

Результаты экспертной оценки качества цитогенетических исследований в Системе межлабораторных сличительных испытаний «ФСВОК» в 2017 г.

Антоненко В.Г.¹, Шилова Н.В.¹, Лукаш Е.Н.², Бабкеева Э.Р.³, Малахов В.Н.³

¹ — ФГБНУ «Медико-генетический научный центр» РАМН, 115478, Москва, ул. Москворечье, 1

² — ГБУЗ «Научно-практический центр медицинской помощи детям им. В.Ф. Войно-Ясенецкого» ДЗ г. Москвы, 119620, Москва, ул. Авиаторов, д. 38

³ — АСНП «Центр внешнего контроля качества клинических лабораторных исследований», 129090, Москва, пл. Малая Сухаревская, д. 3, стр. 2

В работе представлены результаты экспертной оценки качества приготовления цитогенетических препаратов и хромосомного анализа в лабораториях РФ по разделам «Определение кариотипа (препараты лимфоцитов лаборатории)» и «Определение кариотипа (цифровые фотографии препаратов лимфоцитов)» в Системе межлабораторных сличительных испытаний «ФСВОК» в 2017 г. Приведен анализ наиболее частых причин неудовлетворительных результатов экспертизы.

Ключевые слова: внешний контроль качества, цитогенетические исследования.

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

Results of quality assessment for cytogenetic investigations in the system of interlaboratory comparative examinations «FSEQA» in 2017

Antonenko V.G.¹, Shilova N.V.¹, Lukash E.N.², Babkeeva E.R.³, Malakhov V.N.³

¹ — Federal State Budgetary Institution «Research Center for Medical Genetics», Moscow

² — State Budgetary Institution of Health care «Research and Practical Center of Medical Care for Children V.F. named after V.F. Voyno-Yasenetsky» of the Department of Health of Moscow, Moscow

³ — Association of Specialists Non-profit Partnership «Center for External Quality Control of Clinical Laboratory Studies», Moscow

We report on results of quality for preparation of cytogenetic slides and chromosomal analysis in the laboratories of RF in the system of the interlaboratory comparative examinations «FSEQA» in 2017. Common causes of poor results of the are discussed.

Keywords: external quality assurance, cytogenetic investigations.

Введение

Цитогенетические исследования прочно вошли в практику медико-генетического консультирования РФ и, несмотря на активное внедрение молекулярно-генетических технологий, по-прежнему занимают ведущее место в диагностике хромосомных заболеваний. Результат цитогенетического исследования и его правильная интерпретация могут, как и результаты других генетических тестов, оказать существенное влияние не только на ведение пациента, но и на принятие семей жизненно важных решений. Поэтому значение качественного выполнения цитогенетического исследования трудно переоценить. Для того, чтобы результат исследования мог адекватно использоваться в медико-генетическом консультировании, необходимо соблюдение трех условий: правильное визуальное определение хромосомной перестройки (или ее отсутствия), правильная запись формулы кариоти-

па (в соответствии с действующей версией Международной системы цитогеномной номенклатуры (An International System for Human Cytogenomic Nomenclature — ISCN 2016)) [1], правильная формулировка заключения — словесного объяснения характера выявленной перестройки и ее клинического значения. Несоблюдение любого из этих условий делает проведение цитогенетического исследования бессмысленным, а результат его — вводящим врача-консультанта в заблуждение. Одним из механизмов контроля и повышения качества цитогенетических исследований является система внешней оценки качества (ВОК), которую в нашей стране с 2004 г. осуществляет Система межлабораторных сличительных испытаний «ФСВОК». В данной работе мы представляем результаты экспертной оценки качества приготовления цитогенетических препаратов и хромосомного анализа в лабораториях РФ в 2017 г.

Материалы и методы

В 2017 г. экспертная оценка проводилась по двум разделам: «Определение кариотипа (препараты лимфоцитов лаборатории)» (Раздел 1) и «Определение кариотипа (цифровые фотографии препаратов лимфоцитов)» (Раздел 2). По Разделу 1 лаборатории представили для экспертизы по 3 GTG-окрашенных цитогенетических препарата, приготовленных в лаборатории, и результат исследования этих препаратов в виде формулы кариотипа и заключения. Эксперты оценивали качество приготовления препаратов по следующим позициям: количество метафазных пластинок, разброс хромосом, качество окраски, а также правильность результата исследования (формулы кариотипа) и формулировки заключения. По Разделу 2 лаборатории проводили анализ кариотипа двух пациентов по предоставленным фотоизображениям 11 метафазных пластинок для каждого случая. В этом разделе проводилась экспертиза только правильности результата исследования (правильный, неполный/неточный, неправильный) и формулировки заключения (правильная, неполная/неточная, неправильная).

Результаты и обсуждение

Для обеспечения качества цитогенетических исследований существуют правила их проведения, отраженные, например, в рекомендациях Европейской Цитогенетической Ассоциации (European Cytogenetics Association) [2, 3] и методических рекомендациях, используемых при специализации врачей-лабораторных генетиков (цитогенетиков). Так, для заключения о кариотипе пациента необходимо исследование достаточного количества метафазных пластинок с качеством окрашивания не ниже 400—550 сегментов (в зависимости от показаний для исследования). Формула кариотипа должна быть записана в соответствии с действующей версией ISCN. Заключение тоже составляют по определенным правилам: в нем должно быть отражено, является ли кариотип нормальным или аномальным; если выявлена аномалия, является ли она сбалансированной или нет; если выявлена несбалансированная перестройка, необходимо указать характер дисбаланса и клинические проявления, с которыми может быть связан данный дисбаланс. Исходя из данных рекомендаций, мы проводили экспертную оценку результатов исследований, полученных в лабораториях.

В 2017 г. в Разделе 1 участвовало 16 лабораторий, для экспертизы было прислано 47 препаратов (по 3 от каждой лаборатории, одна лаборатория прислала 2 препарата). Раздел «Определение кариотипа (препараты лимфоцитов лаборатории)» имеет определенные ограничения для лабораторий, так как экспертиза правильности диагноза проводится экспертами по единственному стеклу и должна быть охарактеризована без дополнительных исследований. При этом ключевую роль в оценке играет качество окрашивания препарата.

Распределение количества лабораторий в зависимости от качества приготовления препаратов и качества анализа кариотипа представлено в табл. 1 и 2.

Таблица 1

Распределение лабораторий в зависимости от качества приготовления препаратов

Качество препаратов	Количество лабораторий по позициям		
	Количество митотических пластинок	Разброс хромосом	Качество окраски
Хорошее 3 препаратов	7	9	3
Хорошее/удовлетворительное 3 препаратов	5	5	8
Плохое 1 препарата	3	2	2
Плохое 2 препаратов	1	—	2
Плохое 3 препаратов	—	—	1
Всего лабораторий	16	16	16

Таблица 2

Распределение лабораторий в зависимости от качества анализа препаратов

Качество анализа	Количество лабораторий
Правильный диагноз и заключение по 3 препаратам	8
Неправильный диагноз, или заключение по 1 препарату, или 1 препарат непригоден для исследования	3
Неправильный/неточный диагноз, или заключение по 2 препаратам, или 2 препарата непригодны для исследования	4
Неправильный/неточный диагноз, или заключение по 3 препаратам, или 3 препарата непригодны для исследования	1
Всего лабораторий	16

Основной причиной неудовлетворительных результатов экспертизы препаратов было низкое качество окрашивания. Так, недостаточное количество метафазных пластинок отмечено только в 10%, в то время как плохое качество GTG-окраски или ее отсутствие — почти в четверти препаратов. В некоторых случаях плохая окраска сочеталась с недостаточным количеством митотических пластинок или излишней спирализацией хромосом, но в других случаях создавалось впечатление, что простое увеличение экспозиции трипсина могло бы помочь получить окраску высокого качества. Второй по значимости причиной неудовлетворительных результатов экспертизы следует признать невнимательность и небрежность при отборе препаратов, записи формулы кариотипа и написании заключения. В нескольких случаях для экспертной оценки были присланы предметные стекла, на которых вообще не было метафазных пластинок, или отмечалось несоответствие пола пациента по направлению и препарату. Такие нарушения не связаны с недостаточной квалификацией специалиста, но на практике подобная невнимательность может привести к ошибочным результатам. Только в половине лабораторий, участвовавших в разделе, диагнозы и заключения были правильными по всем трем препаратам.

Рассмотрим примеры неудовлетворительных результатов.

В одном случае диагноз был расценен как ошибочный из-за неправильного написания формулы кариотипа при транслокационной форме с. Дауна:

Пациент: мальчик 12 суток. Диагноз: с. Дауна. Кариотип: 46,XY,t(14;21)(q12;q12) Заключение: В кариотипе три копии хромосомы 21. Транслокационный вариант с. Дауна. Консультация генетика. Формула соответствует сбалансированной транслокации между хромосомами 14 и 21. Невнимательность? Между тем, вероятно, данный результат был выдан пациенту.

В нескольких случаях были отмечены ошибки в заключениях:

Пациент: девушка 15 лет. Диагноз: аменорея I. Кариотип: 46,XY,9ph,21pps+. Заключение: Несоответствие по-

ла. Кариотип соответствует мужскому. Полиморфизм хромосомы 9, локализация гетерохроматинового сегмента в коротком плече.

Вряд ли пациентке с инверсией пола стоило указывать в формуле кариотипа варианты расположения гетерохроматина и спутничных нитей, но если уж они указаны, в заключении должно быть расшифровано значение всех отмеченных вариантов.

Пациент: женщина 26 лет. Диагноз: привычное невынашивание беременности. Кариотип: 46,XY,inv(9)(p11q13). Заключение: Перичентрическая инверсия в 9 хромосоме, при которой точками разрыва и воссоединения являются 9p11 и 9q13.

В заключении отсутствует наиболее важная информация — является ли кариотип нормальным или аномальным, таким образом, решение этого вопроса перекладывается на врача-консультанта.

Пациент: мужчина 32 лет. Показания для исследования: Планирование беременности в семье. Кариотип: 46,XY,inv(1)(p22;q32)17ps. Заключение: Перичентрическая инверсия хромосомы 1. Спутники на коротком плече хромосомы 17 (полиморфизм).

Формула кариотипа записана не вполне корректно — точки разрывов в данном случае не следует разделять, так как они относятся к одной хромосоме, а «17ps», наоборот, следует отделить знаком «,» этот феномен лучше описывать как fra(17)(p12). Заключение может быть истолковано неправильно: не указано, что выявлена хромосомная аномалия — перичентрическая инверсия хромосомы 1. Указание «полиморфизм» в конце заключения может быть отнесено ко всей формуле. Заключение было расценено как неправильное.

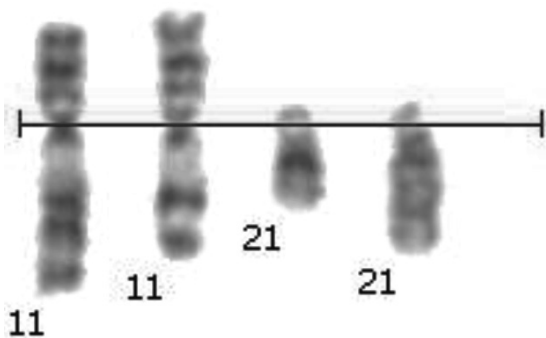
В целом, наиболее частым недостатком заключений было отсутствие указаний, является ли кариотип нормальным или аномальным и является ли перестройка сбалансированной или нет. Иногда заключение было слишком лаконичным или слишком распространенным и в нем терялся смысл выявленной перестройки.

В Разделе 2 участвовало 47 лабораторий. Для анализа были представлены изображения метафазных пластинок двух пациентов.

Таблица 3

Распределение результатов экспертизы анализа фотоизображений метафазных пластинок

Формула кариотипа	Пациент 1	Пациент 2
Правильная	45	30
Неполная/неточная	2	2
Неправильная	—	15
Формулировка заключения		
Правильная	46	28
Неполная/неточная	—	3
Неправильная	1	16
Всего лабораторий	47	47



Изображения хромосом 11 и 21 Пациента 2.

Пациент 1: Женщина 30 лет

Диагноз: 2 замершие беременности

Кариотип: 46,XX,t(4;21)(q27;q21)

Заключение: Хромосомная аномалия — сбалансированная транслокация между хромосомами 4 и 21

Пациент 2: Мужчина 33 лет

Диагноз: Хромосомная аномалия у ребенка

Кариотип: 46,XY,ins(21;11)(q22.1;q22.2q14.1)

Заключение: Хромосомная аномалия — инсерция части длинного плеча хромосомы 11 в длинное плечо хромосомы 21 (рисунок)

Определение кариотипа по изображениям метафазных пластинок также имеет ограничения, связанные с определенным количеством метафазных пластинок и зависимостью качества изображений от возможностей программы, используемой для их анализа.

Распределение результатов экспертизы анализа фотоизображений метафазных пластинок представлено в табл. 3.

Результаты лабораторий значительно различались по Пациентам 1 и 2. По Пациенту 1 диагнозы были верными. Были отмечены небольшие погрешности в написании формулы кариотипа: 46,XX,t(4;21)(q31;q22) и 46,XX,t(4;21),(q31;q22), которые могут быть связаны с невнимательностью к правилам ISCN. Одно заключение было признано ошибочным: «Женский кариотип со сбалансированной транслокацией между хромосомами 4 и 7». Причиной такой ошибки могла быть только невнимательность. В некоторых случаях в заключениях не было указания на сбалансированный характер перестройки.

По Пациенту 2 результаты были значительно хуже — 15 лабораторий не смогли правильно интерпретировать хромосомную перестройку. Инсерция является редкой формой хромосомной перестройки, возможно, поэтому в большинстве неправильных ответов она была расценена как транслокация — кариотип: 46,XY,t(11;21)(q21;q22.1). Заподозрить инсерцию было легко при определении точек разрывов — качество изображений позволяло сделать вывод о сохранности терминальных сегментов хромосом 11 и 21. Причинами

такой ошибки стали недостаточная квалификация специалиста и небрежность в проведении анализа — сопоставлении сегментов хромосом «бенд за бендом». То же можно сказать и о случаях, когда цитогенетик не обратил внимания на изменения хромосомы 21 и перестройка была расценена как инверсия или интерстициальная делеция хромосомы 11 (3 лаборатории). В некоторых случаях характер транслокации вызывал сомнения в лаборатории, но записанная формула не соответствовала ISCN и не имела смысла, например: 46,XY,t(11;21)(q21q23;q11.1q11.2). Заключение: Реципрокная транслокация в двух интерстициальных сегментах хромосом 11 и 22. В двух случаях формула кариотипа была записана верно, однако заключения — не вполне корректно. Например: «Патологический мужской кариотип с носительством нереципрокной транслокации (инсерции) в длинное плечо хромосомы 21 материнского длинного плеча хромосомы 11». Несмотря на простоту заключения, в нем нет указаний, что перестройка сбалансированная; судя по заключению, она скорее несбалансированная. В заключении «Сбалансированная нереципрокная транслокация между хромосомами 11 и 21» есть указание на сбалансированный характер перестройки, но нет указания, какая хромосома является донором, а какая реципиентом. А в заключении «Кариотип аномальный мужской. Инсерция фрагмента участка длинного плеча хромосомы 21 в длинное плечо хромосомы 11» не только нет указания на сбалансированность перестройки, но и определение хромосом как донора и реципиента не соответствует цитогенетической картине и формуле кариотипа. Двойственный характер носит следующее заключение: «Транслокация хромосом 4 и 21. Инсерция участка длинного плеча хромосомы 11 на длинное плечо хромосомы 21».

Одна из рекомендаций Е.С.А. для улучшения качества цитогенетических исследований — требование, чтобы каждый случай анализировался двумя специалистами. Это правило редко соблюдается в наших лабораториях. Тем не менее очевидно, что его соблюдение способно свести к минимуму количество ошибочных диагнозов, в особенности ошибок, допущенных по невнимательности и небрежности. Обидно расценивать результат как неправильный, если, например, вместо плеча «p» указано плечо «q» или вместо хромосомы 11 указана хромосома 4, но беда в том, что подобные ошибки могут случаться и на практике.

Заключение

Проведенный анализ экспертной оценки качества цитогенетических исследований по разделам 1 и 2 позволяет сделать вывод о том, что значительная часть лабораторий, участвовавших в ВОК, работает с препаратами хорошего качества и правильно ставит цитогенетический диагноз. Вместе с тем, были выявлены и серьезные недостатки: 5 из 16 лабораторий, участвовавших в Раз-

деле 1, использовали для анализа хотя бы один препарат с отсутствием или плохим качеством G-окраски, а в половине лабораторий, участвовавших в разделе 2, не смогли правильно интерпретировать выявленную хромосомную перестройку. Основными причинами неудовлетворительных результатов были низкое качество GTG-окрашивания хромосом, а также невнимательность и небрежность специалистов при записи формулы кариотипа и заключения. Участие лаборатории в системе ВОК позволяет выявить имеющиеся недостатки в работе и может существенно помочь в улучшении качества цитогенетических исследований.

Список литературы

1. ISCN 2016 — An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (2016) Ed. McGovan-Jordan J., Simons A, Schmid M. Karger. 2016.
2. Hastings R., Howell R., Bricarelli FD., Kristoffesson U., Cavanani S. General Guidelines and Quality Assurance for Cytogenetics. A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. E. C. A. Newsletter. 2012; 29: 7-25., <https://www.e-c-a.eu/en/GUIDELINES.html>
3. Hastings R., Howell R., Bricarelli FD., Kristoffesson U., Cavanani S. Specific Constitutional Cytogenetic Guidelines. A common European framework for quality assessment for constitutional, acquired and molecular cytogenetic investigations. E. C. A. Newsletter. 2012; 30: 11-19., <https://www.e-c-a.eu/en/GUIDELINES.html>