

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д. Л. Пиневич

2015г.

Регистрационный № 202-1215

АЛГОРИТМ ДИАГНОСТИКИ ПРИЖИВЛЕНИЯ И ОТТОРЖЕНИЯ  
ТРАНСПЛАНТАТА У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ АЛЛОГЕННОЙ  
ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ - РАЗРАБОТЧИК:

ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии,  
гематологии и иммунологии»

АВТОРЫ:

Марейко Ю.Е., к.б.н. Савицкая Т.В., Волочник Е.В., Лавриненко В.А,  
Акинфеева Э.Л., д.м.н., профессор, член-корреспондент НАН Беларуси  
Алейникова О.В.

Минск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее инструкция) изложен алгоритм диагностики приживления и отторжения трансплантата у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение заболеваний, требующих проведения аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток. Данная инструкция предназначена для врачей-трансплантологов, врачей-гематологов, врачей-онкологов, врачей-иммунологов, организаторов здравоохранения, оказывающих специализированную медицинскую помощь пациентам после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

#### **I. Показания к применению.**

Состояние после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

#### **II. Противопоказания для применения: нет.**

#### **III. Перечень необходимых медицинских изделий, лекарственных средств и т.д.**

Реакция агглютинации: моноклональные анти-А, анти-В антитела (цоликлоны анти-А, анти-В), антиресус- антитела, планшет.

Метод флуоресцентной гибридизации *in situ*: флуоресцентный микроскоп, камера Горяева, центрифуга, водяная баня, холодильник, предметное стекло, пробирки, набор пипеток с переменными объемами, среда для культивирования, содержащая телячью эмбриональную сыворотку, глютамин и антибиотик, кальцемид, 0,55% раствор KCl, фиксатор, буферные растворы, спиртовые растворы, ДНК-зонд, флуоресцентный краситель DAPI (4,6-диамидино-2-фенилиндолдигидрохлорид).

#### Полимеразная цепная реакция:

Выделение ДНК: спектрофотометр; вортекс; термоблок; высокоскоростная центрифуга, морозильник  $-20^{\circ}\text{C}$ ; набор пипеток с

переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл; пробирки объемом 0,5-1,5 мл; набор для выделения ДНК; вода для ПЦР, буферные растворы

Полимеразная цепная реакция с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом для определения STR-мишеней: шкаф для ПЦР; термоциклер для ПЦР; набор для амплификации STR-мишеней; морозильник  $-20^{\circ}\text{C}$ ; морозильник  $-70^{\circ}\text{C}$ ; набор пипеток с переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл; пробирки объемом 0,2; вода для ПЦР; праймеры и зонды к STR-мишеням; генетический анализатор с программным обеспечением для проведения капиллярного электрофореза и фрагментного анализа; 96-луночные плашки, септа, полимер, формамид, буфер для генетического анализатора.

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени для определения InDel-мишеней: шкаф для ПЦР; термоциклер для ПЦР в реальном времени; морозильник  $-20^{\circ}\text{C}$ ; морозильник  $-70^{\circ}\text{C}$ ; набор пипеток с переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл; пробирки объемом 0,2; оптически прозрачные планшеты и крышки для количественной ПЦР; вода для ПЦР; набор смеси для количественной ПЦР в реальном времени; праймеры и зонды к InDel-мишеням.

#### **IV. Описание технологии реализации алгоритма.**

Диагностика приживления и отторжения трансплантата после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток осуществляется путем определения источника гемопоэза – исследования химеризма (феномен сосуществования клеток двух разных организмов – донора и реципиента).

Обследование включает:

1. Определение в периферической крови уровня эритроцитов донора и реципиента по группе крови и резус-фактору серологическим методом на основе реакции агглютинации при несовместимости пары донор/реципиент по системе АВ0 и резус-фактору.

2. Определение в костном мозге или в периферической крови уровня мононуклеарных клеток донора и реципиента по половой хромосоме методом

флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) в парах донор/реципиент несовместимых по полу.

3. Определение в костном мозге и периферической крови уровня мононуклеарных клеток донора и реципиента методом полимеразной цепной реакции с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом для определения STR-мишеней (STR, short tandem DNA repeats) и методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени для определения InDel-мишеней (insertion/deletion polymorphism).

### **Диагностика эритроцитарного химеризма**

Осуществляется общепринятыми методами проведения реакции гемагглютинации. Пациентам, несовместимым с донором по АВ0-системе и/или резус фактору, после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) первое обследование эритроцитарного химеризма проводят на день+30 после трансплантации, с последующим исследованием на +60, +80, +100, +180 дни после аллоТГСК. Затем 1 раз в месяц до достижения 100% донорского химеризма по группе крови и резус-фактору (обязательно день+365). В течение 2 – 5 года после аллогенной ТГСК 1раз в год. При подозрении на отторжение трансплантата, рецидив заболевания обязательный контроль эритроцитарного химеризма. В случае лечения рецидива гемобластозов необходимо определение эритроцитарного химеризма после восстановления гемопоэза. При необходимости трансфузий препаратов крови после длительного перерыва необходимо определить группу крови пациента и эритроцитарный химеризм. При наличии смешанного химеризма осуществляются трансфузии препаратов групп крови, которые не приведут к реакции гемагглютинации. При выявлении 100% эритроцитарного донорского химеризма периферическая кровь реципиента направляется для определения группы крови и разрешения на трансфузии препаратов донорской группы крови.

## **Диагностика лейкоцитарного химеризма методом флуоресцентной гибридизации *in situ***

Диагностика лейкоцитарного химеризма у пациентов несовместимых с донором по полу (половой химеризм) в мононуклеарах крови и костного мозга проводится общеустановленным методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH) по наличию отдельных и слитных сигналов с двуцветными ДНК-зондами специфичными для X- и Y-хромосом в интерфазных ядрах или на стадии метафазы. После аллогенной ТГСК в течение 1 года проводится обследование полового химеризма клеток костного мозга в случае онкологических заболеваний на +30, +60, +100, +180, +365 дни, неонкологических заболеваний на +30, +100, +365 дни. При проведении костномозговой пункции по поводу подозрения на отторжение трансплантата или рецидив заболевания вне зависимости от периода после трансплантации обязателен забор костного мозга на исследование полового химеризма. И в случае лечения рецидива гемобластозов необходимо определение полового химеризма костного мозга после восстановления гемопоэза для определения его источника.

В течение 2 – 5 годов половой химеризм контролируется в периферической крови, причем при гемобластозах в течение 2-го года 1 раз в 3 месяца, а при неонкологических заболеваниях 1 раз в 6 месяцев. 3-й – 5-й года для всех пациентов контроль 1 -2 раза в год.

При выявлении повышающегося смешанного химеризма интервалы короче, а на фоне иммунотерапии перед каждым последующим этапом лечения.

## **Диагностика лейкоцитарного химеризма методом ПЦР**

Осуществляется стандартными методами проведения полимеразной цепной реакции с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом и/или методом количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени. В лимфоцитах всех пациентов и доноров до начала режима

кондиционирования перед аллогенной ТГСК определяются информативные аллели методом ПЦР с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом путем определения STR-мишеней и методом ПЦР в реальном времени путем определения InDel-мишеней.

В посттрансплантационном периоде химеризм исследуется методом ПЦР с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом путем определения STR-мишеней. В случае определения уровня химеризма более 97% проводится дополнительный анализ методом ПЦР в реальном времени путем определения InDel-мишеней для контроля микрохимеризма.

После аллоТГСК у пациентов с гематологической патологией (тяжелые врожденные и приобретенные апластические анемии, гемоглобинопатии, болезни накопления, первичные иммунодефициты) в периферической крови в течение первого года после трансплантации исследование химеризма проводится 1 раз в 2 недели до полного стойкого химеризма, затем каждые 2 месяца (обязательно +30, +60, +100, +180 дни). В продолжение 2-го – 3-го годов – 1 раз в 6 месяцев; 4-го - 5-го годов – 1 раз в год. Оценка уровня химеризма в костном мозге в 1-й год осуществляется на +30, +100, +365 дни после аллоТГСК, 2-й год – 1 – 2 раза в год. При подозрении на отторжение трансплантата обязательно проводится контроль уровня химеризма как в периферической крови, так и в костном мозге. При выявлении смешанного химеризма наблюдение осуществляется 1 раз в месяц; при увеличивающемся смешанном химеризме – 1 раз в 2 недели до достижения полного или стойкого снижающегося смешанного химеризма; а при проведении иммунотерапии – перед каждым последующим ее этапом. При задержке приживления, при подозрении на отторжение трансплантата исследуется линейноспецифический химеризм.

У реципиентов с онкогематологической патологией (ОЛЛ, ОМЛ, ХМЛ, МДС, ЮММЛ и другие) химеризм определяется в периферической крови:

1-й год до +180 дня каждые 2 недели, затем ежемесячно до +365 дня (в +365 день обязательный контроль); 2-й год – 1 раз в 3 месяца, 3-й – 5-й год – 1 – 2

раза в год. В костном мозге: 1-й год на +30, +60, +100, +180, +365 день; 2-й год – 1 раз в 6 месяцев; 3-й – 5-й год 1 раз год.

Особой группой являются пациенты, у которых показанием к аллогенной ТГСК являлась неходжкинская лимфома. У них динамическое наблюдение уровня химеризма осуществляется в периферической крови: в течение 1-го – 2-го года до +180 дня каждые 2 недели, затем 1 раз в 3 месяца; 3-го – 5 годов – 1 раз в год. В костном мозге 1-й год на +30, +100, +180, +365 день; 2-й – 5-й год 1 раз год.

У всех пациентов с онкогематологической патологией, в том числе с неходжкинскими лимфомами, при обнаружении смешанного химеризма или увеличивающегося смешанного химеризма наблюдение осуществляется 1 раз в 2 недели до достижения полного химеризма или стойкого снижения смешанного химеризма, а при использовании иммунотерапии для лечения перед каждым последующим ее этапом. Подозрение на отторжение трансплантата, рецидив заболевания является показанием для исследования линейноспецифического химеризма. В случае лечения рецидива необходимо определение химеризма в костном мозге и периферической крови после восстановления гемопоэза.

У пациентов с гемобластомами необходимо регулярно контролировать уровень минимальной остаточной болезни при наличии маркера.

## **V. Интерпретация результатов подсчета уровня химеризма**

Приживление трансплантата. Полный химеризм – отсутствие аутомаркера или менее 0,1% методом ПЦР в реальном времени. Низкий смешанный химеризм – уровень аутомаркера менее 1%. Снижающийся смешанный химеризм – в течение 20 – 40 дней снижение уровня аутомаркера на 5% и более в 2 последующих анализах. Повышающийся смешанный химеризм – в течение 20 – 40 дней увеличение уровня аутомаркера на 5% и более в 2 последующих анализах. Стабильный смешанный химеризм – в течение 20 – 40 дней колебания уровня аутомаркера в пределах 5% в 2 последующих анализах.

Отторжение трансплантата. Уровень аутомаркера более 97,5%, донорских клеток менее 2,5%.

#### **VI. Возможные ошибки и осложнения:**

При исследовании эритроцитарного химеризма серологическим методом на основе реакции гемагглютинации ошибки могут быть связаны с длительным персистированием клеток реципиента на ранних этапах после аллогенной ТГСК или донора при отторжении трансплантата /рецидиве заболевания с аутовосстановлением всего гемопоэза, активной трансфузионной поддержкой, а также с некоторой субъективностью метода исследования.

При определении полового химеризма методом флуоресцентной гибридизации *in situ* ошибки в раннем посттрансплантационном периоде могут быть связаны с дефектами забора костного мозга – примесь периферической крови, в которой могут циркулировать остаточные клетки «хозяина». Кроме того, нарушение технологии исследования может привести к плохой фиксации и окраске материала и погрешности результатов.

Большую погрешность в измерение уровня химеризма метод полимеразной цепной реакции с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом для определения STR-мишеней могут вносить так называемые «stutter» пики, которые возникают в результате «скольжения» полимеразы в процессе амплификации на одну повторяющуюся единицу STR. Эти «stutter» пики могут вносить 5-15% вклад в пики перекрывающиеся с ними по размеру, а также симулировать картину смешанного химеризма при его низком уровне, если информативный аллель реципиента комигрирует со «stutter» пиком донорского аллеля. 'Stutter'-подобные пики могут появляться также после главного пика. Такие локусы должны быть исключены из анализа, особенно, когда четко определено наличие низкого уровня химеризма в других локусах. Эти особенности следует учитывать при подсчете уровня химеризма, особенно при его очень низких значениях (стремящихся к 0%) или при очень высоких (стремящихся к 100%). Разная эффективность амплификации аллелей



в мультиплексной ПЦР или аллельный дисбаланс является общим источником вариации, приводящей к  $\leq 15\%$  разнице в пределах пары аллелей донора или реципиента в 70-100% случаев, в зависимости от маркера.

Погрешности существует при использовании метода количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени для определения InDel-мишеней. При этой ПЦР разница в условиях амплификации между дублями влияет на точность определения значения химеризма: допускаемая погрешности измерения порогового значения  $St \pm 0.5$  между дублями, что соответствует вариации количества ДНК до 50% (коэффициент вариации парных измерений=0-50%), при низких значениях химеризма эта погрешность незначительна, а при высоких не допустима. Для сравнения 100% химеризм при измерении может давать значения между 75% и 150%, что не пригодно для измерения химеризма, а при значении 1% может давать значения между 0,75% и 1,5%, что вполне допустимо.

## ПРИЛОЖЕНИЕ 1

### Алгоритм динамического наблюдения за приживлением и отторжением трансплантата у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток путем исследования эритроцитарного химеризма

Показания	Технология	Время и интервал исследований	Результаты	Комментарии
<p>Реципиенты, несовместимые с донором по группе крови (ABO-системе, резус-фактору) вне зависимости от нозологической группы</p>	<p>Серологический метод на основе реакции гемагглютинации</p>	<p><i>1-й год:</i> +30, +60, +80, +100, +180 затем ежемесячно до достижения полного донорского химеризма (обязательно день +365) <i>2-й – 5-й год:</i> 1раз в год</p> <p>В случае подозрения на отторжение трансплантата, рецидив заболевания</p> <p>В случае лечения рецидива гемобластозов необходимо определение эритроцитарного химеризма после восстановления гемопоэза</p>	<p>Смешанный химеризм – трансфузии препаратов групп крови, которые не приведут к реакции гемагглютинации</p> <p>Полный донорский химеризм – определение группы крови и трансфузии препаратов крови донорской группы</p> <p>Полный химеризм реципиента - определение группы крови и трансфузии препаратов крови группы реципиента (до ТГСК)</p>	<p>При необходимости трансфузий препаратов крови после длительного перерыва необходимо определить группу крови пациента и эритроцитарный химеризм</p>

## ПРИЛОЖЕНИЕ 2

### Алгоритм динамического наблюдения за приживлением и отторжением трансплантата у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток путем исследования полового химеризма

Показания	Технология	Время и интервал исследований	Результаты	Комментарии
Реципиенты, несовместимые с донором по полу	Метод флуоресцентной гибридизации <i>in situ</i>	<p><b>Костный мозг:</b>  <i>1-й год:</i>  <u>Онкологические заболевания</u>                      +30, 60, 100, 180, 365 дни  <u>Неонкологические заболевания</u>                      +30, 100, 365 дни</p> <p>При проведении КМП по поводу подозрения на рецидив или отторжение трансплантата</p> <p>В случае лечения рецидива гемобластозов необходимо определение полового химеризма в костном мозге после восстановления гемопоэза</p> <p><b>Периферическая кровь:</b>  <i>1-й год</i>                      не проводится  <i>2-й год:</i>                      1 раз в 3 месяца - гемобластозы                      1 раз в 6 мес- неонкологические  <i>3-й – 5-й год</i>                      1 – 2раза в год</p>	<p>Повышающийся смешанный химеризм</p> <p>Повышающийся смешанным химеризм требует дополнительной терапии (коррекция иммуносупрессивной терапии, низкие дозы донорских лимфоцитов)</p>	<p>интервалы короче</p> <p>При проведении иммунотерапии химеризм исследуется перед каждым последующим этапом</p>

### ПРИЛОЖЕНИЕ 3

#### Алгоритм динамического наблюдения за приживлением и отторжением трансплантата у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток методами полимеразной цепной реакции

Показания	Технология	Время и интервал исследований	Результаты	Комментарии
Все пациенты	метод ПЦР с последующим капиллярным электрофорезом и фрагментным анализом	<b>До ТГСК:</b> Определение информативных аллелей  <b>После ТГСК:</b>		
<b>Гематологическая патология:</b> Тяжелые врожденные и приобретенные апластические анемии Гемоглобинопатии Болезни накопления Первичные иммунодефициты	путем определения STR-мишеней методом ПЦР в реальном времени путем определения InDel-мишеней (если химеризм более 97% методом STR-PCR)	<b>Периферическая кровь</b> <i>1-й год</i> 1раз в 2 недели до полного стойкого химеризма, затем каждые 2 месяца (обязательно +30, 60, 100 180дни) <i>2-й – 3-й год</i> 1раз в 6 месяцев <i>4-й - 5-й год</i> 1раз в год  При подозрении на отторжение трансплантата  <b>Костный мозг:</b> <i>1-й год</i> +30,100, 365 дни после ТГСК <i>2--й год</i> 1 – 2 раза в год  При подозрении на отторжение трансплантата	Смешанный химеризм  Увеличивающийся смешанный химеризм и на фоне терапии (например, отмена иммуносупрессивной терапии, использование донорских лимфоцитов)	интервал - 1 раз в месяц  1раз в 2 недели до достижения полного или стойкого снижения смешанного химеризма.  Линейноспецифический химеризм при задержке приживления, при подозрении на отторжение трансплантата

<p><b>Онкогематологическая</b> патология ОЛЛ ОМЛ ХМЛ МДС ЮММЛ</p>		<p><b>Периферическая кровь:</b> <i>1-й год</i> до +180 дня каждые 2 недели, затем ежемесячно до +365 дня <i>2-й год</i> 1раз в 3 месяца <i>3-й – 5-й год</i> 1 – 2 раза в год <b>Костный мозг</b> <i>1-й год</i> +30, +60, +100, +180, +365 день <i>2-й год</i> 1раз в 6 месяцев <i>3-й – 5-й год</i> 1 раз год</p> <p>При подозрении на рецидив</p> <p>В случае лечения рецидива гемобластозов необходимо определение химеризма в костном мозге и периферической крови после восстановления гемопоэза</p>	<p>Смешанный химеризм</p> <p>Увеличивающийся смешанный химеризм на фоне терапии (например, отмена иммуносупрессивной терапии, использование донорских лимфоцитов)</p>	<p>1раз в 2 недели до достижения полного или стойкого снижения смешанного химеризма.</p> <p>При проведении иммунотерапии химеризм исследуется перед каждым последующим этапом</p> <p>Линейноспецифический химеризм при задержке приживления, при подозрении на отторжение трансплантата, рецидив заболевания</p> <p>Регулярный контроль МОБ при наличии маркера</p>
---	--	--	---	---

<p><b>Лимфомы другие</b></p>		<p><b>Периферическая кровь:</b>  1-й – 2-й год  до +180 дня каждые 2 недели,  затем 1 раз в 3 месяца  3-й -5-й год  1 раз в год  <b>Костный мозг</b>  1-й год  +30, +100, +180, +365 день  2-й – 5-й год  1 раз год  При подозрении на рецидив</p> <p>В случае лечения рецидива гемобластозов необходимо определение химеризма в костном мозге и периферической крови после восстановления гемопоэза</p>	<p>Смешанный химеризм</p> <p>Увеличивающийся смешанный химеризм на фоне терапии (отмена иммуносупрессивной терапии, использование донорских лимфоцитов)</p>	<p>1раз в 2 недели до достижения полного или стойкого снижения смешанного химеризма.</p> <p>При проведении иммунотерапии химеризм исследуется перед каждым последующим этапом</p> <p>Линейноспецифический химеризм при задержке приживления, при подозрении на отторжение трансплантата, рецидив заболевания</p> <p>Регулярный контроль МОБ при наличии маркера</p>
----------------------------------	--	--	---	---

