	0202			0501	0301	0301	1401
72	A	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
73	I	1101	1303	0101	0202				0301		
74	G	1101	1303	0101	0202			0501	0501	0301	0301
75	W	1101	1303	0101	0202			0501	0301	0301	1401
76	M	1101	1303	0101	0202				0301		
77	E	11	13	B3							
78	M	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
79	B	11	13								
80	M	11	13	0101	0202			nd	nd		
81	S	1101	1303	0101	0202				0301		
82	A	1101	1303	0101	0202			0501	0301	0301	1401
83	T	1101	1303	0101	0202			0501	0301	0301	1401
84	T	XXX	13	B3					0301		
85	B	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
86	O	1101	1303	0101	0202				0301	0301	1401
87	A	1101	1303	0101	0202			0501	0301	0301	1401
88	T	11	13	B3							
89	B	11	13	B3				0501	0501	0301	0301
90	T	1101	1303	0101	0202				0301		
91	B	1101	1303	0101	0202			0501	0301		
92	P	1101	1303	0101	0202			0501	0301	0301	1401
93	M	1101	1303	0101	0202				0301		
94	R	1101	1303	0101	0202				0301		

(*) Nelle risposte è indicata più di una specificità; in grassetto sono riportati tutti gli errori; nd: not done (non eseguito).

Tabella 2. - Risultati di classe I di 1 dei 20 donatori (donatore 7)

Lab.	Sig.	Locus A		Locus B		Locus C	
51	M	24	3201	1801	51	1203	15
53	C	24	32	18	51	1203	15
54	T	24	32	18	51	12	15
55	F	24	3201	nd	nd	1203	15
56	C	nd	nd	nd	nd	nd	nd
57	M	nd	nd	nd	nd	nd	nd
61	V	24	32	18	51	12	15
66	C	2402	3201	1801	5101	1203	1502
70	A	24	32	18	51	nd	nd
74	G	nd	nd	nd	nd	nd	nd
75	W	24	32	18	51	12	15
78	M	24	32	18	51	1203	15
82	A	nd	nd	nd	nd	nd	nd
83	T	24	32	18	51	12	15
86	O	nd	nd	nd	nd	1203	1502/03
87	A	24	32	18	51	1203	15
92	P	nd	nd	nd	nd	nd	nd
93	M	nd	nd	nd	nd	nd	nd

(*) Nelle risposte è indicata più di una specificità; nd: not done (non eseguito).

10 volte nell'anno a una donazione di sangue, nello stesso giorno presso la sede di Bergamo, secondo un calendario che non può essere modificato, e che non può fallire.

Il sangue prelevato da ciascun donatore in "vacutainers" contenenti EDTA viene etichettato con una lettera dell'alfabeto.

La lettera che contraddistingue ogni provetta è il risultato di un sorteggio per l'abbinamento con il donatore che perciò diventa del tutto casuale. Quindi la stessa lettera in laboratori diversi corrisponde a campioni di sangue diversi.

I prelievi vengono inviati nella notte a Genova, dove il giorno successivo vengono assemblati e spediti ai laboratori partecipanti per DHL.

Ogni laboratorio riceve due volte nell'anno 10 campioni di questo sangue (totale 20 campioni).

La spedizione non ha mai dato problemi di ricevimento, di rottura o di alterazione dei campioni, salvo due casi in 3 anni.

Raccolta ed elaborazioni dei dati

I laboratori hanno 60 giorni per inviare i risultati che possono essere spediti per fax ma che debbono entro un'altra settimana di tempo essere inviati anche per posta al fine di non avere dubbi nella trascrizione definitiva.

I laboratori partecipanti sono stati divisi in due categorie:

1) laboratori che eseguono tipizzazione HLA per la compatibilità HLA donatore-ricevente nei trapianti di organi solidi;

2) laboratori che eseguono tipizzazione HLA per la compatibilità HLA donatore-ricevente sia per organi solidi sia per trapianti di midollo "unrelated" e/o per inserire volontari nel registro nazionale.

Sono state preparate nel computer tutte le tabelle per l'inserimento dei dati dei laboratori partecipanti sia per gli antigeni di classe I che II (Tab. 1 e 2).

E' stato, inoltre, previsto l'inserimento delle metodiche utilizzate in ciascun laboratorio in modo tale che possono essere fatte, da ciascun laboratorio partecipante, considerazioni sui vari metodi a confronto e aprire fra i partecipanti discussioni che dovrebbero approdare sul piano nazionale (Tab. 3 e 4).

Risultati

Prima della elaborazione finale dei risultati, i dati sono inviati ai laboratori perché controllino eventuali errori di inserimento nel computer.

Nel 1996 i laboratori partecipanti sono stati 32, nel 1997 erano 44 (uno dei quali non ha inviato alcun risultato), nel 1998 erano 46 (3 si sono ritirati a lavoro già iniziato), nel 1999 sono 52.

Dei 43 laboratori che nel 1997 hanno inviato i risultati, 12 eseguono il *typing* a bassa risoluzione (6 di questi solo per trapianti d'organo) e 31 eseguono il *typing* ad alta risoluzione.

La bassa risoluzione è sufficiente per i laboratori che eseguono solo trapianti d'organo. Per chi esegue anche *typing* per trapianti di midollo è richiesta l'alta risoluzione almeno per i loci DRB (1,3,4,5) e DQB.

La Tab. 5 riassume gli errori nel *typing* della classe II. La Tab. 6 riassume gli errori nel *typing* di classe I.

Tabella 3. - Controllo di qualità 1997 DNA classe II, metodiche usate

Lab.	DRB 1	DRB 3, 4, 5	DQA 1	DQB 1	DPB 1
51	SSO Innolipa	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
52	SSP Bag	nd	nd	nd	nd
53	SSO Innolipa	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
54	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
55	SSO ??	SSO ??	nd	SSO ?? SSP ??	nd
56	SSO ??	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
57	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Bag	SSP Bag-Dynal	nd
58	SSO	???	nd	nd	nd
59	SSO Innolipa	SSO Innolipa	nd	SSO Innolipa	SSO Innolipa
60	SSP Dynal	SSP Dynal-Local	SSP Dynal-Local	SSP Dynal-Local	nd
61	SSP Dynal	SSP Dynal	nd	nd	nd
62	SSP Dynal	SSP Dynal	nd	SSP Dynal	nd
63	???	???	nd	nd	nd
64	SSO Innolipa	SSO Innolipa	SSP Bag	SSO Innolipa	nd
65	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
66	SBT Perkin Elmer	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SBT Perkin Elmer
67	nd	nd	nd	nd	nd
68	SSP Dynal	SSP Dynal	nd	RBT Innolipa	nd
69	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
70	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
71	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal
72	SSP Dynal	???	???	???	nd
73	SSP Dynal	SSP Dynal	???	SSP Dynal	nd
74	SSO Innolipa	SSO XII who	SSO XII who	SSO XII who	nd
75	SSO Innolipa	SSO Innolipa	SSP Dynal	SSO Innolipa	SSO Innolipa
76	SSP Dynal	SSP Dynal	nd	SSP Dynal	nd
77	RDB Local	???	nd	nd	nd
78	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
79	SSO Innolipa	nd	nd	nd	nd
80	SSO Innolipa	SSO Innolipa	nd	SSP Dynal	nd
81	SSO Innolipa	SSP Dynal	nd	SSP Dynal	nd
82	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSO Innolipa	SSO Innolipa
83	SSP Dynal-Innolipa	SSP Dynal-Innolipa	nd	SSP Dynal	nd
84	SSP Biotest	SSP Biotest	nd	nd	nd
85	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal
86	SSO Merieux-Local	SSO Local	nd	SSO Local	SSO Innolipa
87	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSO XI whs
88	SSP Dynal	SSP Dynal	nd	nd	nd
89	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal SSCP	nd	nd
90	???	???	???	???	???
91	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
92	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal	RDB Innolipa
93	SSP One Lambda	SSP One Lambda	SSP One Lambda	nd	nd
94	SSP Dynal-Biotest	SSP Dynal	nd	SSP Dynal	nd

nd: not done (non eseguito).

Tabella 4. - Controllo di qualità 1997 DNA classe I, metodiche usate

Lab.	Locus A	Locus B	Locus C
51	SSO - SSP XII whs	SSO - SSP XII whs	SSO - SSP XII whs
53	SSO - SSP XII whs	SSO - SSP XII whs	SSO - SSP XII whs
54	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal
55	SSO Local	nd	SSO Local
56	ARMS - SSP Dynal	ARMS - SSP Dynal	ARMS - SSP Dynal
57	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
61	SSP Dynal - Pel Freez	SSP Dynal - Pel Freez	SSP Dynal - Pel Freez
66	SBT Perkin Elmer	SBT Perkin Elmer	SBT Perkin Elmer
70	SSP Dynal	SSP Dynal	nd
74	nd	nd	nd
75	SSP ???	SSP ???	SSP ???
78	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal
82	nd	nd	nd
83	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal
86	nd	nd	SBT Perkin Elmer
87	SSP Dynal - Local	SSP Dynal - Local	SSP Dynal - Local
92	SSP Dynal	SSP Dynal	SSP Dynal
93	nd	nd	nd

nd: not done (non eseguito).

Tabella 5. - Controllo di qualità 1997 DNA (43 laboratori)

Laboratori	DRB1 Low/High	DRB 3,4,5 Low/High	DQA1 Low/High	DQB1 Low/High	DPB1 Low/High
Con 0 errori	35/26	21/14	23/19	26/16	8/8
Con 1-2 errori	5/11	11/10	1/4	5/6	1/1
Con più di 2 errori	3/6	4/12	1/2	4/13	2/2
Non fatto	0/0	7/7	18/18	8/8	32/32

Tabella 6. - Controllo di qualità 1997 DNA classe I (15 laboratori partecipanti)

Laboratori	Locus A Low	Locus B Low	Locus C Low
Con 0 errori	8	7	7
Con errori	6	6	6
Non fatto	1	2	2

Discussione

Come si vede nella Tab. 5 il *typing* genomico presenta ancora dei problemi. Specialmente nei *loci* DRB 3,4,5 dove 12 laboratori su 36 (cioè 1/3) commettono più di

due errori e nel *locus* DQB dove 13 laboratori su 35 commettono ancora più di due errori.

Non possiamo dire nulla per ciò che riguarda il *typing* genomico di classe I (Tab. 6) perché i laboratori partecipanti sono solo 15 e quasi la totalità dei dati sono a bassa risoluzione, a volte persino con una risoluzione inferiore a una buona sierologia.

Ringraziamenti

Con molto calore sia da parte nostra che da parte dei laboratori partecipanti ringraziamo il Centro Ricerche dell'AVIS di Bergamo sempre disponibile a questa collaborazione.

Ma ancora di più ringraziamo i singoli donatori, ormai più di ottanta (venti ogni anno), che hanno entusiasticamente aderito e reso possibile i controlli di qualità di questi anni.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 27 gennaio 1999.