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

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Д.Л. Пиневич
11.12.2015
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: Ю.Е. Марейко, канд. биол. наук Т.В. Савицкая, Е.В. Волочник, В.А. Лавриненко, Э.Л. Акинфеева, д-р мед. наук, проф., чл.-корр. НАН Беларуси О.В. Алейникова

Минск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) изложен алгоритм диагностики приживления и отторжения трансплантата у пациентов после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (аллоТГСК), который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение заболеваний, требующих 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.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Реакция агглютинации: моноклональные анти-А, анти-В антитела (поликлоны 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 (ПЦР):

Выделение ДНК: спектрофотометр; вортекс; термоблок; высокоскоростная центрифуга, морозильник -20°С; 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°С; морозильник -70°С; набор пипеток с переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл; пробирки объемом 0,2 мл; 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°С; морозильник -70°С; набор пипеток с переменными объемами от 0,5 мкл до 1 мл; пробирки объемом 0,2 мл; 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.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Состояние после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

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 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 аллоТГСК первое исследование эритроцитарного химеризма проводят на день +30 после трансплантации с последующим исследованием на +60, +80, +100, +180 дни, затем 1 раз в месяц до достижения 100% донорского химеризма по группе крови и резус-фактору (обязательно день+365); в течение 2–5-го года после аллоТГСК — 1раз в год. При подозрении отторжения трансплантата, рецидива заболевания контроль эритроцитарного химеризма обязателен. В случае лечения рецидива гемобластозов следует определять эритроцитарный химеризм после восстановления гемопоэза. При необходимости трансфузий препаратов крови после длительного перерыва устанавливают группу крови пациента и эритроцитарный химеризм. При наличии смешанного химеризма осуществляют 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 раздельных и слитных сигналов с двуцветными ДНК-зондами, специфичными для X и Y-хромосом в интерфазных ядрах или на стадии метафазы. После аллоТГСК в течение первого года проводится исследование полового химеризма клеток костного мозга при онкологических заболеваниях на +30,+ 60, +100, +180, +365 дни; неонкологических — на +30, +100, +365 дни. При костномозговой пункции по поводу подозрения отторжения трансплантата или рецидива заболевания вне зависимости от периода после трансплантации обязателен забор костного мозга на исследование полового химеризма. В случае лечения рецидива гемобластозов необходимо определение полового химеризма костного мозга после восстановления гемопоэза для выявления его источника.

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

При выявлении повышающегося смешанного химеризма интервалы становятся короче, а на фоне иммунотерапии контроль 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 аллоТГСК 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 расчета 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 мес. (обязательно +30, +60, +100, +180 дни); в продолжение 2–3-го годов —

1 раз в 6 мес.; 4–5-го годов — 1 раз в 1 год. Оценка химеризма в костном мозге в первый год осуществляется на +30,+100, +365 дни после аллоТГСК , 2-й год — 1–2 раза в 1 год. При подозрении отторжения трансплантата обязательно проводится контроль уровня химеризма как в периферической крови, так и костном мозге. При выявлении смешанного химеризма наблюдение осуществляется 1 раз в 1 мес.; при увеличивающемся смешанном химеризме — 1 раз в 2 недели до достижения полного или стойкого снижающегося смешанного химеризма; а на фоне иммунотерапии — перед каждым последующим ее этапом. При задержке приживления, подозрении отторжения трансплантата исследуется линейноспецифический химеризм.

У реципиентов с онкогематологической патологией (ОЛЛ, ОМЛ, ХМЛ, МДС, ЮММЛ и др.) химеризм определяется в периферической крови: первый год до +180 дня каждые 2 недели, затем ежемесячно до +365 дня (в +365 день обязательный контроль); 2-й год — 1 раз в 3 мес., 3–5-й год — 1–2 раза в год. В костном мозге: первый год на +30, +60, +100, +180, +365 день; 2-й год — 1 раз в 6 мес.; 3–5-й год — 1 раз 1 год.

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

У всех пациентов с онкогематологической патологией, в т. ч. с неходжкинскими лимфомами, при обнаружении смешанного или увеличивающегося смешанного химеризма наблюдение осуществляется 1 раз в 2 недели до достижения полного химеризма или стойкого снижения смешанного химеризма, а при иммунотерапии — перед каждым последующим ее этапом. Подозрение отторжения трансплантата, рецидива 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 гемобластозами необходимо регулярно контролировать уровень минимальной остаточной болезни при наличии маркера.

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 уменьшение 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%.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При исследовании эритроцитарного химеризма серологическим методом на основе реакции гемагглютинации ошибки могут быть связаны с длительным персистированием клеток реципиента на ранних этапах после аллоТГСК 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 химеризма, особенно при его очень низких значениях (стремящихся к 0%) или очень высоких (стремящихся к 100%). Различная эффективность амплификации аллелей в мультиплексной ПЦР или аллельный дисбаланс является общим источником вариации, приводящей к ≤15% разнице в пределах пары аллелей донора или реципиента в 70–100% случаев в зависимости от маркера.

Погрешности существуют 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 химеризма: допускаемая погрешность измерения порогового значения Ct±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 недопустима. Для сравнения 100% химеризм при измерении может давать значения между 75 и 150%, что непригодно 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
Реципиенты, несовместимые с донором по группе крови (АВ0-системе, резус-фактору) вне зависимости от нозологической группы	Серологический метод на основе реакции гемагглютинации	*1-й год:* +30, +60, +80, +100, +180 затем ежемесячно до достижения полного донорского химеризма (обязательно день +365) *2 –5-й год:* 1 раз в год В случае подозрения отторжения трансплантата, рецидива заболевания В случае лечения рецидива гемобластозов необходимо определение эритроцитарного химеризма после восстановления гемопоэза	Смешанный химеризм — трансфузии препаратов групп крови, которые не приведут к реакции гемагглютинации Полный донорский химеризм — определение группы крови и трансфузии препаратов крови донорской группы Полный химеризм реципиента — определение группы крови и трансфузии препаратов крови группы реципиента (до ТГСК)	При необходимости трансфузий препаратов крови после длительного перерыва необходимо определить группу крови пациента и эритроцитарный химеризм

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 *in situ*	**Костный мозг:** *1-й год:* Онкологические заболевания +30, 60, 100, 180, 365 дни Неонкологические заболевания +30, 100, 365 дни При проведении КМП по поводу подозрения рецидива или отторжения трансплантата В случае лечения рецидива гемобластозов необходимо определение полового химеризма в костном мозге после восстановления гемопоэза **Периферическая кровь:** *1-й год* не проводится *2-й год:* 1 раз в 3 мес. — гемобластозы 1 раз в 6 мес. — неонкологические заболевания *3–5-й год* 1–2 раза в год	Повышающийся смешанный химеризм Повышающийся смешанный химеризм требует дополнительной терапии (коррекция иммуносупрессивной терапии, низкие дозы донорских лимфоцитов)	Интервалы короче При проведении иммунотерапии и химеризм исследуется перед каждым последующим этапом

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 путем определения STR-мишеней Метод ПЦР в реальном времени путем определения InDel-мишеней (если химеризм более 97% методом STR-PCR)	**До ТГСК:** Определение информативных аллелей **После ТГСК:**		
Гематологическая патология: Тяжелые врожденные и приобретенные апластические анемии Гемоглобинопатии Болезни накопления Первичные иммунодефициты		**Периферическая кровь** *1-й год* 1 раз в 2 недели до полного стойкого химеризма, затем каждые 2 мес. (обязательно +30, 60, 100, 180 дни) *2–3-й год* 1 раз в 6 мес. *4– 5-й год* 1 раз в год При подозрении отторжения трансплантата **Костный мозг:** *1-й год* +30, 100, 365 дни после ТГСК *2-й год* 1–2 раза в год При подозрении отторжения трансплантата	Смешанный химеризм Увеличивающийся смешанный химеризм и на фоне терапии (например, отмена иммуносупрессивной терапии, использование донорских лимфоцитов)	Интервал — 1 раз в 1 мес. 1 раз в 2 недели до достижения полного или стойкого снижения смешанного химеризма Линейноспецифический химеризм при задержке приживления, при подозрении отторжения трансплантата
Онкогематологическая патология ОЛЛ ОМЛ ХМЛ		**Периферическая кровь:** *1-й год* до +180 дня каждые 2	Смешанный химеризм	1 раз в 2 недели до достижения полного или стойкого

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

		В случае лечения рецидива гемобластозов необходимо определение химеризма в костном мозге и периферической крови после восстановления гемопоэза		Линейноспеци-фический химеризм при задержке приживления, при подозрении отторжения трансплантата, рецидива заболевания Регулярный контроль МОБ при наличии маркера