

Metodologia di approccio alla tipizzazione HLADRB mediante analisi del DNA

Maria Edvige Fasano⁽¹⁾, Monica Berrino⁽²⁾, Gina Mazzola⁽¹⁾, Ennia Dametto⁽²⁾,
Maurizio Tacconella⁽¹⁾, Francesca Brancatello⁽¹⁾, Francesca Marin⁽¹⁾,
Emilio Sergio Curtoni⁽²⁾

⁽¹⁾UOADU Immunologia dei Trapianti, Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista di Torino

⁽²⁾Dipartimento di Genetica, Biologia e Biochimica Medica, Sezione di Genetica, Università di Torino

Class II molecular typing has major advantages in comparison with serological typing; therefore, in many laboratories the former took the place of the second. In our laboratory, since 1996, serology has been substituted by molecular methods for Class II typing.

In this paper we present our experience on the most important features of molecular techniques for typing at a low and intermediate level. All our laboratory results are analysed in order to establish which is the proportion of unambiguous results that can be obtained. The techniques considered are: "direct and reverse SSOP" and "SSP"; the reagents used are either commercial (Roche, Oxoid-Dynal) or produced in the laboratory. All the techniques described have several steps, each one relevant for a good final result. These steps are: DNA extraction, amplification, deposition of amplicons onto the membranes, hybridisation and colorimetric assay, scoring of the positive probes and interpretation of results obtained. All these aspects are carefully analysed. We present results of the technique "SSOP reverse" obtained using two different kits: Amplicolor DRB20 and 29 (HLA DRB20 and 29). For each probe the alleles recognised are listed. 894 samples were typed using HLA DRB20 and 120 of these had ambiguous results, 702 samples were typed using HLA DRB29 and 134 of them had ambiguous results. "Ambiguity" means that more than two groups of alleles are equally possible considering the results obtained. The operator has no means to distinguish the right results except the higher frequency of some alleles with respect to others in population typed, which does not seem a proper way. The ways to solve these ambiguities are presented, generally using SSP technique. The necessity is discussed that the result analysis take into account the most recent knowledge

concerning the allele classification, which is based on the increasing knowledge of DNA sequences. The allele number has been growing in the last years and a continuous update of them is important in order to obtain good results.

Parole chiave: PCR-SSOP, PCR-SSP, tipizzazione HLADRB.

Key words: PCR-SSOP, PCR-SSP, HLADRB typing.

Introduzione

Molti laboratori hanno abbandonato del tutto la tipizzazione HLA sierologica per la classe II in favore di tecniche di analisi del DNA. La tipizzazione molecolare della classe II presenta, infatti, indiscutibili vantaggi rispetto a quella sierologica.

I principali problemi riscontrati nella tipizzazione sierologica dipendono da:

- 1- rischio di cattiva qualità delle cellule usate per la tipizzazione: i linfociti devono essere sufficientemente reattivi ed al tempo stesso la percentuale di cellule morte aspecificamente deve essere bassa;
- 2- difficoltà di rifornimento di antisieri specifici;
- 3- rischio che un antisiero peggiori la sua qualità nel tempo;
- 4- mancanza di antisieri specifici per alcune delle specificità conosciute; alcune di esse vengono identificate tramite antisieri polispecifici.

Considerati i vantaggi della tipizzazione molecolare rispetto a quella sierologica, nel 1996 il nostro laboratorio decise di abbandonare definitivamente la tipizzazione sierologica degli antigeni HLA-DRB1* passando a quella molecolare.

Il primo sistema di tipizzazione HLA molecolare, che faceva uso di enzimi di restrizione per mettere in evidenza i

Ricevuto: 9 novembre 2000 - Accettato: 14 dicembre 2000

Corrispondenza: Dott.ssa Maria Edvige Fasano

UOADU Immunologia dei Trapianti

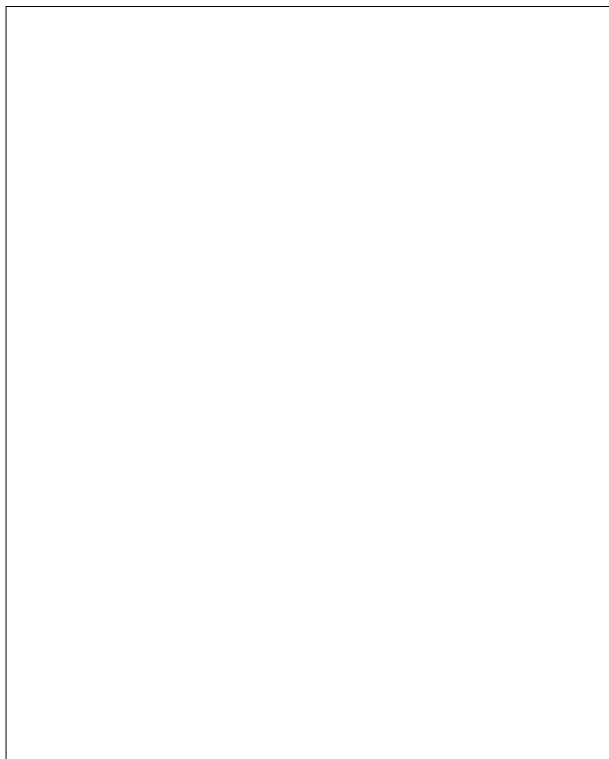
Istituto di Genetica Medica

Azienda Ospedaliera S. Giovanni Battista

Via Santena, 19

10128 Torino

Figura 1: molecola HLA Classe II - Struttura delle molecole HLA di classe II in cui sono evidenziati 4 domini extracellulari (α_1 , α_2 , β_1 , β_2) e il solco combinatorio (evidenziato dal triangolo nero), che accoglie il peptide antigenico, situato tra i due domini distali



relativi polimorfismi (RFLP), fu messo a punto proprio per riconoscere gli alleli di classe II¹. L'introduzione della reazione di polimerizzazione a catena (PCR)² ha permesso lo sviluppo di tecniche più progredite per la tipizzazione molecolare degli alleli HLA.

Queste tecniche permettono di scegliere il livello di dettaglio della tipizzazione, a seconda degli scopi che si intendono raggiungere.

La tipizzazione molecolare di "bassa risoluzione" permette di identificare solo le specificità "broad" (supertipiche) o gruppi di specificità; quella "intermedia" permette di identificare tutte le specificità corrispondenti ad antigeni evidenziati sierologicamente e, in più, di identificare qualche allele subtipico³.

Infine, una tipizzazione ad "alta risoluzione" permette di suddividere ciascuno degli alleli identificati con la risoluzione intermedia in più alleli subtipici.

La tipizzazione molecolare ad alta risoluzione della Classe II permette di evidenziare oltre 200 alleli al locus HLADRB*, mentre usando metodi di tipizzazione sierologica si può evidenziare un numero considerevolmente inferiore di specificità⁴ (Figura 1).

Il polimorfismo DRB* è localizzato a livello dell'esone 2 e più precisamente è ristretto in 3 regioni ipervariabili⁵. Le differenze per HLA-DRB1* fra donatore e ricevente di un trapianto di midollo osseo sono in grado di provocare un'intensa reazione da parte dei linfociti T allogeneici: di conseguenza sono associate con lo sviluppo della *Graft versus Host Disease*⁶. Uno dei maggiori problemi incontrati nella tipizzazione molecolare della classe II è il gran numero di alleli finora identificati. Nel 1991 gli alleli identificati al locus DRB erano 34⁴, nel luglio 1996 erano 229⁷ e 268 nei dati pubblicati nel 1998⁸. Per questi motivi, il problema dell'aggiornamento della nomenclatura e della tipizzazione in laboratorio non è di poco conto.

Al fine di facilitare la corretta identificazione di tutti gli alleli trovati, si sono stabilite regole sull'identificazione di nuovi alleli.

È ora possibile accedere al sito web della Fondazione Anthony Nolan⁹, dove sono riportati ogni due mesi i cambiamenti intervenuti. Si può vedere come dalla creazione del sito Internet a oggi siano state apportate notevoli modifiche. Come esempio di importante cambiamento di attribuzione, si può citare il caso di un allele che era sembrato subtipico a DRB4*0101 e, invece, da studi successivi è risultato subtipico a DRB4*0103. Pertanto la sua denominazione, che era DRB4*010102N, è stata cambiata in DRB4*0103102N¹⁰.

Scopo del lavoro

La presente indagine ha i seguenti obiettivi:

- indagare gli aspetti tecnici della tipizzazione molecolare della Classe II ai livelli di risoluzione basso ed intermedio;
 - analizzare i risultati della tipizzazione che possono generare ambiguità nell'assegnazione degli alleli, allo scopo di identificare una metodologia per la loro soluzione;
 - confrontare i livelli di risoluzione forniti da diversi set di reagenti (in pratica da diversi kit forniti dal commercio) per valutare quanto nell'evoluzione sulla conoscenza degli alleli HLA sia riflesso nei kit di più recente produzione.
- Pertanto, verrà qui riportata l'esperienza acquisita eseguendo la tipizzazione HLA-DRB1* con i prodotti commerciali usati nel nostro laboratorio, oppure con reagenti prodotti dal laboratorio stesso, sulla scorta di indicazioni fornite da altri laboratori e pubblicate su riviste scientifiche. Molte delle osservazioni che verranno esposte sono di carattere generale, perciò sono valide per affrontare situazioni che si incontrano nel corso della tipizzazione molecolare, anche usando kit diversi da quelli menzionati.

Materiali e metodi

Tecniche di laboratorio

Sono stati indagati, per la tipizzazione di livello basso o intermedio, i due metodi che principalmente si utilizzano per la tipizzazione molecolare di classe II: la tecnica PCR-SSOP (PCR seguita da ibridazione con oligonucleotidi sequenza-specifici) e PCR-SSP (dove la PCR è eseguita usando *primers* sequenza-specifici).

PCR-SSOP reverse

La metodica PCR-SSOP¹¹ è una tecnica accurata nella quale le sonde impiegate presentano nella parte centrale la sequenza specifica, che si legherà alla porzione complementare del DNA da tipizzare. Uno degli svantaggi di questa tecnica è che sono necessarie parecchie ore per ottenere il risultato: pertanto, non può venire utilizzata nei casi in cui si debba effettuare una tipizzazione urgente.

Per questa ragione, le case produttrici hanno sviluppato ed introdotto sul mercato dei metodi chiamati "PCR-SSOP reverse" (PCR-SSOP-inversa)¹². In questi metodi, le sonde sono state legate ad un supporto solido, tramite un polinucleotide costituito da sola timina, in modo da lasciare la parte finale libera d'interagire con il DNA amplificato da tipizzare. Questo ha, alle due estremità, i *primers* marcati con biotina e si legherà solo a quelle sonde a cui è complementare. I prodotti biotinilati sono evidenziati aggiungendo un anticorpo anti-biotina complessato alla streptavidina-perossidasi di rafano: questa reagisce con il substrato, tetrametilbenzidina, con formazione di un prodotto colorato.

PCR-SSP

Nei casi in cui la tipizzazione venga effettuata utilizzando il metodo PCR-SSP, è il risultato dell'amplificazione stessa che evidenzia gli alleli, poiché si utilizzano un *primer* complementare all'estremità 5' e due o più *primers antisense* rispetto all'estremità 3'¹³. Questo metodo ha un grande potere di risoluzione ed anche accuratezza e velocità di esecuzione: in tre ore si può ottenere una tipizzazione completa sia di Classe I che di Classe II. Malgrado siano state introdotte sul mercato apparecchiature automatiche per facilitare la distribuzione dei reagenti, uno dei fattori limitanti il suo utilizzo può essere rappresentato dal numero di miscele di *primers* per le amplificazioni necessarie alla tipizzazione di un individuo. Infatti, nel caso della tipizzazione per alleli HLA-DRB con la metodica PCR-SSP in bassa risoluzione, sono necessarie 24 miscele di amplificazione per individuo. Questo condiziona anche il numero totale di tipizzazioni che si possono eseguire contemporaneamente: infatti, in un amplificatore a 96 posti,

si può eseguire un massimo di 4 tipizzazioni alla volta. Inoltre, al momento non sono disponibili sistemi automatici che facilitino la deposizione degli amplificati sul gel e non sono diventati di uso comune i sistemi sostitutivi di questa fase¹⁴.

Reagenti utilizzati

SSOP- diretta

Per quanto riguarda la tecnica SSOP-diretta, nel nostro laboratorio fu messo a punto, nel corso del XII Workshop Mondiale di Istocompatibilità, un metodo di tipizzazione che utilizza alcune sonde selezionate per raggiungere un livello di risoluzione intermedio. Il sistema presenta 19 sonde e richiede un certo impegno tecnico per l'esecuzione; viene, perciò, eseguito quando si raccolga un numero consistente di campioni (almeno 80). Nel nostro laboratorio viene utilizzato per controllare tipizzazioni già effettuate con tecniche sierologiche, per tipizzare pazienti in attesa di trapianto di fegato o di cuore e volontari al loro ingresso nel registro regionale dei possibili donatori di midollo osseo.

SSOP-reverse

Per quanto riguarda il sistema SSOP-reverse, sono stati usati i kit preparati dapprima dalla ditta Roche (La Roche Ltd, Basilea, Svizzera) e successivamente dalla ditta Oxoid (Oxoid S.p.A., Garbagnate M.se, Italia), distributore per l'Italia dei prodotti Dynal (Dynal AS, Oslo, Norvegia).

Inizialmente, il sistema di reagenti distribuito dalla ditta Roche comprendeva 19 sonde (Tabella I) fissate su un supporto solido, con nome AmpliCor DRB20 o HLA DRB20. Con questo kit nel nostro laboratorio sono stati esaminati 894 campioni di DNA.

Nel corso del 1997, furono introdotte delle nuove sonde, che da 19 divennero 28 (AmpliCor DRB29 o HLA DRB29) (Tabella II), ed il kit venne distribuito dalla ditta Oxoid. Con questo secondo kit, sono stati esaminati 702 campioni provenienti da persone diverse da quelle precedenti. In entrambi i kit è prevista una amplificazione iniziale generica dell'esone 2 del gene DRB1* con coamplificazione dei geni B3*, B4* e B5*. Gli ampliconi si fissano alle parti complementari delle sonde; il sistema di rivelazione è costituito dal complesso streptavidina-perossidasi di rafano. Viene fornito un programma informatico che esegue l'interpretazione dei risultati ottenuti. Il programma considera come ugualmente probabili tutte le combinazioni possibili risultanti dalle positività ottenute.

Il tipo di risoluzione fornito è medio-basso: medio, in quanto il risultato di una sola reazione può rivelare la

Tabella I: alleli riconosciuti dalle sonde del kit HLA DRB-20

Sonde	HLADRB1*
1	0101-0104
2	1501-1504,1601-1606
3	03011,03012,0302-0304,1101-1104,1106-1113,1301-1313,1401-1403,1405-1409,1412-1414,1416-1417
4	0401-0418
5	0701
6	1105,1201-1203,1404,1411,0801-0811,1415
7	0901
8	1001
9	0415,1101-1113,1411
10	1401,1404,1407-08,1410,1416,0808
11	0405,0409-0412, 1303,1304, ,1312-1313,1413,0801,0803,0805,0806,0810
12	03011,0302-0304,1107
13	0103,0402,0414,1102,1301-1302,1304,1308,1416
14	1201-1203
15	1604,0412,0418,1313,1403,1412,0801-0804,0806-0811,1415
	HLADRB3*
16	0101
17	0201-0202,0301
	HLADRB4*
18	0101-0103
	HLADRB5*
19	0101-0102,0201-0203
20	0101

Tabella II: alleli riconosciuti dalle sonde del kit HLA DRB-29

Sonde	Alleli
1	HLA DRB1*0101,01021-0104
2	HLA DRB1*1501-1505,1601-1605
3	HLA DRB1*03011,03012,03021-0303,0307,1101-1104,1106-1121,1123-1126,1301-1316,1318-1320-1323,1401-1403,1405-1409,1412-1414,1416-1425
4	HLA DRB1*0401-0422,1122,1410
5	HLA DRB1*0701
6	HLA DRB1*1105,1201-1204,1317,1404,1411,1415,0801-0813,
7	HLA DRB1*0901
8	HLA DRB1*1001
9	HLA DRB3*0201-0204
10	HLA DRB1*03011,03012,0304-0306, HLA DRB3*0101
11	HLA DRB1*03021,03022-0303,1315,1319,1402,1403,1406,1412,1413,1418-1420,1424, HLA DRB3*0205,0301
12	HLA DRB1*0701,1110, 1112,1113, 1117,1308,1319,1401, 1404-1405, 1407-1408,1410,1411,1414-1416, 1420, 1422-1423,0808 HLA DRB3*0301
13	HLA DRB1*03011,03012,03021,03022,0303,0305-0307,1109,1116,1120,1301,1302, 1305-1306,1309,1310,1315,1316,1318,1402-1403,1406,1409,1412,1413,1417,1418,1419, 1421,1424
14	HLA DRB1*0415,11011-1126 ,1204,1411
15	HLA DRB1*1401,1404,1407,1408,1410,1416,1422,1425,0808
16	HLA DRB1*0405,0409,0410,0411,0412,0417,1122,1303,1304,1312,1321,1413,0801,0803, 0805,0806, 0810, 0812
17	HLA DRB1* 03011, 03021,0303-0307, 0422,1107
18	HLA DRB1*0103,0402,0414,1102,1114,1116,1120-1121,1301-1302,1304,1308,1315,1317,1319,1322,1323,1416
19	HLA DRB1*0101,01021,0104,0404,0405,0408,0410,0419,1126,1402,1406,1409,1413,1417,1420
20	HLA DRB1*0401,0409,0413,0416,0421,1419,1421
21	HLA DRB1*1201-1204
22	HLA DRB1*1604,0412,0418,1123,1125,1318,1403,1412,0801,0804,0806-0812,1415 HLA DRB5*0104
23	HLA DRB1*01021,1106,1121,1201-1202 ,1204, 0812 HLA DRB5*0201,0202
24	HLA DRB3*0101
25	HLA DRB3*0201-0205,0301
26	HLA DRB4*0101-0103
27	HLA DRB5*0101,0102,0103,0104,0201,0202
28	HLA DRB5*0101,0104

presenza certa di due diversi gruppi di alleli; basso, in quanto non è sempre possibile ottenere una tipizzazione univoca perché, talora, un determinato risultato può corrispondere ad alleli diversi, equivalenti anche a più antigeni identificabili sierologicamente.

Sistema PCR-SSP

Per quanto riguarda il sistema PCR-SSP sono state usate miscele di *primers* fornite dalla ditta Oxoid sotto il nome commerciale di Dynal SSP DR *low resolution*.

Risultati e discussione

A differenza delle più comuni determinazioni che si eseguono nel laboratorio di analisi cliniche, la tipizzazione HLA, sia sierologica che molecolare, comporta l'esecuzione di diversi passaggi prima di ottenere il risultato finale. Tutti questi diversi momenti della tipizzazione possono essere ugualmente importanti: un errore in uno qualunque di essi può pregiudicare il risultato finale. L'esperienza sull'uso delle metodiche illustrate nel paragrafo precedente ci ha permesso di rilevare vari aspetti delicati relativi alle diverse tappe della tipizzazione. Di seguito, sono esaminati i diversi passaggi effettuati per l'esecuzione della tipizzazione molecolare: estrazione del DNA - amplificazione - deposizione degli amplificati sulle membrane - ibridazione e rivelazione - lettura ed interpretazione del risultato. Ne abbiamo derivato alcune raccomandazioni, che riportiamo.

Estrazione del DNA

L'estrazione del DNA è uno dei passaggi determinanti per la buona riuscita del risultato. Il DNA estratto deve essere di buona qualità, nel senso che deve essere integro, non frammentato, non contaminato, ben disciolto e in quantità sufficiente per effettuare i test necessari. La scelta del metodo di estrazione del DNA può dipendere dal tipo di determinazione richiesta (quindi dal tipo di amplificazione necessaria) e dalla necessità di conservare a lungo il DNA estratto. Gli ampliconi di Classe I sono più lunghi rispetto a quelli di Classe II; pertanto, ogni laboratorio deve scegliere il metodo più opportuno di estrazione effettuando delle prove. Queste possono avvenire in tempi diversi, allo scopo di saggiare la possibilità del DNA ottenuto di venire conservato a lungo, e usando diversi tipi di determinazioni (amplificazioni di Classe I e II) in modo da scegliere il metodo di estrazione migliore.

Contaminazione da proteine

Nell'esposizione delle metodiche di estrazione di DNA viene detto che la contaminazione di proteine accettabile

per una buona tipizzazione non deve superare una certa quota. Questa viene determinata mediante il confronto fra la lettura spettrofotometrica del DNA a 260 nm e quella a 280 nm: tale confronto deve dare valori fra 1,6 e 1,8. In realtà, nell'esperienza di laboratorio si è osservato che anche una contaminazione superiore (con rapporto compreso fra 1,4 e 1,6) consente una buona tipizzazione del DNA. Si è osservato anche che la quasi totalità delle estrazioni effettuate utilizzando micrometodi mostra valori compresi fra quelli indicati sopra. Pertanto, nella pratica corrente la valutazione spettrofotometrica della contaminazione delle proteine è stata abbandonata.

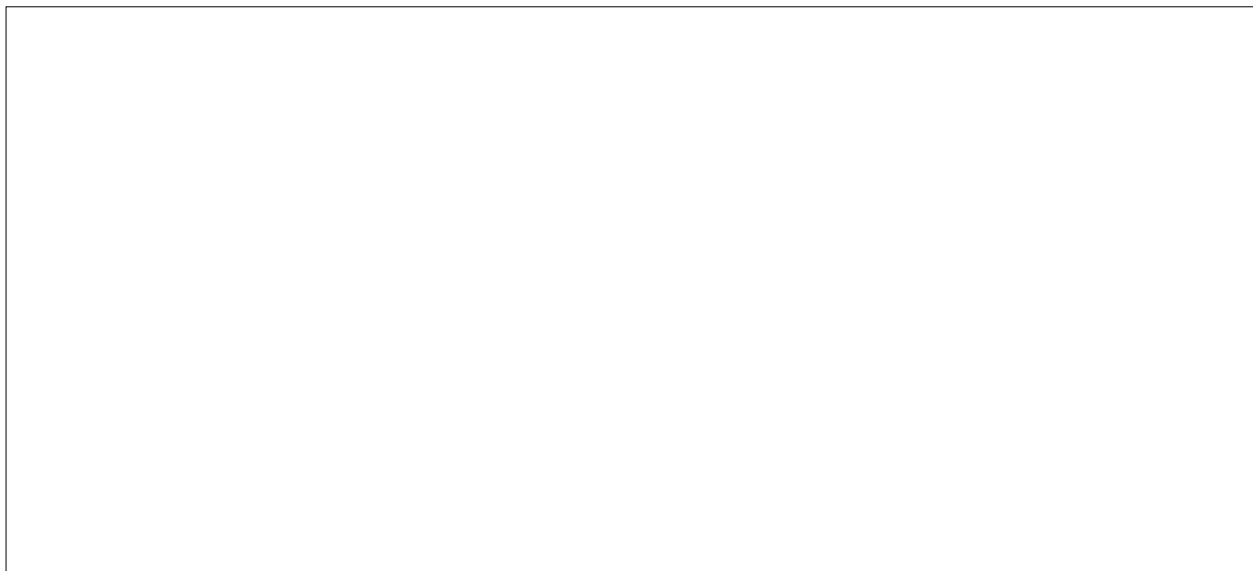
Concentrazione del DNA

L'esatta determinazione della concentrazione del DNA è importante, soprattutto quando si eseguono tipizzazioni in alta risoluzione; infatti, un DNA eccessivamente concentrato può dar luogo ad extra-bande di amplificazione che rendono impossibile l'esecuzione del test. Qui di seguito (Figura 2) viene mostrata la corsa elettroforetica di un campione di DNA analizzato con il kit Oxoid SSP per distinguere DRB1*03/*11/*13, di cui si parlerà in seguito. Nella parte sinistra della foto, il campione è stato usato indiluito, mentre, nella parte a destra, lo stesso campione è stato diluito. Quando si adopera il DNA concentrato, sono presenti bande che porterebbero ad attribuire un risultato non attendibile, perché il campione risulterebbe DRB1*03,11. Invece, dall'analisi delle positività riscontrate usando il campione dopo opportuna diluizione, la tipizzazione risulta DRB1*11. Quest'ultima attribuzione sembra quella corretta, in quanto nel test Amplicor DRB29, effettuato in precedenza, gli alleli riscontrati erano DRB1*11XX, indistinguibile da DRB1*11XX/13XX, e non si prevedeva la presenza di DRB1*03.

Amplificazione

Anche adoperando kit commerciali, come quello impiegato nel nostro laboratorio per la tipizzazione HLA-DRB, è sempre opportuno controllare che l'amplificazione sia effettivamente avvenuta, depositando su gel pochi microlitri dell'amplificato ottenuto. Questo va fatto per non avere sorprese finali. Infatti, si otterrà con certezza un buon risultato solo in presenza di un amplificato abbondante. Per valutare l'efficienza dell'amplificazione, non occorre di solito un dosaggio preciso: è sufficiente una stima effettuata confrontando lo spessore della banda del campione in esame con lo spessore della banda fornita da un frammento di fago (a concentrazione nota di DNA) di lunghezza analoga. Per ottenere frammenti-campione di lunghezza voluta, si taglia il fago a diverse lunghezze mediante enzimi di restrizione. L'amplificazione va

Figura 2: diversi risultati ottenibili da uno stesso campione di DNA. Migrazione elettroforetica di un campione di DNA analizzato con il kit Dynal SPP per distinguere DRB1*03/*11/*13. È stato usato lo stesso campione di DNA a differenti concentrazioni. Nella figura sono visibili le bande di amplificazione del controllo e quelle specifiche. Nella parte a sinistra della figura, in cui si è adoperato DNA più concentrato, sono risultate positive le amplificazioni nelle posizioni n.1,3,4,5,6 corrispondenti ad una tipizzazione DRB1*03XX/11XX, Nella parte destra sono risultate positive le amplificazioni nelle posizioni n.3 e 5 corrispondenti ad una tipizzazione DRB1*11XX. Al centro è presente il marcatore del peso molecolare.



documentata con una fotografia che è opportuno conservare. In mancanza di avvenuta amplificazione, è meglio riconsiderare tutto il lavoro svolto in modo da evitare il rischio di gravi errori. Si può, infatti, trattare di una semplice dimenticanza, ma anche di un errore più importante.

Deposizione degli amplificati sulle membrane di ibridazione

Nel caso della tipizzazione SSOP-*reverse* questo passaggio è notevolmente semplificato, in quanto si tratta di aggiungere un amplificato per volta nelle vaschette in cui sono contenute le strisce per l'ibridazione.

Nel caso dell'utilizzo di un metodo SSOP diretto, questo passaggio è molto importante ma molto difficile, se lo si esegue del tutto manualmente. Il supporto su cui vengono depositi gli amplificati deve avere dimensioni standard per adattarsi alle vaschette in cui si eseguiranno i passaggi successivi. Si preparano delle griglie quadrettate che servono come guida per la deposizione dei campioni e che vengono poste sotto le stesse membrane di nylon su cui si depositeranno i campioni. Si può facilmente comprendere come l'esecuzione manuale, cioè senza l'aiuto di una macchina, richieda molto tempo, attenzione e, in ogni caso, risulti imprecisa. È impossibile, anche adoperando pipette precise, che la goccia venga depositata esattamente nella stessa quantità dappertutto; la deposizione sarà irregolare

nello spazio e, inoltre, può capitare di dimenticarsi di depositare il campione. Tutte queste difficoltà possono venire evitate utilizzando una macchina che si occupi di depositare automaticamente gli amplificati su molti filtri di ibridazione. Purtroppo, queste apparecchiature sono molto costose; peraltro, sono largamente utilizzate in altri paesi dove questa metodica è molto usata.

Ibridazione e rivelazione

È necessario un controllo scrupoloso della temperatura alla quale si effettuano l'ibridazione ed i lavaggi, e una attenta preparazione delle miscele di ibridazione, lavaggio e determinazione colorimetrica. Le strisce devono essere sempre completamente immerse nei liquidi; l'ibridazione deve avvenire in costante e vivace agitazione in modo che, al termine della determinazione, si abbia una colorazione uniforme della striscia, senza la presenza di macchie di colore. Le vaschette in cui si effettuano le ibridazioni devono essere ben fissate al bagnomaria, in modo da permettere una agitazione costante e assicurare la stessa temperatura in ogni punto. Può accadere che la temperatura del bagnomaria non sia stata ben controllata o abbia subito delle variazioni durante l'esecuzione del test. Nel caso in cui essa sia stata superiore a quella indicata, le positività possono risultare più deboli. In questo caso, è bene ricontrollare le tipizzazioni ottenute. Nella nostra pratica ci

è accaduto, usando il kit di tipizzazione SSOP-*reverse* HLA DRB29, di trovare nella stessa mandata di ibridazione due campioni che presentavano la tipizzazione DRB1*03012. Questo allele, a differenza degli alleli DRB1*03 più comuni, non dà reazione positiva con la sonda 17-KGR. Gli stessi campioni, riesaminati una seconda volta in condizioni controllate, hanno mostrato il comportamento degli alleli DRB1*03 più comuni, con positività della sonda 17-KGR. Nella precedente tipizzazione questa reazione risultava negativa per una alterazione della temperatura.

Un controllo scrupoloso delle temperature è essenziale anche nel caso in cui si usino sistemi artigianali, ad esempio una tipizzazione mediante SSOP in cui le sonde siano state prodotte nel laboratorio stesso.

Letture e interpretazione delle positività ottenute

Letture delle strisce e dei filtri senza l'ausilio di sistemi automatici

L'esperienza ci ha insegnato che la lettura deve essere fatta sempre da due persone, ricontrollando le eventuali letture discordanti incontrate. La positività della sonda può essere semplicemente indicata con un segno + oppure con l'indicazione di uno *score*, analogamente a quanto viene fatto in sierologia. Quest'ultimo metodo è sicuramente più complesso ma può risultare utile nei casi in cui le sonde reagiscano diversamente una dall'altra, in modo da identificare alcune di esse come sonde deboli ed altre come sonde forti. Usando il kit in oggetto, abbiamo sovente incontrato dei problemi nell'attribuzione della tipizzazione finale in presenza di positività della sonda 19-QRR. La sonda riconosce i seguenti alleli DRB1*: 0101, 0104, 0105, 01021, 0404, 0408, 04019, 04023, 1126, 1134, 1402, 1406, 1409, 1417, 1430, 1413, 1420, 1429. Non vi sono difficoltà di interpretazione quando la sonda è positiva insieme alle altre che riconoscono gli alleli DRB1*01: insieme, concorrono all'identificazione di questi alleli. I problemi si incontrano quando la positività della sonda sarebbe da attribuirsi alla presenza di qualcuno degli altri alleli riconosciuti.

Qui di seguito è illustrato un esempio dei problemi incontrati nella tipizzazione dovuti a questa sonda. Il campione 16492 è risultato positivo con le seguenti sonde: 3-YSTS; 6-YSTG; 9-FEH; 14-E; 22-L; 25-LLS; 29-Controllo interno positivo. Mentre le reazioni elencate erano fortemente positive, in corrispondenza della sonda 19-QRR si è osservata una debole positività, di cui bisognerebbe, comunque, tenere conto perché superiore a quella della sonda controllo. Il risultato della tipizzazione cambia considerevolmente se si considera questa sonda come realmente positiva oppure se la si trascura. Considerando come falsa la positività con la sonda 19, l'interpretazione

indica che vi è una delle seguenti possibili combinazioni di alleli, suddivise in tre gruppi alternativi, elencati nella tabella III. Se invece si considera vera la positività della sonda 19, una possibile interpretazione della tipizzazione prevede che la persona sia eterozigote per uno degli alleli DRB1*11 e per uno degli alleli DRB1*08 qui elencati: DRB1*1126, 1134 & 08021, 08022, 08041-08043, 0807, 08011, 08013, 08019; DRB3*0201, 0202, 0203, 0206, 0207. Quest'ultima interpretazione è la meno probabile, a causa della bassissima frequenza degli alleli 1126 e 1134; perciò, la loro presenza dovrebbe essere confermata da uno studio familiare. Se questo non è possibile, allora in pratica sembra consigliabile considerare la reazione con la sonda 19-QRR come "falsa positiva".

Tale falsa positività può dipendere dal funzionamento non ottimale della sonda: in questo caso, anche una ripetizione della reazione non fornirebbe risultati più attendibili. Oppure, può dipendere da condizioni di lavoro non sufficientemente controllate, delle quali questa sonda risente particolarmente: in questo caso, una ripetizione della reazione in condizioni di lavoro meglio controllate può fornire risultati più chiari.

Abbiamo avuto un'analogia esperienza eseguendo la tipizzazione DRB1 con un metodo SSOP-diretto che utilizza alcune delle sonde del XII Workshop (come menzionato in precedenza).

Adoperiamo per tutte le sonde una temperatura unica di ibridazione a 56 °C ed usiamo il TMAC (Tetrametilammonio Cloruro, Merck-Hohenbrum Schuchard, Germany) nei lavaggi fatti alla temperatura di stringenza¹⁵. Effettuare le ibridazioni delle sonde alla medesima temperatura permette una più facile organizzazione del lavoro, ma non tutte le sonde usate funzionano in modo ottimale alla temperatura scelta, così come non forniscono reazioni positive ugualmente chiare. Pertanto, si possono incontrare difficoltà nel distinguere una reazione positiva debole da una reazione falsamente positiva, analogamente all'esempio illustrato sopra.

Per controllare l'affidabilità del risultato ottenuto vengono, allora, aggiunti ad ogni nuova ibridazione dei campioni di controllo a tipizzazione nota che reagiscono con le sonde utilizzate: questi permettono di confrontare il risultato con quelli ottenuti in precedenza, in modo da stabilire per ogni ibridazione il tipo di reattività delle sonde. Se le condizioni della reazione sono ben standardizzate, non sussiste grande differenza di comportamento delle sonde nelle diverse ibridazioni; pertanto, queste vengono classificate come sonde forti quando interagiscono con *spot* molto evidenti, oppure, come sonde deboli ma specifiche se mostrano reazioni deboli ma testimoniate positive dai controlli.

Lettura delle strisce e dei filtri con l'ausilio di sistemi automatici

La lettura delle positività è sicuramente uno dei passaggi che richiedono una maggiore standardizzazione. Nel caso dei sistemi "SSOP-diretto", la lettura automatica è possibile solo se la deposizione dei campioni è avvenuta utilizzando la macchina, che è l'unico sistema in grado di garantire una deposizione standardizzata. Nel sistema commerciale illustrato, dovrebbe essere relativamente semplice mettere a punto il sistema di lettura automatica. Infatti, la deposizione delle sonde è standardizzata e le strisce sono di materiale rigido. Le positività ottenute dovrebbero essere molto uniformi tra di loro, in modo da facilitare il compito del lettore. Questa apparecchiatura è ora diventata disponibile.

Importanza di un sistema di interpretazione automatica dei risultati per mezzo di un software interpretativo

Quando si adoperano sistemi commerciali, si ha la possibilità di utilizzare un software interpretativo che analizza i *patterns* ottenuti da ogni campione e attribuisce una tipizzazione. Chi ha preparato il programma ha inizialmente inserito tutti gli alleli che vengono riconosciuti da ogni singola sonda: la positività di una determinata sonda può indicare che è presente uno degli alleli elencati oppure due (allo stato eterozigote). L'analisi dei *patterns* ottenuti può venire fatta senza l'aiuto di un programma, ma sicuramente sarà meno esauriente, perché l'operatore potrà non vedere delle combinazioni che invece saranno individuate dal programma. Inoltre, c'è il vantaggio di poter memorizzare i risultati in computer e di ottenere una stampa del risultato che potrà essere archiviata e ricontrollata in qualsiasi momento. Infatti, la semplice e veloce visualizzazione al video può non essere sufficiente per assegnare una tipizzazione. Nel nostro laboratorio è stato preparato, in collaborazione fra gli operatori stessi, anche un programma di interpretazione nei casi in cui la tipizzazione molecolare sia stata eseguita, come già detto, usando sonde non acquistate da ditte commerciali. Questo sistema ci permette di agire direttamente introducendo le nuove sonde usate, cambiandone altre che non funzionano adeguatamente e aggiungendo gli alleli descritti più di recente. Inoltre, ci permette di analizzare il funzionamento delle sonde stesse ed è in grado di attribuire una tipizzazione anche in presenza di mancata reazione di alcune tra le sonde usate o in presenza di reazioni extra.

Limite generale rappresentato dall'uso di un sistema commerciale di tipizzazione molecolare

Mentre da una parte il sistema commerciale offre indiscutibili vantaggi di affidabilità e riproducibilità dei risultati ottenuti, dall'altra presenta lo svantaggio di non

conoscere a fondo il sistema che si adopera. Infatti, le sequenze delle sonde adoperate si possono solo dedurre, in quanto non viene resa nota la sequenza nucleotidica. Questo fa sì che l'aggiornamento debba essere obbligatoriamente fatto dalla ditta stessa produttrice del kit. Fino ad oggi non si è avuto dalla ditta un servizio veloce di aggiornamento, nel senso che non viene distribuito periodicamente un nuovo software interpretativo che tenga conto dei nuovi alleli riconosciuti dalle sonde. In questa situazione si può correre il rischio di attribuire tipizzazioni in modo non corretto. Nella tabella IV è mostrato un esempio di come usando una schema di interpretazione non aggiornato si possano trascurare degli alleli che potrebbero essere considerati se si usasse uno schema di interpretazione aggiornato. Nella tabella II è stato presentato lo schema di interpretazione usato per la descrizione della casistica mostrata nel presente studio.

Analisi dei problemi di interpretazione del sistema di tipizzazione SSO-reverse

Confronto fra i kit HLA DRB20 e DRB29: problemi interpretativi comuni

Sulla base degli schemi che accompagnano i kit HLA DRB20 e DRB29, abbiamo preparato gli elenchi degli alleli riconosciuti. Al posto dello schema mostrato per il prodotto HLA DRB29, dal giugno 1999 è stato introdotto un altro schema aggiornato per quanto riguarda le sequenze degli alleli e la nomenclatura. Come abbiamo già esaminato nell'esempio dello schema del capitolo precedente, l'aggiornamento non porta ad una semplificazione nell'interpretazione dei risultati; anzi, aumenta le possibili combinazioni da considerare. È stata impossibile la revisione di tutte le tipizzazioni esaminate nel presente studio, usando lo schema con l'aggiornamento degli alleli. Nelle tabelle V e VI sono confrontate le sonde impiegate rispettivamente nei kit HLA DRB20 e HLA DRB29 e gli alleli riconosciuti da alcune delle nuove sonde inserite. Utilizzando il kit HLA DRB20 su 894 campioni, 120 (13,4%) presentavano tipizzazioni ambigue; nel caso delle 702 tipizzazioni eseguite con l'altro kit HLA DRB29, 134 (19%) fornivano risultati ambigui. Con nessuno dei due kit è possibile attribuire tutti gli alleli DRB1*15 o DRB1*16. Nell'interpretazione automatica della tipizzazione, gli alleli DRB1*15 vengono assegnati in termini probabilistici, per *linkage disequilibrium* in presenza degli alleli DRB5*01. Analogamente, anche i diversi alleli DRB1*16 vengono assegnati in termini probabilistici, cioè tenendo conto del *linkage disequilibrium* con alleli DRB5*02. Questo non è rigoroso, in quanto sono conosciute le possibili eccezioni a queste associazioni; pertanto, si potrebbe assegnare

Tabella III: possibili interpretazioni alternative di una medesima tipizzazione in bassa risoluzione

1	DRB1*11011-11013, 1103, 11041, 11042, 11081, 11082, 1111, 1115, 1118, 1119, 1124, 1127, 1128, 1129, 1132 & 08021, 08022, 08041-08043, 0807, 08011, 08013, 08019; DRB3*0201, 0202, 0203, 0206, 0207
2	DRB1*1105 & 1125; DRB3*0201, 0202, 0203, 0206, 0207
3	DRB1*1125 & 08021, 08022, 08041-08043, 0807, 08011, 08013, 08019; DRB3* 0201, 0202, 0203, 0206, 0207.

- Una possibile interpretazione della tipizzazione rilevata prevede che la persona sia eterozigote per uno degli alleli DRB1*11 elencati e per uno degli alleli DRB1*08 elencati nel gruppo 1.
- Un'altra possibile interpretazione prevede che la persona sia eterozigote per due degli alleli DRB1*11 elencati nel gruppo 2.
- Una terza possibile interpretazione è che la persona sia eterozigote per l'allele DRB1*1125 e per uno degli alleli DRB1*08.

Tabella IV: esempi di attribuzione di tipizzazioni

Campione	Interpretazione kit-HLA DRB29	Interpretazione kit-HLA DRB29 dopo aggiornamento alleli
16338	11/13	11 11/13
16346	11/08	11/08 11 11/1313

Nella tabella vengono indicati degli esempi di diversa interpretazione nel caso in cui venga usato il medesimo schema di interpretazione dopo aggiornamento degli alleli

erroneamente DRB1*15 al posto di DRB*16, o viceversa. Se si vuole tipizzare con esattezza, bisogna eseguire un test SSP in cui i *primers* usati amplifichino selettivamente alleli DRB1*15 o DRB1*16. Vi sono altri casi di tipizzazioni ambigue, nei quali, però, non viene fatta (come negli esempi illustrati sopra) l'assegnazione di un allele in base al *linkage disequilibrium*. Si tratta in genere di risultati compatibili con la presenza di più di due gruppi di alleli, i quali possono essere tutti subtipici ad un solo allele principale oppure subtipici ad alleli diversi. Per esempio, un medesimo risultato di tipizzazione a bassa risoluzione può significare la presenza di uno o l'altro degli alleli elencati nella tabella III. In alcuni laboratori si tende ad assegnare il gruppo di alleli più frequente.

Questo indirizzo non sembra corretto. È più corretto procedere in uno dei due modi seguenti:

- se non è necessaria una tipizzazione molto dettagliata, è però necessario almeno distinguere se sia presente l'uno o l'altro di due alleli supertipici: nel caso del primo della tabella III si tratta di chiarire se è presente DRB1*11 oppure DRB1*08; questo obiettivo può essere raggiunto con ulteriore analisi mediante SSP;
- se è necessaria una tipizzazione molto dettagliata, allora bisogna procedere ad una tipizzazione ad alta risoluzione ed eventualmente ad una ulteriore analisi mediante sequenziamento.

Analisi dettagliata del kit HLA DRB29

I miglioramenti introdotti nel kit HLA DRB29 (Tabella

VI), rispetto al kit HLA DRB20, riguardano l'introduzione di una sonda specifica per l'allele DRB1*03 (sonda 10-YOY) e di altre 3 sonde: 11-FEY, 12-F e 13-N. Queste si sono rivelate particolarmente utili nell'identificazione degli alleli del gruppo sierologico DR52. Permangono, comunque, anche nel kit HLA DRB29 alcune ambiguità, le quali dipendono da:

- alleli poco caratterizzati che non hanno una sonda specifica (DRB1*03012);
- sonde condivise da più alleli;
- sonde positive oltre che per alleli DRB1* anche per alleli DRB3*.

Nella tabella VII sono analizzate 112 delle 134 tipizzazioni ambigue ottenute (come menzionato in precedenza) con il kit HLA DRB29. Non sono state indicate tutte le 134 tipizzazioni ambigue, in quanto solo sui 112 casi indicati sono stati effettuati dei test SSP successivi. Riguardo ai 22 casi non esaminati, sono intervenuti problemi tecnici che non hanno reso possibile l'esecuzione di SSP.

Nel primo gruppo (59 casi) l'ambiguità riguarda alleli del gruppo sierologico DR52. In questo gruppo si osservano le 5 situazioni illustrate appresso:

- in 42/59 casi alleli molto frequenti del gruppo DRB1*11 hanno comportamento delle sonde uguale a quello presentato dagli alleli DRB1*1307, 1311, 1314 e 1324. Queste tipizzazioni, benché così frequenti, sono difficili da eseguire e interpretare correttamente, soprattutto se si tipizza un individuo singolo e non un intero nucleo familiare; nel nostro caso, una tipizzazione SSP ha permesso di chiarire che in tutti i casi non era presente

Tabella V: confronto kit HLA DRB20 e 29

	N° sonda	Aminoacidi	Posizione		N° sonda	Aminoacidi	Posizione
DRB20	Control	TELGRPQ	51-56	DB29	Control	TELGRPQ	51-56
DRB20	1	WLF	9-13	DB29	1	WLF	9-13
DRB20	2	WRP	9-13	DB29	2	WRP	9-13
DRB20	3	YSTS	10-13	DB29	3	YSTS	10-13
DRB20	4	V-H	11-13	DB29	4	V-H	11-13
DRB20	5	G-YK	11-15	DB29	5	G-YK	11-15
DRB20	6	YSTG	11-13	DB29	6	YSTG	11-13
DRB20	7	K-DF	9-13	DB29	7	K-DF	9-13
DRB20	8	EV	9-12	DB29	8	EV	9-12
DRB20	9	E	58	DB29	9	FEH	26
DRB20	10	AH	57-60	DB29	10	YDY	26
DRB20	11	S	57	DB29	11	FEY	26
DRB20	12	KGR	71-74	DB29	12	F	37
DRB20	13	IDE	67-71	DB29	13	N	37
DRB20	14	LL	37-38	DB29	14	E	58
DRB20	15	L	74	DB29	15	AH	57-60
DRB20	16	LRS	11-17	DB29	16	S	57
DRB20	17	LLS	11-17	DB29	17	KGR	71-74
DRB20	18	ANYL	38-44	DB29	18	IDE	67-71
DRB20	19	QDY	10-17	DB29	19	QRR	70
DRB20	20	DL	37-38	DB29	20	K	70
				DB29	21	LL	37-38
				DB29	22	L	74
				DB29	23	AV	86
				DB29	24	LR-S	10
				DB29	25	LL-S	11-17
				DB29	26	ANYL	38-44
				DB29	27	QDY	10-17
				DB29	28	D	30

Nella tabella le sonde vengono identificate dal numero progressivo e dalla composizione degli aminoacidi con l'indicazione della posizione del legame (secondo quanto indicato dalla ditta fornitrice). Sono evidenziate in grassetto le sonde di nuova introduzione (HLA DRB29). Le sonde sembrano essere le stesse, pur cambiando la numerazione

DRB1*13, ma solo DRB1*11;

- 2- l'allele DRB1*03012 è uno degli alleli DRB1*03 con la caratteristica di non reagire con la sonda 17, specifica per molti alleli DRB*03; pertanto, questo allele non può essere escluso in presenza di alleli DRB1*13 (2/59); la successiva tipizzazione SSP ha rivelato che in ambedue i casi non era presente DRB1*03012 ma solo DRB1*13;
- 3- il *pattern* di reazione delle sonde non permette di distinguere se si tratta di una tipizzazione 13/14 oppure 14/14 (6/59); la tipizzazione SSP ha permesso di assegnare a 2 campioni gli alleli DRB1*13 e DRB1*14, mentre 4 campioni risultavano solo DRB1*14;
- 4- in presenza di questo *pattern* (7/59) non si può distinguere una tipizzazione DRB1*03/03 da una tipizzazione DRB1*03/13; in effetti, con SSP, tutti i 7 campioni sono risultati DRB1*03 e sprovvisti di DRB1*13;
- 5- questo *pattern* (2/59) è compatibile con 3 diverse tipizzazioni: DRB1*13/13, DRB1*03012/13 e DRB1*13/14; dopo SSP, i due campioni sono risultati positivi solo per DRB1*13.

Un secondo gruppo di difficoltà (36 casi) comprende problemi di tipizzazione per gli alleli DRB1*11, poiché alcuni di essi condividono con altri alleli porzioni di sequenza che

sono individuate dalle sonde usate. In 9/36 campioni la reazione positiva delle 8 sonde elencate non permette di distinguere fra una tipizzazione 03/11 ed una tipizzazione 1107/13. In questi casi, nel nostro laboratorio, si accerta la presenza di DRB1*03 mediante SSP: se questa è confermata, la tipizzazione definitiva risulta 03/11. In altri casi di questo gruppo (7/36+5/36+7/36), la positività delle sonde elencate in tabella (che sono in buona parte le medesime del gruppo considerato in precedenza) non permette di distinguere se è presente, insieme ad un allele DRB*11, un secondo allele 11 oppure un 13, un 14 o uno 03. Anche in questo caso, l'ambiguità si può chiarire mediante un SSP che accerti la presenza di uno di questi tre ultimi alleli. Ancora, in 6 casi la reazione positiva delle 7 sonde riportate indica che è presente un allele DRB1*12 insieme ad un allele DRB1*11; ma se si tratta dell'allele 1204, allora si conclude che è compresente non un DRB*11 ma DRB1*1307. Il nostro modo di procedere è di accertare o escludere, mediante SSP, la presenza di DRB1*11, DRB1*12 o DRB1*13. Se è positivo DRB1*13, è opportuno confermare successivamente la presenza di DRB1*1204, allele piuttosto raro. Negli ultimi 2/36 campioni, che hanno reagito con sonde in buona parte uguali a quelle del gruppo precedente,

Tabella VI: sonde 11, 12 e 13 con gli alleli riconosciuti

Numero	Nome	Posizione	Alleli
11	FEY	26	03021,0303,03022 1315 1319 1402,1403,1406 1412,1413 1418,1424 1419 1420 B3 0301,0205
12	F	37	1110,1112,1113,1117 1308 1319 1401,1407,1408,1422 1404 1405,1414-1416,1423 1410 1411 1420 0701 0808,1415 B3 0301
13	N	37	03011,0305,0308 03012,03021, 03022,0303-0307 1109 1116,1120 1301,1302,1305,1306,1309,1310,1316 1315,1318 1402,1406 1403,1412 1409,1417 1413 1418,1424 1419 1421

non è stato possibile distinguere fra la compresenza di due diversi alleli DRB1*11 (indicati in tabella) oppure di certi alleli DRB1*11 con alleli DRB1*08. In questo caso, si è proceduto cercando di confermare la presenza di DRB*08 mediante SSP.

Il terzo gruppo (10/112 casi) riguarda alleli DRB1*04 che condividono delle sonde con alleli DRB1*11 e DRB1*14. In questo caso, si è ricercata la presenza o meno di DRB1*11 o 13 o 14.

Nel quarto gruppo (7/112), sono considerati alleli DRB1*01 in associazione con DRB1*13 e 14. Il procedimento a nostro giudizio più semplice è ricercare l'allele DRB1*0103. Nel test SSP della ditta Oxoid, l'allele DRB1*0103 viene tipizzato usando una miscela di *primers* che riconosce esattamente l'allele, mentre gli alleli DRB1*13 e 14 sono riconosciuti da un numero maggiore di miscele. Pertanto, risulta di più semplice esecuzione la ricerca diretta dell'allele DRB1*0103.

Da quanto esposto, si deduce che non sempre è possibile con un'unica tipizzazione SSO attribuire due gruppi di alleli corrispondenti a due antigeni. Per risolvere

queste difficoltà, si può procedere, come raccomandato sopra, caso per caso, utilizzando adeguatamente il metodo SSP, se non si ha necessità di giungere ad una tipizzazione di alta risoluzione. Generalmente, questo è il caso di tipizzazioni cliniche per pazienti in attesa di un trapianto d'organo o per donatori di midollo al loro ingresso nel registro di donatori volontari. Se, invece, si intende eseguire una tipizzazione molto dettagliata si può ricorrere a un'amplificazione specifica e ibridare con numerose sonde, come suggerito al termine del XII Workshop^{11,16,17}. Sono particolarmente difficili da tipizzare quei campioni in cui sono presenti solo alleli appartenenti ad uno dei seguenti gruppi: 11, 13, 14. Nella nostra esperienza, la tipizzazione in alta risoluzione è in grado di discriminare l'appartenenza di alleli a gruppi diversi. Essa, invece, non è talvolta capace di distinguere fra alleli di uno stesso gruppo. Nella tabella VIII sono presentati degli esempi in cui la tipizzazione in alta risoluzione eseguita adoperando kit SSP della Oxoid-Dynal non riusciva a discriminare tra diversi possibili alleli, mentre il sequenziamento permetteva di assegnare la presenza di uno solo tra quelli possibili. Viceversa, in certi casi, una

Tabella VII: tipizzazioni non risolte della nostra casistica

Gruppi	N° casi totali	n° casi	HLADRB 29 <i>patterns</i> di ibridazione	Assegnazione antigeni HLA DRB	SSP
I	59	42	3,9,14,25	11/11	42
				11/13	
		2	3,9,10,13,18,24,25	13/13	2
				03012/13	
		6	3,9,11,12,13,15,18,25	13/14	2
				14/14	4
		7	3,9,10,13,17,24,25	03/03	7
				03/13	
		2	3,10,11,12,13,18,24,25	13/13	2
				03012/13	
II	36	9	3,9,10,13,14,17,24,25	13/14	
				03/11	9
		7	3,9,11,12,13,14,18,25	1107/13	
				11/11	
				11/13	7
				11/14	
		5	3,9,13,14,18,25	11/11	
				11/13	5
		7	3,9,10,13,14,18,24,25	11/11	
				11/13	7
III	10	6	3,6,9,14,21,23,25	03012/11	
				11/12	6
				1106/12	
		2	3,6,9,14,22,25	1204/1307	
				11/08	
				1105/1123-1125	
				1123,1125/08	
		4	3,4,9,14,25,26	04/11	4
				0415,1122/13	
		4	3,4,11,12,13,18,20,25,26	04/13	4
IV	7	2	3,4,9,14,18,25,26	04/14	
				04/11	2
		7	1,3,9,13,18,19,25	04/13	
				01/13	7
			0103/14		

I casi ai quali non era possibile assegnare una tipizzazione univoca sono stati suddivisi in gruppi ed è stato riportato il risultato ottenuto seguendo le indicazioni del programma di interpretazione. Nella colonna che riporta i *patterns* di ibridazione le sonde sono indicate con i medesimi numeri elencati nella tabella V. Nella colonna SSP sono indicati i casi in cui è stato eseguito un test di conferma SSP.

medesima sequenza appartiene ad alleli differenti. In questi casi, il test in alta risoluzione permette di individuare l'allele corretto. Nella tabella IX è riportato dettagliatamente il caso a cui ci si riferisce. Un altro modo per ottenere un risultato definitivo, è eseguire un'analisi che permetta di distinguere il DNA dei due cromosomi in modo da poter esaminare ciascun allele¹⁸.

Commento generale sul test SSP

Come si è visto, in molti dei casi mostrati nella tabella VII, nel nostro laboratorio è stato eseguito un test SSP-HLA DRB1* di bassa risoluzione, a scopo di conferma. Il sistema SSP è un sistema molto analitico che permette una

risoluzione maggiore rispetto a quella consentita dal metodo SSOP. Nell'esecuzione di questo tipo di test, è bene affiancare alle miscele specifiche dei *primers* anche un marcatore di peso molecolare a concentrazione nota, per controllo. Si assegna la presenza della banda specifica se questa ha una intensità paragonabile a quella del marcatore. Come già commentato in precedenza nel paragrafo "Amplificazione", nell'analisi delle reazioni di amplificazione, che si esegue sulla fotografia degli amplificati sottoposti a migrazione elettroforetica in un gel di agarosio, bisogna controllare che sia visibile la banda di controllo, a garanzia che le condizioni sono tali da ottenere una sufficiente amplificazione. Per risolvere le ambiguità osservate, può non essere necessario ripetere completamente il test adoperando tutte e 24 le miscele di *primers*, ma se ne

Tabella VIII: confronto fra SSP alta risoluzione e sequenziamento

Campione	Alleli indistinguibili dopo l'esecuzione di un test SSP della Oxoid-Dynal	Alleli evidenziati mediante sequenziamento
18507	DRB1*0403/0427	DRB1*0403
18560	DRB1*1501/1507 DRB5*0101/0109	DRB1*1501 DRB5*0101
18602	DRB1*1502/1508	DRB1*1502
18355	DRB1*1501,1502/1501,1508 DRB1*1502,1507/1507,1508	DRB1*1501,1502
18357	DRB1*0401/0426	DRB1*0401
19038	DRB1*1401,0301/1401,0310	DRB1*1401,0301

Nella tabella sono indicati degli esempi di attribuzioni ottenute eseguendo un SSP test ed il sequenziamento in cui quest'ultimo permette di assegnare una tipizzazione univoca

Tabella IX: confronto fra SSP alta risoluzione e sequenziamento

Possibili interpretazioni alternative di una tipizzazione DRB1* eseguita mediante sequenziamento	Risoluzione delle stesse ambiguità ottenute mediante tipizzazione ad alta risoluzione
03011/11011	03011/11011
03011/1105	Viene esclusa
0305/11041	Viene esclusa
0308/1324	Viene esclusa

Nella tabella sono indicati degli esempi di attribuzioni ottenuti eseguendo un SSP test e il sequenziamento in cui il testo SSP permette di assegnare una tipizzazione univoca.

possono scegliere opportunamente solo alcune. A questo scopo, la stessa ditta Oxoid ha introdotto sul mercato un kit supplementare in cui sono contenuti *primers* per alleli DRB1*03,11,13 ed alcuni 14, proprio per venire incontro a questa esigenza.

Casi in cui è indispensabile eseguire un altro test in quanto non si può tralasciare di indagare l'ambiguità osservata

Nei commenti esposti sopra, relativi alle tipizzazioni elencate nella tabella VII, sono state illustrate, volta per volta, le strategie che nella nostra esperienza è consigliabile adottare per risolvere le ambiguità incontrate nella tipizzazione. A nostro parere, non si possono ignorare almeno le più frequenti ambiguità riscontrate nella nostra casistica, cioè i 42 casi del I gruppo della tabella VII relative alla presenza di alleli DRB1*11, molto diffusi nella popolazione italiana¹⁹⁻²¹. Un diverso metodo di tipizzazione (SSP) può rappresentare una sufficiente garanzia nei confronti di eventuali errori. Infine, nel caso si ottenessero risultati discrepanti adoperando due metodi diversi, è consigliabile ricominciare il lavoro effettuando una nuova estrazione di DNA dalle cellule del campione da controllare.

Casi in cui sembra accettabile non effettuare test di conferma

Nei casi in cui sia nota la popolazione da cui provengono

i campioni esaminati, in pratica la strategia di tipizzazione può non tenere conto dell'eventuale presenza di alleli non presenti in quella popolazione. Ad esempio, gli alleli DRB1*03021, 03022-03 non sono rappresentati nella popolazione italiana²¹. Analogamente, sembra possibile ignorare la presenza degli alleli DRB1*1105,1106 e 1202 osservati negli Orientali²². Nei casi indicati, appare ragionevole decidere di trascurare l'accertamento o l'esclusione di questi alleli: è opportuno, peraltro, memorizzare nell'archivio delle tipizzazioni quali alleli non sono stati controllati.

Casi in cui utilizzando il kit è possibile la tipizzazione di alleli subtipici

Il kit Amplicor DRB29 rende possibile, in alcuni casi, eseguire la tipizzazione di alleli subtipici, che di solito sono identificabili solo mediante una tipizzazione ad alta risoluzione. Nella nostra pratica, è capitato di tipizzare con certezza gli alleli DRB1*01021 e DRB1*1404. Ci è anche stato possibile individuare l'allele 0418, che successivamente è stato confermato mediante sequenza.

Conclusioni

Dall'analisi dell'esperienza fatta nel nostro laboratorio, e dall'esame dell'esperienza fatta in altri laboratori e riportata nella bibliografia, risulta che una corretta tipizzazione HLA

attraverso l'analisi del DNA ha due principali aspetti da prendere in considerazione. Il primo aspetto è quello della preparazione del materiale da esaminare e nell'esecuzione tecnica delle reazioni. Le diverse operazioni devono essere eseguite con notevole accuratezza e con adeguati controlli. L'estrazione del DNA, l'amplificazione, la deposizione dell'amplificato sulle membrane di reazione, l'ibridazione e la relativa rivelazione, la lettura dell'avvenuta reazione costituiscono passaggi delicati: un'esecuzione non ottimale di uno di essi può compromettere definitivamente il risultato della tipizzazione. Il secondo aspetto consiste nell'analisi dei risultati e nelle decisioni sulle strategie da adottare per ottenere risultati soddisfacenti. La prima decisione riguarda il livello di risoluzione che si vuole ottenere, il quale varia a seconda di quale è lo scopo della tipizzazione. Definito questo, si attua anche la scelta del metodo di laboratorio da usare. Si tratta, quindi, di scegliere il sistema di sonde (in pratica il kit) che sembra più idoneo; è di rilievo, a questo proposito, tenere conto della continua individuazione di nuovi alleli HLA, che rende necessario un aggiornamento frequente sia del materiale da usare per la tipizzazione sia degli schemi interpretativi delle reazioni osservate. Una volta raggiunte le interpretazioni fornite dalle positività di gruppi di sonde, è necessario individuare le strategie da adottare nei casi in cui si presentino ambiguità, cioè quando le reazioni osservate sono spiegabili con alcune tipizzazioni alternative.

Le strategie possono cambiare a seconda della popolazione alla quale appartiene il campione in esame e del livello di definizione che si vuole ottenere. Infatti, se un'ambiguità riguarda la possibile presenza di un allele che non è mai stato rilevato nella popolazione alla quale appartiene il campione in esame, può, in certi casi, essere giustificato assumere che l'allele in questione non sia presente. Se l'ambiguità riguarda più tipizzazioni alternative, ciascuna possibile nella popolazione che si sta esaminando, allora si tratta di decidere qual è il modo più razionale per individuare la tipizzazione esatta. E, si ripete, tutte queste operazioni devono essere attuate avendo presenti le più recenti definizioni degli alleli HLA.

Riassunto

Le tecniche di analisi del DNA per la tipizzazione degli alleli di Classe II presentano numerosi vantaggi rispetto a quelle sierologiche; perciò, in molti laboratori le hanno sostituite completamente. Anche nel nostro laboratorio, dal 1996, è stata abbandonata la tipizzazione sierologica in favore di quella molecolare. In questo studio, sono esaminati gli aspetti tecnici della tipizzazione molecolare

della Classe II ai livelli di risoluzione basso e intermedio, ed è stato valutato il potere di risoluzione delle tecniche usate valutando la diversa percentuale di risultati univoci rispetto a quelli ambigui e commentandoli. Le tecniche descritte sono: SSOP diretta, SSOP inversa, SSP. La maggioranza dei reagenti utilizzati proviene da ditte del commercio (Roche, Oxoid-Dynal), mentre alcuni sono stati prodotti localmente.

Le tecniche esaminate comprendono numerosi passaggi, tutti importanti nel determinare la buona riuscita del risultato finale.

Abbiamo descritto nel dettaglio i passaggi a nostro parere critici; sono stati esaminati aspetti relativi a: estrazione del DNA, amplificazione, deposizione degli amplificati sulle membrane, ibridazione, rivelazione colorimetrica, attribuzione di score positivi, interpretazione dei risultati. Abbiamo analizzato i risultati ottenuti con due diversi kit: Amplicor DRB20 e 29 (HLA DRB20 e 29), per ciascuno dei quali vengono presentate le sonde utilizzate e gli alleli riconosciuti. 894 campioni sono stati tipizzati utilizzando il kit HLA DRB20 e 120 di questi presentavano risultati ambigui; 702 campioni sono stati tipizzati con il kit HLA DRB29 e 134 davano risultati ambigui.

L'ambiguità consiste nel fatto che vengono considerati come ugualmente possibili più di due gruppi di alleli appartenenti a diversi antigeni sierologici. L'operatore non può arbitrariamente considerare corretta una attribuzione piuttosto che un'altra, anche se in molti laboratori è prassi comune ritenere valida la tipizzazione che comprende gli alleli maggiormente frequenti nella popolazione studiata.

In questo studio, vengono presentate le diverse soluzioni che sono state adottate di volta in volta per risolvere le ambiguità incontrate. Generalmente, è stato impiegato un test SSP.

Un altro importante aspetto che è stato preso in esame e dettagliatamente commentato, riguarda la necessità che la tipizzazione tenga conto delle più recenti acquisizioni sulle sequenze degli alleli studiati.

Bibliografia

- 1) Bidwell JL, Bidwell EA, Savage DA et al.: A DNA-RFLP typing system that positively identifies serologically well-defined and ill-defined HLA-DR and DQ alleles, including DRw10. *Transplantation*, **45**, 640, 1988.
- 2) Saiki RK, Scharf S, Faloona F et al.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**, 1350, 1985.
- 3) Bunce M, Young NT and Welsh KI: Molecular HLA typing - the brave new world. *Transplantation* **64**, 1505, 1997.

Analisi del DNA per la tipizzazione HLADRB

- 4) Bodmer JG, Marsh SGE, Albert E et al.: *Nomenclature for factors of HLA system*. Tissue Antigens, **39**, 161, 1991.
- 5) Marsh SGE, Bodmer JG: *HLA class II region nucleotide sequences, 1995*. Tissue Antigens, **45**, 258, 1995.
- 6) Petersdorf EW, Longton GM, Anasetti C et al.: *The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A,B,DR identical unrelated donor marrow transplantation*. Blood, **87**, 1606, 1995.
- 7) Bodmer JG, Marsh SGE, Albert E et al.: *Nomenclature for factors of HLA system*. Tissue Antigens, **49**, 297, 1997.
- 8) Bodmer JG, Marsh SGE, Albert E et al.: *Nomenclature for factors of HLA system 1998*. Tissue Antigens, **53**, 407, 1999.
- 9) Sito web: www.anthonynolan.com
- 10) Naruse TK, Ando R, Nose Y et al.: *HLA-DRB4 genotyping by PCR-RFLP. Diversity in the association between HLA-DRB4 and DRB1 alleles*. Tissue Antigens, **49**, 152, 1997.
- 11) Shaffer AL, Falk-Wade JA, Tortorelli A et al.: *HLA-DRw 52 associated DRB1 alleles: identification using polymerase chain reaction-amplified DNA, sequence-specific oligonucleotide probes, and a chemiluminescent detection system*. Tissue Antigens, **39**, 84, 1992.
- 12) Erlich H, Bugawan T, Begovich AB et al.: *HLA-DR,DQ and DP typing using PCR amplification and immobilized probes*. Eur J Immunogenet, **18**: 33, 1991.
- 13) Olerup O, Zetterquist H: *HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation*. Tissue Antigens, **39**, 225, 1992.
- 14) Ferencik S, Grosse-Wilde H: *A simple photometric detection method for HLA-DRB1 specific PCR-SSP products*. Eur J Immunogenet, **20**, 123, 1993.
- 15) Wood WI, Gitschier J, Lasky LA, Lawn RM: *Base composition independent hybridization in tetramethylammonium chloride: a method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries*. PNAS, USA, **82**, 1585, 1985.
- 16) Fernandez-Viña MA, Shumway W, Stastny P: *DNA typing for class II HLA antigens with allele-specific or group-specific amplification II Typing for alleles of DRw52-associated group*. Hum Immunol, **28**, 51, 1990.
- 17) Fernandez-Viña MA, Bignon JD: *Primers and oligonucleotides probes (SSOP) used for DNA typing of HLA Class II alleles*. In: Charron D (Ed), Genetic Diversity of HLA Functional and Medical Implication, vol. I, pag. 596, Medical and Scientific International Publisher, Sèvres, France, 1997.
- 18) Arguello R, Avakian H, Goldman JM et al.: *A novel method for simultaneous high resolution identification of HLA-A, HLA-B and HLA-Cw alleles*. Proc Natl Acad Sci USA, **93**, 10961, 1996.
- 19) Fasano ME, Praticò L, Brancatello F et al.: *Caucasian Italian Normal*. In: Gjertson DW, Terasaki P (Eds), HLA 1998, pag.162, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Lenexa, KS, USA, 1998.
- 20) Ferrara GB, Delfino L, Longo A et al.: *Caucasian Italian Normal*. In: Gjertson DW, Terasaki P (Eds), HLA 1998, pag.166, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Lenexa, KS, USA, 1998.
- 21) Testi M, Mariani M: *Caucasian Italian Normal*. In: Gjertson DW, Terasaki P (Eds), HLA 1998, pag.165, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics, Lenexa, KS, USA, 1998.
- 22) Mazzilli MC, Mora B, Battal S et al.: *AHS14: DR5(11,12) DR52*. In: Charron D (Ed) Genetic Diversity of HLA. Functional and Medical Implication, vol I, pag. 596, Medical and Scientific International Publisher, Sèvres, France, 1997.