

ИТОГИ МЕЖЛАБОРАТОРНОЙ ПРОГРАММЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ТКАНЕВОГО ТИПИРОВАНИЯ

Абрамов В.Ю.^{1,2}, Гулидова О.В.³, Лебедева Л.Л.⁴, Попова Л.К.¹, Мацуленко Е.Н.¹, Калужина Н.Н.¹

¹ ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ

² Кафедра трансплантологии и искусственных органов Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова

³ ЗАО «БиоХимМак»

⁴ ГУЗ «Банк стволовых клеток» Департамента здравоохранения г. Москвы

Молекулы HLA служат основной мишенью иммунного аллораспознавания. Эффективность трансплантации прямо зависит от совпадения результатов, получаемых разными HLA-лабораториями. В работе обсуждаются результаты, представленные 12 лабораториями тканевого типирования в рамках инициативной программы контроля качества тканевого типирования в 2009 г.

Ключевые слова: HLA, тканевое типирование, контроль качества.

RESULTS OF COLLABORATIVE STUDY FOR TISSUE TYPING QUALITY CONTROL

Abramov V.Y., Gulidova O.V., Lebedeva L.L., Popova L.K., Matsulenko E.N., Kaluzhina N.N.

¹ Academician V.I. Shumakov Federal Research Center of Transplantology and Artificial Organs

² I.M. Setchenov Moscow Medical Academy Department of Transplantology and Artificial Organs

³ BioChemMack joint-stock company

⁴ The Stem Cell Bank of the Public Health Department of Moscow

HLA molecules appear to be the principal target of immune allorecognition. The efficiency of transplant directly depends on coincidence of the data obtained by different HLA laboratories. This study discusses the results produced by 12 tissue typing labs in the framework of the initiative program for tissue typing quality control in 2009.

Key words: HLA, tissue typing, quality control.

Молекулы HLA, отличающиеся уникальным генетически детерминированным полиморфизмом, играют ключевую роль в поддержании гомеостаза иммунной системой. При пересадке органов и тканей человека молекулы HLA становятся основной мишенью иммунного аллораспознавания. Идентичность донора и реципиента по HLA предупреждает отторжение и благоприятствует длительному сохранению функции аллотрансплантата [3].

Внедрение в широкую практику молекулярно-генетических способов тканевого типирования позволило за последние годы унифицировать методическую сторону работы большинства лабораторий, исследующих HLA, и существенно повысить точность и воспроизводимость результатов типирования [5, 6]. Достижению успехов во многом способствовали программы контроля качества исследований, на постоянной основе уже много лет

Статья поступила в редакцию 17.03.10 г.

Контакты: Абрамов Владимир Юрьевич, зав. лаб. трансплантационной иммунологии ФГУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ.

Тел. 8 (499) 193-76-97, **e-mail:** v_abramov@list.ru

проводимые за рубежом. Результативная, но не получившая, к сожалению, развития программа контроля качества серологического типирования антигенов HLA была осуществлена в СССР в середине 1980-х годов Ю.М. Зарецкой с сотрудниками [1]. Сведениями о каких-либо других выполнявшихся или существующих в нашей стране программах контроля качества тканевого типирования мы не располагаем.

Целью данной работы было проведение первой в России и Белоруссии межлабораторной программы контроля качества HLA-типирования и анализ ее результатов. Идея проведения программы была высказана специалистами в области тканевого типирования из этих стран и организационно поддержана компанией ЗАО «БиоХимМак».

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Состав участников межлабораторной программы контроля качества HLA-типирования формировался на добровольной основе. Единственным обязательным условием участия в программе было выполнение типирования молекулярно-генетическим методом, поскольку предусматривалось, что материал для исследования будет предоставлен в замороженном виде.

Каждый участник получил по 5 пронумерованных образцов замороженной венозной крови для исследования. Объем каждого образца крови составлял 5 мл в пробирке с ЭДТА_{Na}₂ (Sarstedt, Германия). Донорами крови служили 5 здоровых добровольцев (4 женщины и 1 мужчина). После венопункции пробирки с кровью были заморожены и хранились при -20 °С в течение 30 сут. Транспортировка образцов

осуществлялась экспресс-доставкой в термоконтейнере с сухим льдом.

Применяемый метод экстракции ДНК был оставлен на усмотрение участника. Программой предусматривалось типирование локусов HLA A*/B*/DRB1* на низком уровне разрешения (две цифры после звездочки), соответствующем типированию частных серологических специфичностей. Вместе с тем за каждым участником сохранялось право самостоятельно решить, какие гены HLA, каким методом и на каком уровне разрешения он будет типировать.

Оценку результатов проводили по принципу максимального согласия (консенсуса), то есть за истинный результат типирования образца принимался результат, полученный большинством участников (консенсус-фенотип).

Выпадающим результатом считалось отклонение сообщенного участником фенотипа от консенсус-фенотипа. Оценку конкордантности типирования полных A*/B*/DRB1* фенотипов выполняли по формуле: (общее число сообщенных фенотипов – число выпадающих фенотипов) x 100% / общее число сообщенных фенотипов. Оценку конкордантности типирования отдельных локусов выполняли по аналогичным формулам.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Предложение принять участие в программе было сделано 18 лабораториям, занимающимся тканевым типированием. Согласием ответили 16 лабораторий. Результаты проведенных исследований получены из 12 лабораторий (табл. 1).

Одиннадцать участников типировали локусы A*/B*/DRB1*, один участник – только DRB1*.

Таблица 1

Список участников программы

Город	Участник	Типированные локусы HLA	Метод выделения ДНК	Метод типирования
Екатеринбург	Областная детская клиническая больница № 1 Центр детской онкологии и гематологии	A*/B*/DRB1*	Колоночная фильтрация, Qiagen	SSP, Invitrogen
Минск	Республиканский научно-практический центр гематологии и трансфузиологии МЗ Республики Беларусь	A*/B*/DRB1*	Магнитная сепарация Invitrogen (ручной метод)	SSP, Invitrogen
Москва	ГУЗ «Банк стволовых клеток» Департамента здравоохранения г. Москвы	A*/B*/DRB1*	Магнитная сепарация Qiagen (на полуавтоматическом анализаторе KingFisher)	SSO, Invitrogen
Москва	ФГУ «ФНЦ трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздравсоцразвития РФ	A*/B*/DRB1*	Магнитная сепарация Invitrogen (ручной метод)	SSP, SSO Invitrogen

Окончание таблицы 1

Город	Участник	Типированные локусы HLA	Метод выделения ДНК	Метод типирования
Москва	Московский координационный центр органного донорства (МКЦОД) ГKB № 11	DRB1*	Растворы для выделения ДНК методом высаливания (ДНК-технология)	ДНК-технология
Москва	Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М.Ф. Владимирского (МОНИКИ)	A*/B*/DRB1*	Магнитная сепарация Invitrogen (ручной метод)	SSO, SSP Invitrogen
Москва	ГУЗМ «НИИ СП им. Н.В. Склифосовского» Департамента здравоохранения г. Москвы	A*/B*/DRB1*	Магнитная сепарация Qiagen (на полуавтоматическом анализаторе KingFisher)	SSO, One Lambda
Нижний Новгород	ФГУ «Приволжский окружной медицинский центр ФМБА России»	A*/B*/DRB1*	Магнитная сепарация Invitrogen (ручной метод)	SSP, Invitrogen
Самара	ГУЗСО «Клинический центр клеточных технологий»	A*/B*/DRB1*	Колоночная фильтрация, Macherey-Nagel	SSO, One Lambda
Санкт-Петербург	Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. Павлова. Институт детской гематологии и трансплантологии им. Р.М. Горбачевой	A*/B*/DRB1*	Колоночная фильтрация, Protrans	SSP, Protrans
Киров	ФГУ «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства»	A*/B*/DRB1*	Магнитная сепарация Invitrogen (автоматическая станция iPrep Purification Instrument)	SSO, Invitrogen
Челябинск	СПКОГУП «Челябинская областная станция переливания крови»	A*/B*/DRB1*	Колоночная фильтрация, Protrans	SSP, Invitrogen, Biotest, ДНК-технология

Представленные 10 участниками результаты соответствовали низкому уровню разрешения. Один участник сообщил результаты типирования DRB1* с высоким разрешением, которые при анализе были сведены к низкому разрешению.

Более половины участников использовали метод экстракции ДНК с применением парамагнитных частиц.

Для типирования локусов HLA участники применяли два метода: SSP (*sequence specific primers*) и SSO (*sequence specific oligonucleotides*). Из 12 участников метод SSP использовали 8 лабораторий, метод SSO – 6 лабораторий, 2 лаборатории сочетали оба метода.

При расчете показателя суммарной конкордантности типирования полных A*/B*/DRB1* фенотипов использовали результаты 11 лабораторий, сообщивших результаты типирования всех трех локусов HLA. В обобщенном виде результаты исследований представлены на рисунке.

Консенсус-фенотип образца № 1: HLA A*02,03 B*35,38 DRB1*04,16. Конкордантность 82%. Результат типирования локуса B*, сообщенный одним участником как B16, был учтен как конкордантный, хотя по формальным признакам не соответствовал номенклатуре. Выпадающие результаты получены

одним участником при типировании локусов B* и DRB1* и одним участником при типировании локуса DRB1*.

Консенсус-фенотип образца № 2: HLA A*02,31 B*50,52 DRB1*01,07. Конкордантность 91%. Результат типирования локуса B*, сообщенный одним участником как B21, был учтен как конкордантный, хотя по формальным признакам не соответствовал номенклатуре. Один выпадающий результат получен при типировании локуса B*.

Консенсус-фенотип образца № 3: HLA A*02,24 B*07,27 DRB1*08,13. Конкордантность 82%. Выпадающие результаты получены двумя участниками при типировании локуса DRB1*, причем в одном случае образец был типирован как гомозиготный DRB1*13,13.

Консенсус-фенотип образца № 4: HLA A*02,26 B*07,51 DRB1*11,13. Конкордантность 91%. Выпадающий результат получен одним участником при типировании локуса B*.

Консенсус-фенотип образца № 5: HLA A*24,33 B*07,14 DRB1*08,15. Конкордантность 91%. Одним участником образец был типирован как гомозиготный DRB1*15,15.

Во всех случаях консенсус-фенотипы соответствовали понятию *full-house* (гетерозиготность по

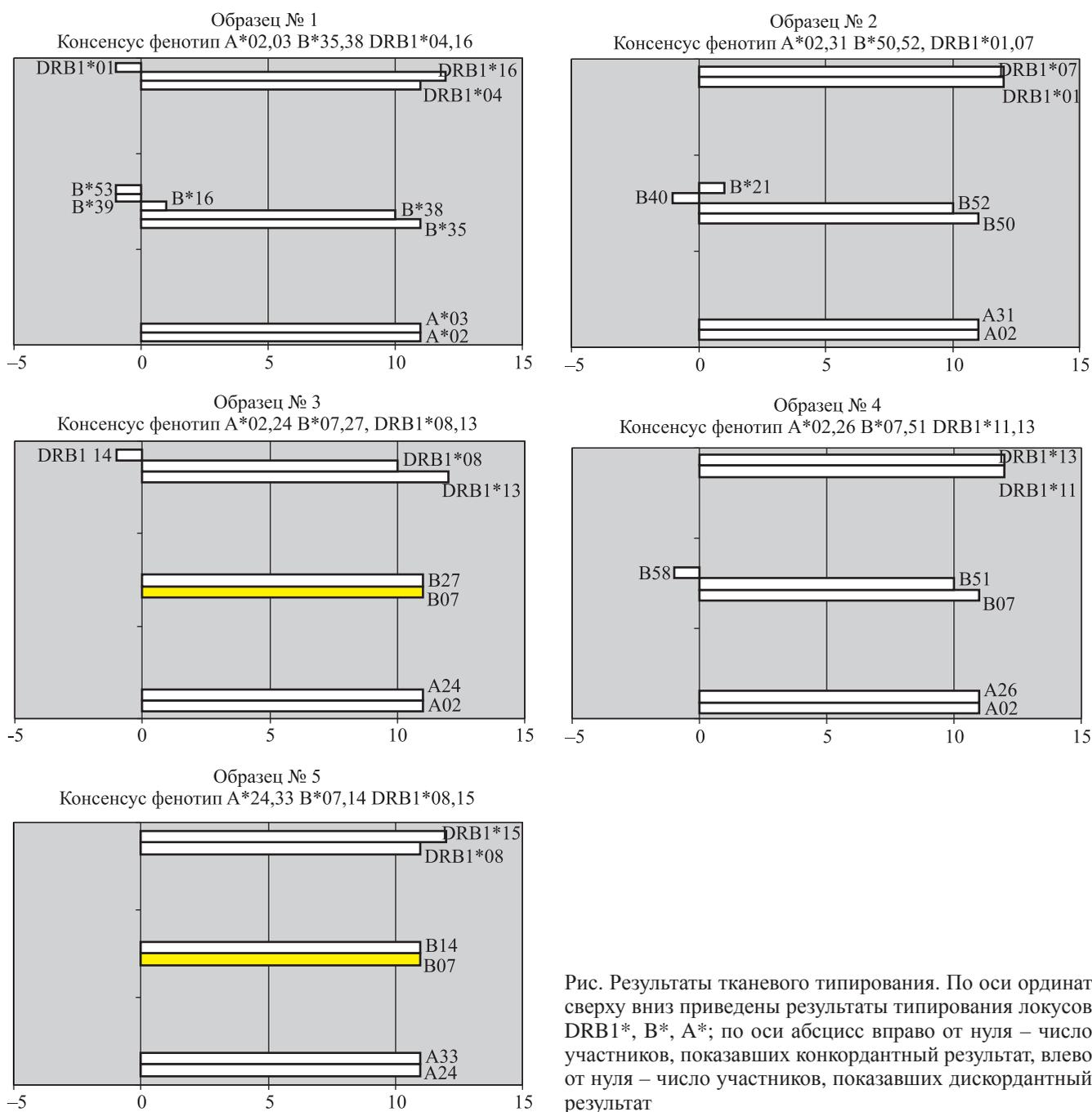


Рис. Результаты тканевого типирования. По оси ординат сверху вниз приведены результаты типирования локусов DRB1*, B*, A*; по оси абсцисс вправо от нуля – число участников, показавших конкордантный результат, влево от нуля – число участников, показавших дискордантный результат

всем исследованным локусам). Достичь полной конкордантности результатов всех участников не удалось ни в одном случае (табл. 2).

Наиболее разноречивые результаты были получены при типировании образцов № 1 и № 3. Вместе с тем необходимо подчеркнуть, что все выпадающие результаты были представлены двумя из 11 участников, типировавших все три локуса HLA, и, таким образом, 9 лабораторий достигли полной конкордантности результатов.

Что касается типирования отдельных локусов HLA, 100-процентная конкордантность была достигнута только при типировании локуса A* (табл. 3). Выпадающие результаты были получены при типировании локуса B* двумя участниками, суммарно представившими 4 выпадающих ре-

Таблица 2
Конкордантность типирования полных фенотипов HLA

Образец	Всего типирований (n)	Выпадающий результат (n)	Конкордантность (%)
№ 1	11	2	82
№ 2	11	1	91
№ 3	11	2	82
№ 4	11	1	91
№ 5	11	1	91

зультата, и при типировании локуса DRB1* двумя участниками, также суммарно представившими 4 выпадающих результата.

Таблица 3
Конкордантность типирования отдельных локусов HLA

Локус HLA	Всего типирований (n)	Выпадающий результат (n)	Конкордантность (%)
A*	55	0	100
B*	55	4	93
DRB1*	60	4	93

ОБСУЖДЕНИЕ

Теоретические расчеты и многолетний практический опыт убеждают в том, что для достижения тканевой совместимости поиск реципиента (при пересадке органов) или донора (при пересадке гемопоэтических тканей) аллотрансплантата придется вести среди тысяч или даже миллионов индивидуумов [2]. Из этого со всей очевидностью вытекает, что медицинские учреждения, выполняющие пересадку и/или заготовку органов и тканей, должны входить в состав крупных объединений, в пределах которых трансплантаты перемещаются туда, где находится совместимый реципиент. Несмотря на сложность задачи, подобные трансплантационные объединения давно и весьма успешно функционируют в Западной Европе и США [4].

Не подлежит сомнению, что эффективность работы трансплантационных сетей и регистров напрямую зависит от точности и воспроизводимости результатов тканевого типирования. Никто не возьмется утверждать, что существуют методы лабораторного исследования, свободные от погрешностей. Однако вопрос следует поставить иначе: насколько эти погрешности часты? Немалый труд по транспортировке трансплантатов имеет смысл, а достижение совместимости и просто возможно лишь тогда, когда результаты типирования HLA, получаемые разными лабораториями, систематически совпадают.

На первый взгляд, неплохая конкордантность результатов типирования полного фенотипа A*/B*/DRB1*, полученных нашими участниками, вселяет оптимизм, однако при более пристальном их рассмотрении мы вряд ли сможем признать итог удовлетворительным в полной мере. Прежде всего ни один образец крови не был типирован всеми участниками одинаково. Во-вторых, участники не смогли достичь 95%-ного уровня конкордантности, на котором уже достаточно давно работают лаборатории Европы и Северной Америки [5]. Наконец, типирование отдельных локусов HLA продемонстрировало достаточно высокий процент расхождений. Для сравнения: в лабораториях трансплантационного объединения «Евротрансплант» степень отклоне-

ния в результатах типирования отдельных локусов HLA колеблется в пределах 0,3–0,8% [6].

По степени конкордантности результатов всех участников можно разделить на две неравные группы. В большую по численности группу попадают девять лабораторий, достигших полной конкордантности результатов. Эти участники применяли разные способы экстракции ДНК, разные методы типирования и пользовались реагентами разных производителей, из чего можно заключить, что указанные факторы не сказываются в настоящее время на качестве тканевого типирования. Поскольку большинству коллективов удалось получить полностью совпадающие результаты типирования, становится очевидным, что отклонения в результатах, полученных двумя остальными участниками, скорее всего, обусловлены не исходно низким качеством каких-либо определенных образцов биоматериала, а проблемами, возникшими на лабораторно-исследовательском этапе.

Несмотря на то, что приведенные результаты не дают всеобъемлющей картины положения дел, а являются, по сути, констатацией *status quo* лишь в некоторых лабораториях, занимающихся типированием HLA, их ценность и полезность, прежде всего как результатов коллективного исследования, выполненного впервые за многие годы, на наш взгляд, неоспорима. Мы планируем продолжить данную программу и повысить ее информативность, предлагая для исследования образцы с редкими или сложными фенотипами. Сознывая, что эффективность любой программы оценки качества во многом зависит от того, насколько активно участвуют в ней специалисты разных лабораторий, мы призываем всех коллег: присоединяйтесь.

Авторы благодарят сотрудников компании ЗАО «БиоХимМак», оказывавших помощь в организации исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зарецкая Ю.М., Абрамов В.Ю., Калужина Н.Н. и др. Итоги Всесоюзной программы клеточного обмена // Гематология и трансфузиология. 1986. № 5. С. 58–60.
2. Зарецкая Ю.М., Леднев Ю.А. HLA 50 лет: 1958–2008. Тверь: Триада, 2008. 152 с.
3. Снелл Дж., Доссе Ж., Натенсон С. Совместимость тканей. М.: Мир, 1979. 501 с.
4. Tilney N.L. Transplant. From myth to reality. London: Yale University Press, 2003. 320 p.
5. www.ctstransplant.org/public/newsletters/2004/pdf/2004-1/pdf?ts, доступ 18 ноября 2009 г.
6. www.eurotransplant.nl/files/annual_report/AR2000.pdf, доступ 18 ноября 2009 г.