Ann. Ist. Super. Sanità, vol. 35, n. 1 (1999), pp. 41-44

Controllo nazionale di qualità della tipizzazione sierologica HLA

Francesca QUINTIERI *(a)*, Orsola PUGLIESE *(a)* e Mirella MARIANI *(b)*

(a) Laboratorio di Immunologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma
(b) Centro Nazionale Trasfusione Sangue, Croce Rossa Italiana, Roma

Riassunto. - L'Istituto Superiore di Sanità, in collaborazione con la Croce Rossa Italiana, organizza ogni anno, a partire dal 1995, il programma nazionale di controllo di qualità della tipizzazione sierologica HLA per gli antigeni della I e II classe, per i laboratori che tipizzano per i trapianti di organo e di midollo osseo. I risultati ottenuti nei primi tre anni mostrano un miglioramento costante della qualità delle tipizzazioni dei circa 50 laboratori compresi nel controllo, con il 77% dei laboratori che nel 1997 ha tipizzato correttamente le specificità principali. Nonostante i risultati soddisfacenti finora raggiunti, l'Istituto Superiore di Sanità ha effettuato una revisione dello schema del controllo di qualità, al fine di risolvere alcune problematiche ancora esistenti e di rendere il controllo valido a livello europeo per promuovere scambi e collaborazioni con altri paesi.
Parole chiave: tipizzazione sierologica HLA, controllo di qualità, trapianti, accreditamento EFI.

Summary *(The quality control scheme of serologic HLA typing in Italy).* - Since 1995 the Istituto Superiore di Sanità, in collaboration with the Italian Red Cross, has been organising annually the quality control of serological HLA class I and II typing on histocompatibility laboratories which perform typing for organ and bone marrow transplantation. Improvement has been obtained every year; in fact, results of the 1997 control show that the 77% of the laboratories typed the major specificities correctly. Despite the remarkable improvement achieved during the first three years of quality controls, a new organisation has been designed for further years to ensure the participation of all the Italian laboratories (more than 100) and to promote a quality control scheme that will be acceptable at international level.
Key words: HLA serologic typing, quality control, transplantation, EFI accreditation.

Introduzione

L'Istituto Superiore di Sanità organizza dal 1995, in collaborazione con la Croce Rossa Italiana, il controllo nazionale annuale di qualità della tipizzazione sierologica degli antigeni HLA di I e II classe.

Il controllo di qualità persegue due obiettivi principali: primo, si prefigge di valutare e uniformare la qualità delle tipizzazioni HLA su tutto il territorio nazionale; secondo, consente ai laboratori interessati di richiedere l'accreditamento EFI (European Federation for Immunogenetics) e/o l'accreditamento ASHI (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics), attualmente indispensabili per poter inserire donatori tipizzati nei registri internazionali di donatori di midollo osseo.

Poiché il numero dei laboratori esistenti sul territorio nazionale è elevato (oltre 100), nei primi tre anni ne sono stati selezionati circa 50 in base ai seguenti criteri [1]:

- laboratori di riferimento regionali per i trapianti d'organo;
- laboratori di riferimento regionali per i trapianti di midollo osseo;
- laboratori non compresi nei due punti precedenti, che tuttavia risultano essere tra i più attivi della regione e con un minimo di mille potenziali donatori di midollo osseo iscritti nel registro italiano donatori;
- laboratori che intendono richiedere gli accreditamenti internazionali.

L'esigenza di un controllo di qualità istituzionale della tipizzazione HLA era da tempo sentita; l'iniziativa dell'Istituto Superiore di Sanità ha avuto, pertanto, un largo consenso e ha goduto di ampia collaborazione da parte dei laboratori. I risultati ottenuti sono stati sempre più soddisfacenti sia da un punto di vista organizzativo che da un punto di vista della qualità delle tipizzazioni effettuate dai vari laboratori. Tuttavia, alcuni aspetti organizzativi non ancora pienamente definiti e alcune problematiche sorte nel corso dei primi tre anni, hanno reso necessaria una revisione dello schema fino a quel momento utilizzato. Tale revisione è stata applicata nel controllo di qualità del 1998 [2] e ha tenuto conto delle seguenti problematiche:

- il numero crescente di richieste di laboratori rende tecnicamente difficile una gestione centralizzata del controllo di qualità;
- il numero totale dei laboratori di tipizzazione per milione di abitanti in Italia è il più alto d'Europa. E' prevedibile che ragioni di economia gestionale e di qualità del lavoro consiglino un ridimensionamento di questo numero.

Nel campo dei trapianti sia di organo che di midollo osseo le attività si svolgono prevalentemente su base regionale o interregionale. Pertanto, sembrava giusto e opportuno che queste organizzazioni si assumessero parte delle responsabilità della qualità del lavoro.

In considerazione di tali problematiche, l'Istituto Superiore di Sanità, sentito il parere di esperti nel campo, ha stabilito di gestire direttamente il controllo di qualità sui registri regionali per i trapianti di midollo osseo e sui laboratori di riferimento regionali per i trapianti di organi da cadavere, riducendo il numero a 25. Tali laboratori devono organizzare i controlli di qualità regionali o interregionali in modo che tutti i laboratori della propria regione (o di regioni vicine) vengano sottoposti a un controllo di qualità annuale, che sarà riconosciuto a livello nazionale.

In aggiunta, il nuovo schema del controllo di qualità prende in considerazione le direttive più recenti dell'EFI sulla percentuale di antigeni principali dei *loci* A, B e DR che devono essere tipizzati ogni anno, in modo da assicurare una determinata varietà antigenica ad ogni controllo, e sul numero massimo di errori che possono essere accettati per definire soddisfacente la qualità delle tipizzazioni effettuate da ogni singolo laboratorio.

In questo lavoro vengono riportati i risultati ottenuti negli anni 1995-97. Dall'analisi dei dati risulta chiaramente come di anno in anno venga registrato un notevole miglioramento della qualità delle tipizzazioni. Questo a conferma di come il controllo di qualità sia uno strumento fondamentale nello sviluppo di un'alta e omogenea qualità della tipizzazione HLA, necessaria ai laboratori italiani che operano nel settore dei trapianti di organo e di midollo osseo in modo anche da favorire la collaborazione con gli altri paesi europei.

Materiali e metodi

Donatori e campioni di sangue

La scelta dei donatori, la preparazione e l'invio dei campioni di sangue sono stati effettuati come descritto precedentemente [1].

Raccolta ed elaborazione dei dati

I dati pervenuti tramite fax e, successivamente, per posta sono stati inseriti nel calcolatore utilizzando la base dati fornita dal National Reference Centre of Histocompatibility Testing di Leiden (Olanda). L'inserimento dei dati è stato facilitato dall'uso di schede per la raccolta dei risultati del tutto identiche allo schema utilizzato dalla base dati e descritte in precedenza [1]. Gli antigeni sono stati divisi in *must* (che devono essere tipizzati correttamente) e *should* (che dovrebbero essere tipizzati correttamente) secondo la classificazione prevista dalle norme per l'accreditamento EFI [3]. Le tipizzazioni assegnate sono state confrontate con la tipizzazione *consensus* 75%. Quest'ultima viene definita considerando presenti nel campione gli antigeni ritrovati da almeno il 75% dei laboratori. Gli antigeni per cui non viene raggiunto il 75% di consenso e le specificità che risultino non tipizzate in più del 25% dei laboratori partecipanti vengono considerate *not tested.*

La valutazione finale dei risultati è stata espressa con il coefficiente di correlazione (r), mettendo a confronto le tipizzazioni di ciascun laboratorio con la tipizzazione *consensus*. I risultati sono stati distribuiti ai vari laboratori, senza assegnare alcuna votazione e mantenendo rigorosamente l'anonimato.

Risultati

La pronta e puntuale consegna dei campioni ai vari laboratori è stata cruciale per il buon esito dei controlli. Nonostante l'esistenza di alcune città "a rischio" (sud e isole), i campioni di sangue sono stati consegnati entro le ore 14 del giorno successivo al prelievo alla maggior parte dei laboratori. Solo in pochi casi, e soprattutto durante il primo anno, il sangue è pervenuto ai laboratori con consistente ritardo a causa di disguidi interni agli ospedali.

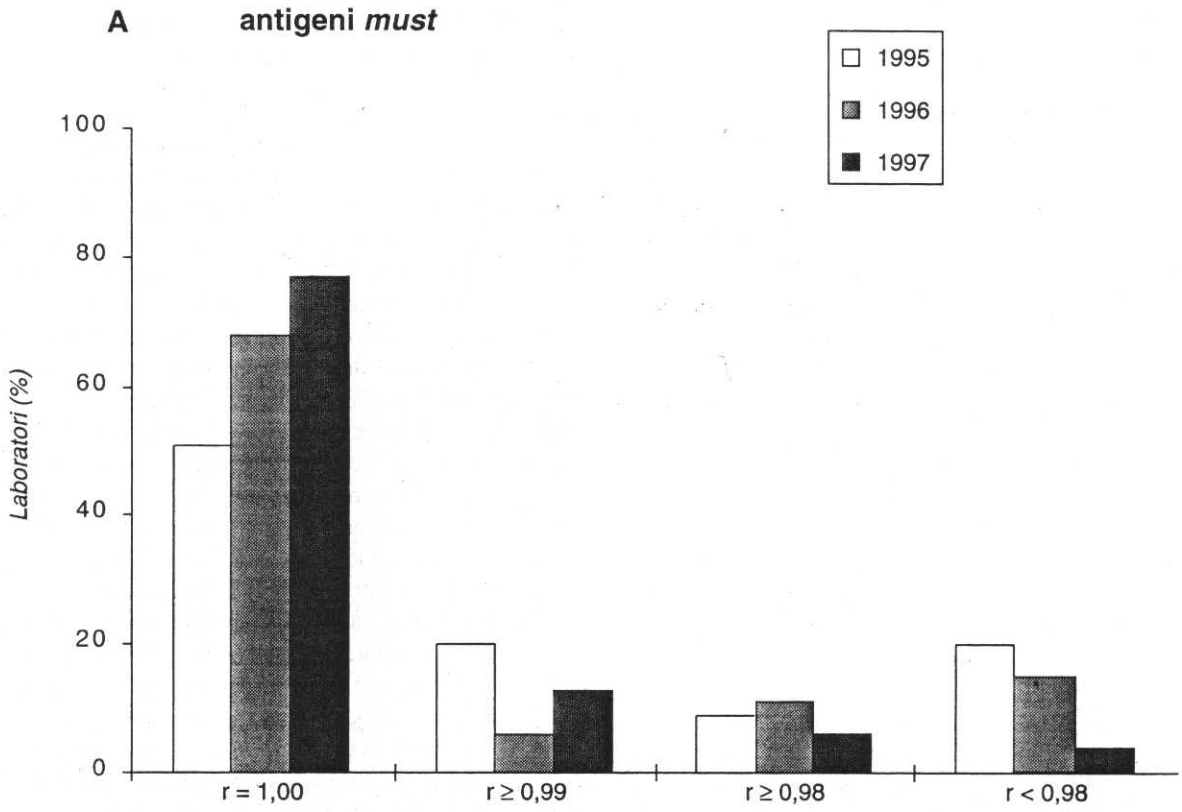
I tempi di risposta sono stati osservati da tutti i laboratori e i dati sono pervenuti per fax entro sette giorni dall'invio dei campioni di sangue. Poiché l'uso del fax può creare dei problemi di leggibilità e interpretazione, le schede originali sono state contemporaneamente spedite per posta.

Prima dell'elaborazione dei risultati, tutti i dati sono stati inviati ai laboratori perché controllassero eventuali errori di inserimento nel calcolatore.

Nella Fig. 1 sono riportati i risultati dei controlli di qualità 1995-97. Il pannello A mostra i risultati relativi alla tipizzazione degli antigeni *must*, mentre il pannello B riporta quelli relativi alla tipizzazione di tutti gli antigeni. In ambedue i casi si osserva un incremento del numero di laboratori che tipizzano correttamente.

La Tab. 1 mostra gli errori di trascrizione commessi nel controllo di qualità. Si registrano alcuni casi in cui non è stata riportata la specificità supertipica in presenza di quella subtipica e viceversa. In questo caso l'errore dipende dal fatto che quando la casella corrispondente alla specificità viene lasciata in bianco, il programma di elaborazione la considera negativa. Di conseguenza, una semplice trascuratezza si trasforma in un vero e proprio errore, ma di questo i laboratori erano stati ampiamente avvertiti.

La Tab. 2 riporta gli errori di tipizzazione più frequenti effettuati nei primi tre anni di controllo di qualità, dove si osserva una frequenza maggiore a livello degli antigeni dei *loci* C e DR.



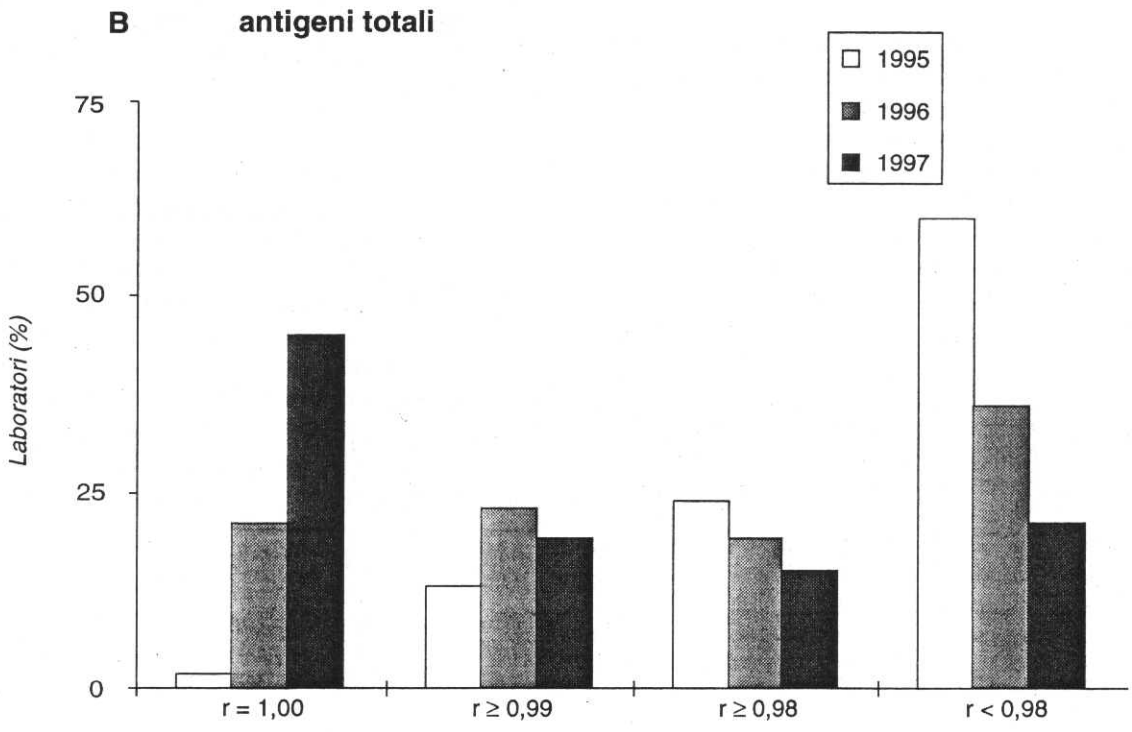


Fig. 1. - Pannello A: distribuzione della percentuale dei laboratori nelle varie classi di *r* per le specificità *must*. Pannello B: distribuzione della percentuale dei laboratori nelle varie classi di *r* per tutte le specificità.

Tabella 1. - Errori di trascrizione più frequenti

Tipo di errore	
A9-	A23, 24+
A19-	A29+, 30+, 32+, 33+
B40-	B60+,B61+
B51-, 52-	B5+
B65-	B14+
Bw4-	
Bw6-	
DR5-	DR11+
DR6-	DR13+
DR17-	DR3+
DR52-	
DR53-	
DQ5-	DQ1+

Tabella 2. - Errori di tipizzazione più frequenti

Antigeni persi	Antigeni extra
B70	B35
Cw4	B16
Cw5	Cw2
Cw6	Cw6
Cw7	Cw7
DR6	DR3

Discussione

L'Istituto Superiore di Sanità ha organizzato ed effettuato il programma di controllo di qualità su una parte di laboratori di tipizzazione tissutale italiani per gli anni 1995-97. Tale controllo ha avuto esito positivo sia per quanto riguarda gli aspetti organizzativi che la qualità della tipizzazione effettuata. Nonostante il risultato soddisfacente, cambiamenti sostanziali sono stati apportati al programma del 1998, la cui elaborazione è al momento in corso, con l'obiettivo di inserire tutti i laboratori esistenti sul suolo nazionale e di portare il controllo di qualità italiano a livello europeo.

Per quel che riguarda gli errori più frequenti riscontrati nei primi tre controlli, questi vengono divisi in errori di trascrizione ed errori di tipizzazione. I primi sono legati maggiormente alla mancata assegnazione delle specificità subtipiche in presenza di quelle sopratipiche e viceversa, come nel caso di A9, A19, DR15, DR13, DQ1 e DQ6 e, comunque, hanno subito mano a mano un notevole ridimensionamento, dovuto a una maggiore attenzione degli operatori nel trascrivere i risultati sulla scheda. Dato che errori di tipizzazione e errori di trascrizione portano all'identica conseguenza di immissione di dati errati nei registri nazionali e internazionali, i due tipi di errore sono stati considerati finora del tutto equivalenti.

Riguardo agli errori di tipizzazione vera e propria occorre sottolineare che, tra gli antigeni della I classe, soltanto quelli a carico del B35 e del B70 possono essere considerati accettabili, in quanto i sieri tipizzanti del commercio sono polispecifici e fortemente cross-reagenti con altri antigeni. Inoltre, la frequente difficoltà nel tipizzare correttamente le specificità HLA-C è dovuta alla loro bassa densità sulla superficie cellulare e alla scarsa affidabilità dei sieri utilizzati per la tipizzazione. Per quanto riguarda gli antigeni della II classe, è da notare che risulta piuttosto elevato il numero degli errori a carico delle specificità DR. Poiché gli antisieri specifici disponibili in commercio risultano di buona qualità, tali errori possono essere imputabili a una cattiva interpretazione dei dati di lettura o a una non appropriata applicazione della tecnica da parte degli operatori.

L'identità degli antigeni HLA tra donatore e ricevente risulta essenziale per poter eseguire il trapianto di midollo osseo, così come un elevato grado di compatibilità favorisce il buon esito di alcuni trapianti di organo. E' di grande importanza, quindi, assicurare un'alta qualità della tipizzazione in tutti i laboratori italiani che partecipano al registro nazionale per i trapianti di midollo osseo o che collaborano ai programmi di trapianto di organo. Il controllo di qualità annuale è lo strumento necessario per favorire un costante miglioramento delle tipizzazioni; esso consente, inoltre, di richiedere l'accreditamento presso società internazionali che permettono l'iscrizione ai registri europei e americani dei donatori di midollo osseo.

Ringraziamenti

Si ringraziano per la collaborazione prestata i laboratori che hanno partecipato ai controlli di qualità.

Lavoro presentato su invito.
Accettato il 27 gennaio 1999.

BIBLIOGRAFIA

1. QUINTIERI, F. & MARIANI, M. 1995. I° Controllo Nazionale di qualità della tipizzazione sierologica HLA. *La trasfusione del sangue* **41**(3): 395-400.

2. QUINTIERI, F. & MARIANI, M. 1998. A new national quality control scheme for 1998 in Italy. *EFI Newsletter* **23**: 7.

3. EUROPEAN FEDERATION FOR IMMUNOGENETICS ACCREDITATION PROGRAM. 1995. *Standards for histocompatibility testing.* EFI 1995 e successive modificazioni EFI 1996.