

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

«УТВЕРЖДАЮ»



Первый заместитель Министра

Д. Л. Пиневич

2014 г.

Регистрационный № 110-1014

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ У  
ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**  
инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЯ - РАЗРАБОТЧИКИ:**

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

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

**Авторы:**

к.м.н., доцент Качан Г.Л., к.б.н., доцент Белевцев М.В., к.м.н., доцент Волкова Л.И., Марейко Ю.Е., Минаковская Н.В., Шарапова С.О., д.м.н., профессор, член-корреспондент НАН Беларуси Алейникова О.В.

Минск, 2014

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневиц  
27.11.2014  
Регистрационный № 110-1014

**МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ  
У ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ТРАНСПЛАНТАЦИИ ГЕМОПОЭТИЧЕСКИХ  
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии», ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. Г.Л. Качан, канд. биол. наук, доц. М.В. Белевцев, канд. мед. наук, доц. Л.И. Волкова, Ю.Е. Марейко, Н.В. Минаковская, С.О. Шарাপова, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск 2014

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен метод диагностики иммунологических нарушений у пациентов в возрасте 1–18 лет после аутологичной и аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК).

Настоящая инструкция предназначена для врачей-трансплантологов, врачей-иммунологов, врачей-гематологов, врачей-онкологов, врачей-педиатров, а также для других врачей-специалистов, оказывающих специализированную медицинскую помощь пациентам после аутологичной и аллогенной ТГСК.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

Автоматизированная система клеточной селекции, вортекс, дозирующие устройства для малых и больших объемов, ламинарный шкаф, магнит для селекции клеток, микроскоп световой, орбитальный шейкер, проточный цитофлуориметр, CO<sub>2</sub>-инкубатор (5% CO<sub>2</sub>, 37°С), центрифуга, камера Горяева, наконечники для дозаторов объемом от 0,1 до 1000 мкл, одноразовые флаконы для суспензионных культур клеток, пробирки для магнита, пробирки для проточного цитофлуориметра, серологические пипетки с градуировкой (объем 5; 10; 25 мл), центрифужные пробирки (объем 15; 50 мл), реагент для создания градиента плотности (1,077 г/см<sup>3</sup>), раствор антибиотиков/антимикотиков, среда культуральная RPMI-1640, среда культуральная AIM-V, буфер для селекции на магните, фосфатно-солевой буфер (pH = 7,2–7,4), физиологический раствор, лизирующий эритроциты раствор, моноклональные антитела, параформальдегид 1%, краситель трипановый синий.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Аутологичная и аллогенная ТГСК.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Не выявлены.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

1. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов проводится методом проточной цитофлуориметрии по общепринятым методикам.

2. Иммунологическое обследование выполняется всем реципиентам аутологичной и аллогенной ТГСК до трансплантации (не позднее чем за 1 неделю до начала кондиционирования).

3. В течение первого года после трансплантации иммунологическое обследование у реципиентов аутологичной и аллогенной трансплантации осуществляется в плановом порядке на день +30, +60, +100, +180, +365.

4. Реципиентам аллогенной ТГСК через 1 год после трансплантации иммунологическое обследование проводится 1 раз в 1 год в течение 5 лет.

5. Реципиентам аутологичной ТГСК иммунологическое обследование через 1 год после трансплантации проводится в случае неполного иммунологического восстановления на день +365.

6. По показаниям (персистирующая иммунологическая недостаточность, дисбаланс иммунной системы, реакция «трансплантат-против-хозяина», аутоиммунные цитопении, персистирующие инфекции) иммунологическое обследование проводится чаще.

7. Исследование включает определение процентного и абсолютного содержания субпопуляций лимфоцитов.

8. Абсолютное содержание лимфоцитов ( $10^9/\text{л}$ ) рассчитывается по формуле:

$$\text{количество лейкоцитов (10}^9\text{/л)} \times \% \text{лимфоцитов}/100.$$

9. Абсолютное содержание субпопуляций лимфоцитов ( $10^9/\text{л}$ ) вычисляется по формуле:

$$\text{количество лимфоцитов (10}^9\text{/л)} \times \% \text{В-лимфоцитов}/100.$$

10. Оценка иммунологического статуса для реципиентов аутологичной ТГСК включает следующие параметры: процентное и абсолютное содержание лимфоцитов и их субпопуляций: CD19+ В-лимфоциты, CD3+ Т-лимфоциты, CD3+DR+ активированные Т-лимфоциты, CD3+CD4+ Т-хелперы, CD3+CD8+ цитотоксические Т-клетки, CD3-CD16+56+ естественные киллеры, CD3+CD16+56+ естественные Т-киллерные клетки, уровень Ig G, Ig M, Ig A.

11. Исследование иммунологического статуса для реципиентов аллогенной ТГСК дополнительно включает следующие параметры: CD4+CD25+CD62L, CD4+CD31+CD45RA — тимические мигранты, CD3-CD16+56+ естественные киллеры и их субпопуляции (CD56bright CD56dim), CD27+IgD-CD19+ изотип-переключенные В-клетки памяти, CD27+IgD+CD19+ не переключенные В-клетки памяти, CD27-IgD+CD19+ наивные В-лимфоциты, наивные Т-хелперы (CD4+CD45RA+), Т-хелперы памяти (CD4+CD45RO+), наивные цитотоксические Т-лимфоциты (CD8+CD45RA+), цитотоксические Т-клетки памяти (CD8+CD45RO+), CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> или CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> Т-регуляторы.

12. Полученные результаты оцениваются по центильным кривым (приложения 1–3) с обязательным учетом клинических данных.

13. При нормальном восстановлении иммунной системы показатели находятся в диапазоне 25–75 перцентилей (пц).

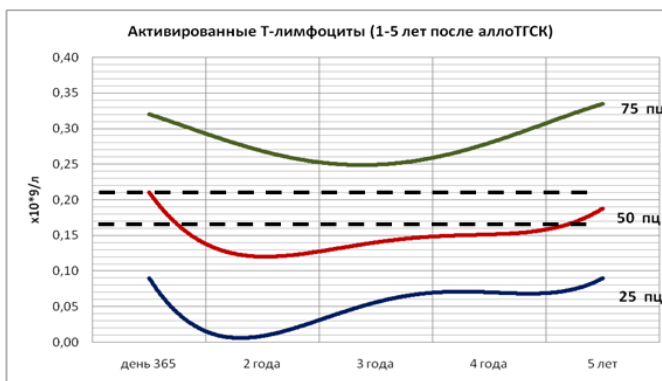
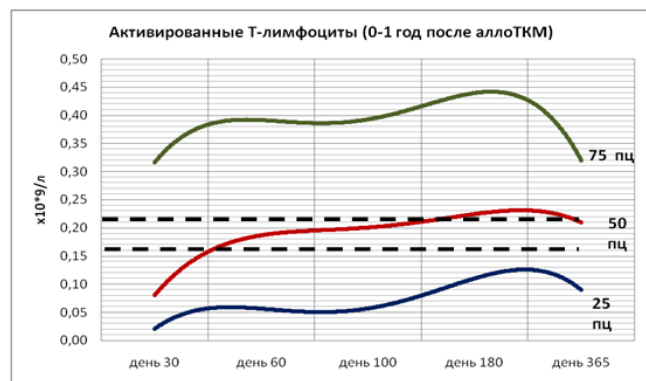
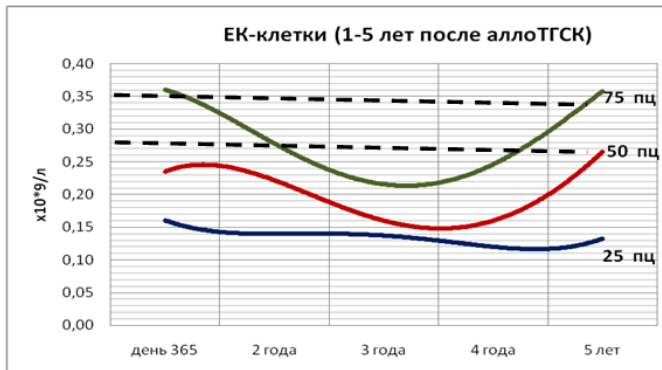
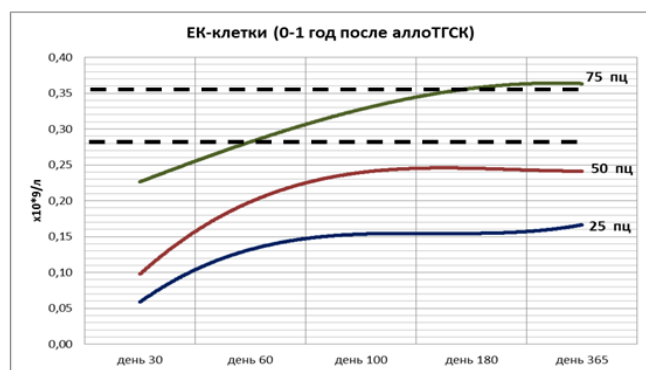
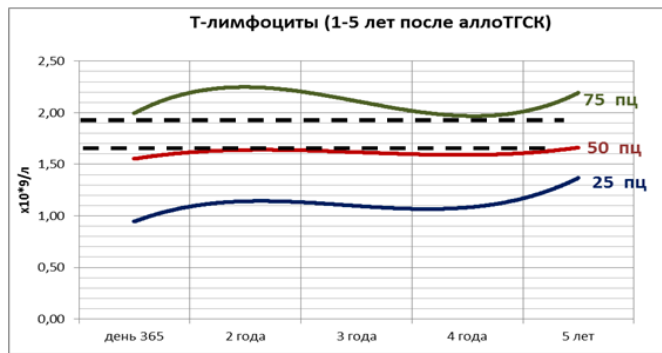
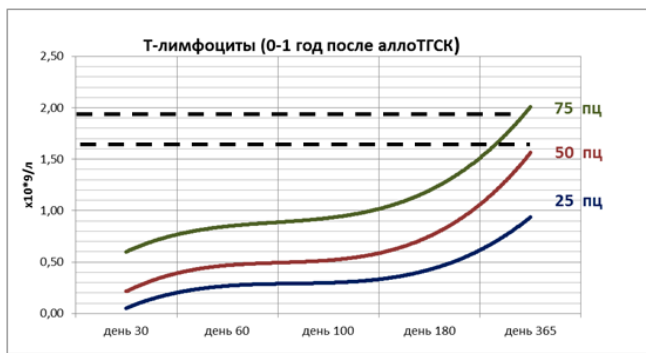
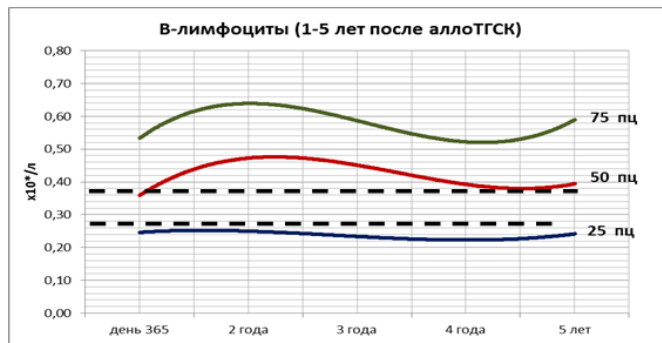
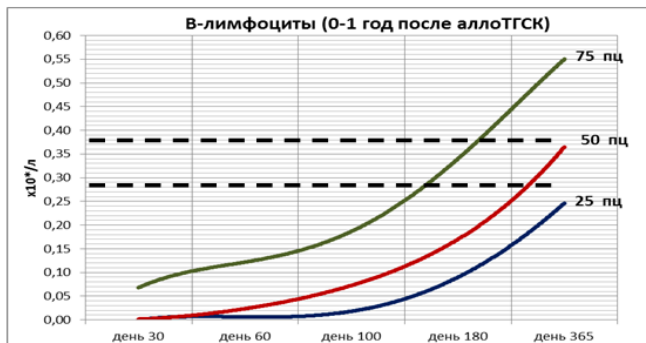
14. При замедленном иммунологическом восстановлении исследуемый параметр находится ниже 25 пц.

15. При избыточной активации отдельных звеньев иммунной системы соответствующий показатель находится выше 75 пц.

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

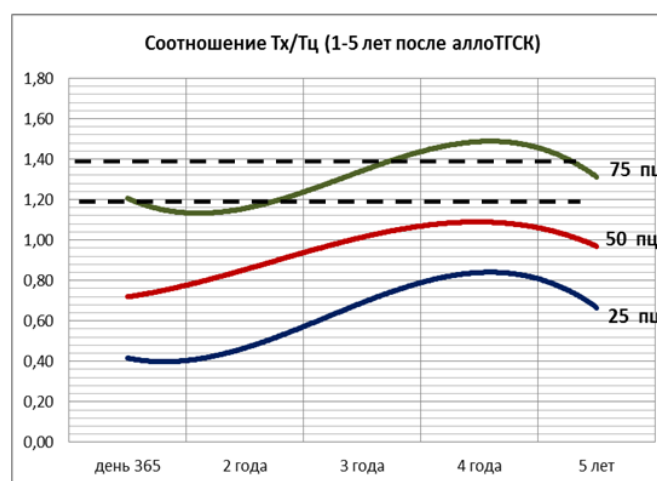
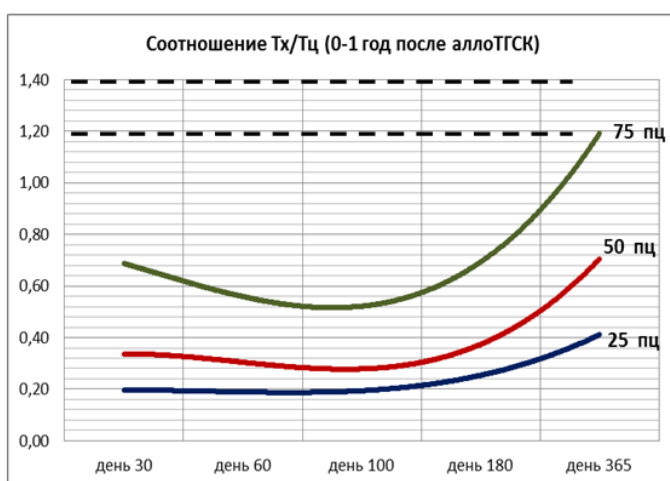
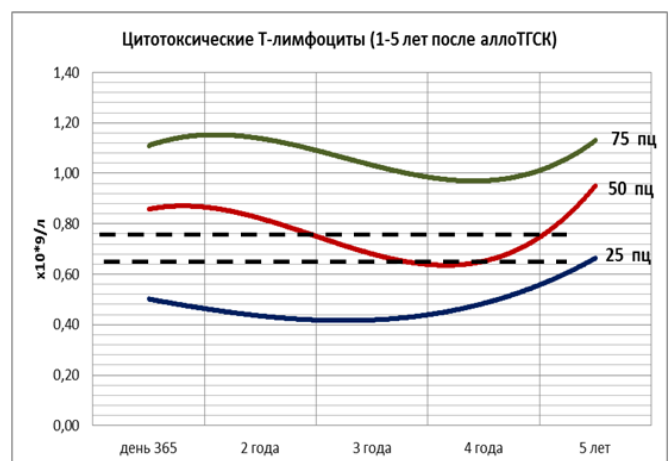
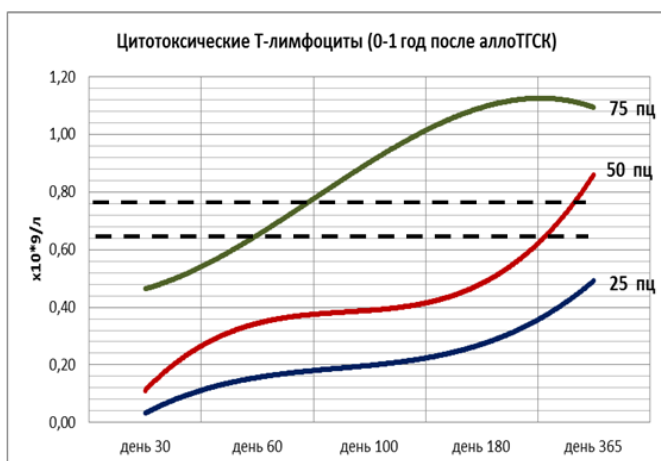
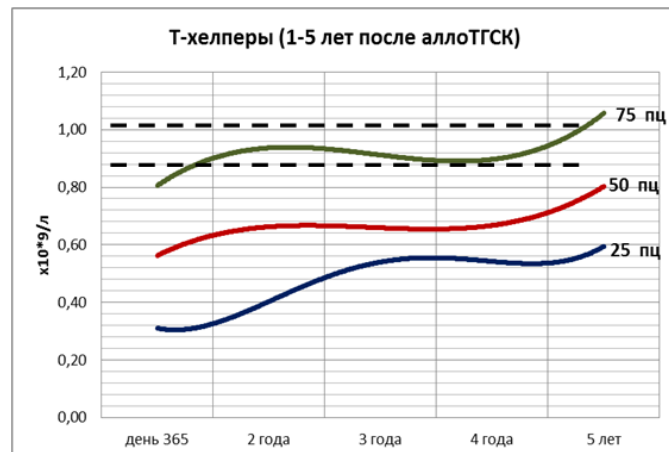
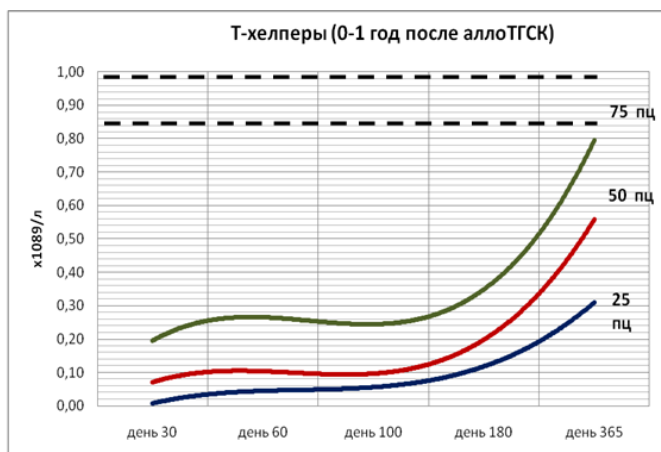
Отсутствуют.

## Центильные кривые иммунологической реконституции после аллотГСК (В-лимфоциты, Т-лимфоциты, ЕК-клетки, активированные Т-лимфоциты)



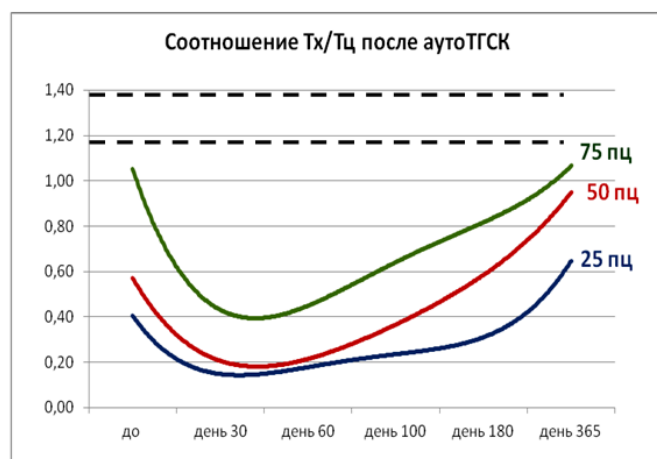
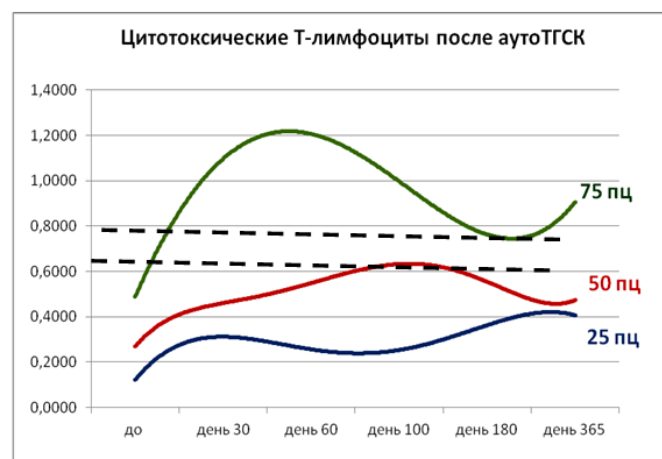
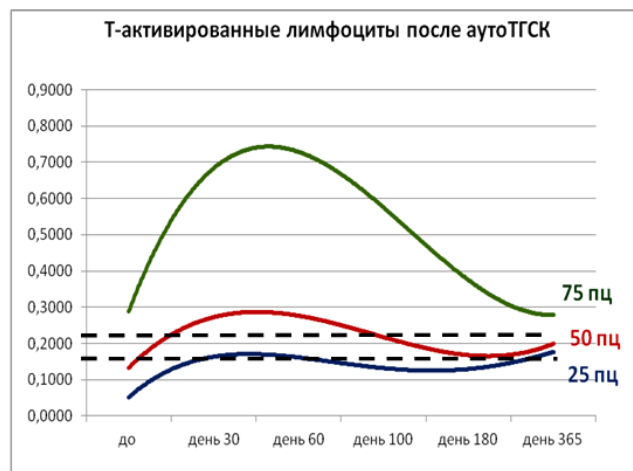
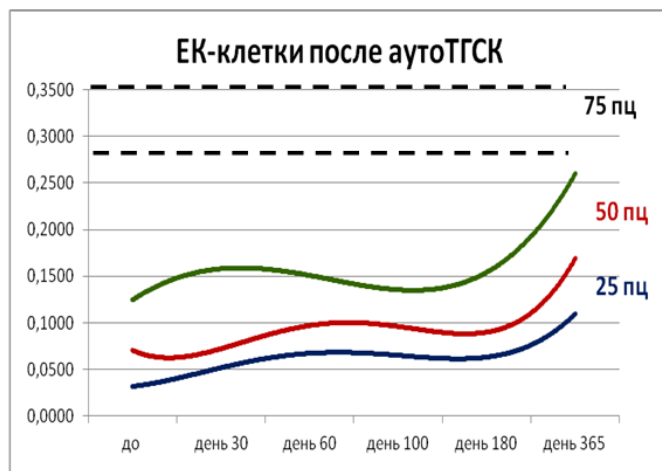
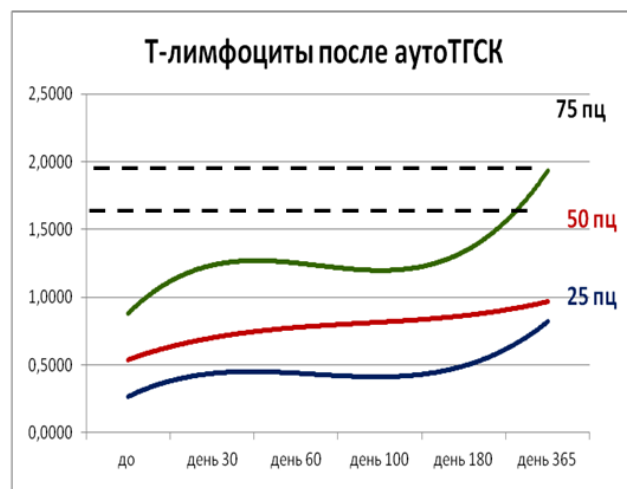
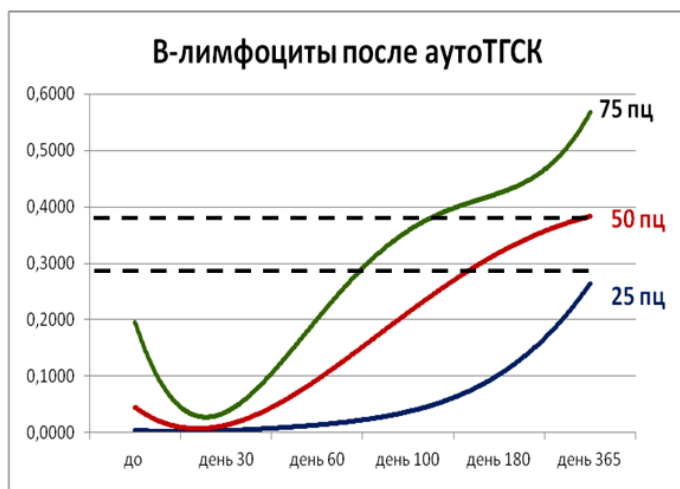
Пунктирная линия — 95% доверительный интервал показателя контрольной группы здоровых детей

**Центильные кривые иммунологической реконституции после аллотГСК**  
(Т-хелперы, цитотоксические Т-лимфоциты, соотношение Тх/Тц)



Пунктирная линия — 95% доверительный интервал показателя контрольной группы здоровых детей

**Центильные кривые иммунологической реконституции после аутоТГСК**



Пунктирная линия — 95% доверительный интервал показателя контрольной группы здоровых детей