proLékaře.cz | 22.11.2026

Stanovení chimérismu pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase. Přehled a první vlastní zkušenosti

Horký O., Mayer J., Dvořáková D.
Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematoonkologická klinika, Fakultní nemocnice Brno

Souhrn
Metoda polymerázové řetězové reakce v reálném čase (RQ-PCR) představuje v současnosti jednu z nejcitlivějších kvantitativních metod stanovení chimérismu po alogenní transplantaci krvetvorných buněk. Tato metoda je minimálně desetkrát citlivější než běžně používaná metoda fragmentační analýzy (FA) s fluorescenční detekcí. Aplikace metody umožňující stanovení mikrochimérismu, tj. smíšeného chimérismu (SC) na hladině menší než 1 %, dovoluje zachycení relapsu onemocnění signifikantně dříve a ve větším počtu případů, než je tomu u méně senzitivních metod. U pacientů s náhlým znovuobjevením autologní krvetvorby, odhalilo použití RQ-PCR SC také u předchozích odběrů, pomocí FA již klasifikovaných jako chimérismus kompletní (KC). Rovněž retrospektivní RQ-PCR analýza vzorků s pozitivní minimální zbytkovou chorobou, dle FA klasifikovaných jako KC, opakovaně potvrdila přítomnost autologní krvetvorby na hladině menší než 1 %. Použití metody stanovení chimérismu s lepší mezí detekce tedy umožňuje dřívější klinickou intervenci, avšak absolutní význam chimérismu i mikrochimérismu musí být dále hodnocen.
Klíčová slova: chimérismus, mikrochimérismus, PCR v reálném čase, fragmentační analýza

Summary
Horký O., Mayer J., Dvořáková D.: Quantification of chimerism by real-time polymerase chain reaction. Overview and first own experience

Real time polymerase chain reaction (RQ-PCR) represents one of the most sensitive methods for quantitative analysis of chimerism. This method is at least ten times more sensitive than commonly performed method of fragment analysis (FA) with fluorescence detection. Application of method that enables detection of microchimerism (mixed chimerism under 1%), can recognize relaps significantly sooner and in more cases than by using less sensitive methods. Performance of RQ-PCR within patients with sudden recurrence of autologous haematopoiesis showed microchimerism also in previous samples, formerly judged according to FA as complete donor chimerism (CDC). Furthermore, retrospective analysis of CDC samples from patient with positive residual disease repeatedly revealed microchimerism. Performance of more sensitive method can significantly contribute to early clinical intervention, nevertheless the predictable value of mixed chimerism and especially microchimerism must be further investigated.
Key words: chimerism, microchimerism, real-time PCR, fragment analysis

Trans. Hemat. dnes, 13, 2007, No. 2, p. 73–78.

Úvod

Alogenní transplantace kostní dřeně, a později i periferních kmenových buněk krvetvorby, se stala léčebným zákrokem u řady maligních i nemaligních hematologických onemocnění (1). Následné stanovení chimérismu, tedy určení podílu vlastní a dárcovské krvetvorby, je velmi důležitou součástí posttransplantačního sledování pacientů (2).

Smyslem analýzy chimérismu a jeho dynamiky v čase je, vedle počáteční informace o úspěšnosti nahrazení krvetvorby, nenahraditelná pomoc při hledání optimálního léčebného přístupu, jako je především úprava imunosuprese nebo podání infuze dárcovských lymfocytů (DLI) (3, 4).

Během éry transplantací se k analýze chimérismu používala řada metod (pro souhrn viz např. naše předcházející review (5). V posledním desetiletí byla za zlatý standard považována metoda fragmentační analýzy (FA) s fluorescenční detekcí polymorfních úseků genomové DNA (6). Konkrétně se jedná o oblasti obsahující repetitivní sekvence (VNTR – variable number of tandem repeat, STR – short tandem repeat), jejichž variabilní počet určuje délku dané oblasti (2). Jejich amplifikace pak umožňuje porovnání a odlišení jednotlivých jedinců, v případě chimérismu odlišení dárce a příjemce, a sledovat tak podíl krvetvorby po transplantaci. Mez stanovitelnosti se u FA pohybuje v rozmezí 1–5 % (6), ovšem ani hranice 1 % se nejeví jako dostatečná (2). Naopak se ukazuje, že použití metody s možností detekce mikrochimérismu, tzn. autologní krvetvorby na úrovni menší než 1 %, umožňuje dřívější odhalení relapsu onemocnění (7–14). Takovou metodou je polymerázová řetězová reakce v reálném čase (RQ-PCR).

V předkládaném článku uvádíme přehled dosud publikovaných prací využívajících RQ-PCR pro monitorování chimérismu po alogenní transplantaci krvetvorných buněk, diskutujeme aspekty spojené s jejím používáním, a to zvláště v konfrontaci s metodou FA, včetně vlastních zkušeností a prvních výsledků.

Přehled použití RQ-PCR

První práce zabývající se možností aplikace RQ-PCR

proLékaře.cz | 22.11.2026

pro účely monitorování chimérismu po transplantaci hematopoetických buněk byla publikována v roce 2000 (15). Úspěšně byl tehdy testován komerčně dostupný kit pro detekci jediného polymorfismu jednoho nukleotidu (SNP, single nucleotide polymorphism).

Polymorfismy jednoho nukleotidu se v genomu vyskytují zhruba každých 1,9 kb (16). Zpravidla jsou bialelické, vyskytují se v kódujících i nekódujících oblastech DNA, a představují hlavní část genomické diversity (16).

Pro kvantifikaci chimérismu pomocí RQ-PCR byla dále využita detekce sekvencí lidského chromozomu Y (14). Tohoto přístupu bylo, u dvojic dárce-žena příjemce-muž, využito také v řadě jiných publikovaných prací; pro ostatní dvojice pak bylo použito buďto SNP, nebo polymorfismu typu (krátké) inserce/delece, existence tzv. nulových alel, případně HLA (viz tab. 1) (7–15, 18–31).

Využití skupiny 19 polymorfismů, náležejících 12 bialelickým lokusům na 9 chromozomech, publikovali pro stanovení chimérismu v roce 2002 Alizadeh a kol. (7). Vybírali přitom sekvence lišící se alespoň dvěma za sebou jdoucími nukleotidy (krátké inserce/delece) s vysokým stupněm informativity. Z této publikace o tři roky později přímo vychází Masmas a kol. (26). Kromě úpravy podmínek amplifikace byly navrženy nové primery a sonda pro detekci pohlavně specifického polymorfismu.

Obě tyto práce využívají metodu dvojitě značených TaqMan® sond. Tato technologie je založená na měření fluorescenčního signálu sondy, která specificky hybridizuje do oblasti kvantifikovaného úseku DNA. Mezi první cyklem, kdy množství uvolněné próby excituje detekovatelný fluorescenční signál, a logaritmem počátečního množství DNA existuje lineární závislost. Tento cyklus je označován jako C_t („cycle treshold“). Dosazením C_t do vzorce

$$QU=QCx(1+E)^{-(\Delta CtU-\Delta CtC)}, \text{ kde}$$

QU... (normalizované) množství DNA v neznámém vzorku
QC.....(normalizované) množství DNA kalibrátoru
(vzorek DNA příjemce před transplantací)
ΔCtU.....rozdíl hodnot Ct u neznámého vzorku ΔCt = Ct
cílové sekvence – Ct referenční sek.)
Δ CtC..... rozdíl hodnot Ct kalibrátoru
E..... efektivita reakce (je-li efektivita reakce 100 %,
pak E = 1),

nebo použitím kalibrační křivky standardů o známé koncentraci, může být také určeno množství sledované DNA v neznámém vzorku (7, 26). Principiálně velmi podobné TaqMan® sondám je použití dvojic jednoduše značených sond pro LighCycler® (Roche) (12).

Odlišný princip kvantitativní RQ-PCR je naproti tomu založen na detekci fluorescenční látky nazývané SYBR Green. Tato látka emituje fluorescenční záření až po interkalaci do dvouvláknové DNA. Při PCR tak lze kontinuálně měřit množství vznikajícího produktu. Nevýhodou této metody je, že se SYBR Green váže i na primerové dimery a jiné nespecifity, jež se mohou během reakce tvořit, což může zkreslit kvantifikaci vlastní amplifikované DNA. Naopak výhodou jsou nízké náklady a univerzální použití – odpadají vysoké náklady na syntetizování značených specifických sond (18, 30–31).

RQ-PCR *versus* FA

Hlavním přínosem metody RQ-PCR je lepší mez stanovitelnosti i detekce. Zatímco u FA s fluorescenční detekcí je nejmenší udávané detekovatelné množství minoritní populace s určením exaktní hodnoty 1–5 % (6), je tato hranice u RQ-PCR posunuta minimálně desetkrát (4).

V závislosti na typu používaného polymorfismu a postavení informativní alely, je možné mikrochimérismus detekovat i pomocí FA (6). Úrovně detekčního limitu srovnatelné s RQ-PCR lze dosáhnout analýzou chimérismu v jednotlivých buněčných liniích krve (4, 6).

Další výhodou RQ-PCR je rychlejší provedení kvantitativní analýzy – pouze příprava a provedení PCR plus výpočet – tedy bez dalšího zpracovávání (odpadá příprava PCR produktů na FA a především její déletrvající provedení). Rovněž univerzální podmínky amplifikace šetří čas tím, že se dají analyzovat všechny polymorfismy najednou.

Je ovšem třeba mít na paměti limitaci v kvantitativní přesnosti metody RQ-PCR: rozdíl jediného cyklu tvoří ve výsledku dvojnásobný kvantitativní rozdíl. To ovšem znamená koeficient variace až 56 % (26). Reprodukovatelnost FA se naproti tomu pohybuje v rozmezí 4–8 % (3). Z toho plyne, že použití RQ-PCR je přesné pouze pro vzorky s podílem vlastních buněk do 5 % (3, 4) a nemůže tedy zcela nahradit FA. Zatímco u FA lze najít informativní STR či VNTR polymorfismus hypoteticky u všech dvojic příjemce-dárce, u RQ-PCR existuje tato možnost asi jen u 90 % dvojic (4).

Nevýhodou RQ-PCR zůstává také vyšší cena výsledku jednoho stanovení – kromě skutečnosti, že se vyšetření provádí vždy ve dvou paralelách, je rovněž třeba připočíst náklady na amplifikaci referenčního „house-keeping“ genu (včetně negativní a pozitivní kontroly).

RQ-PCR – naše zkušenosti

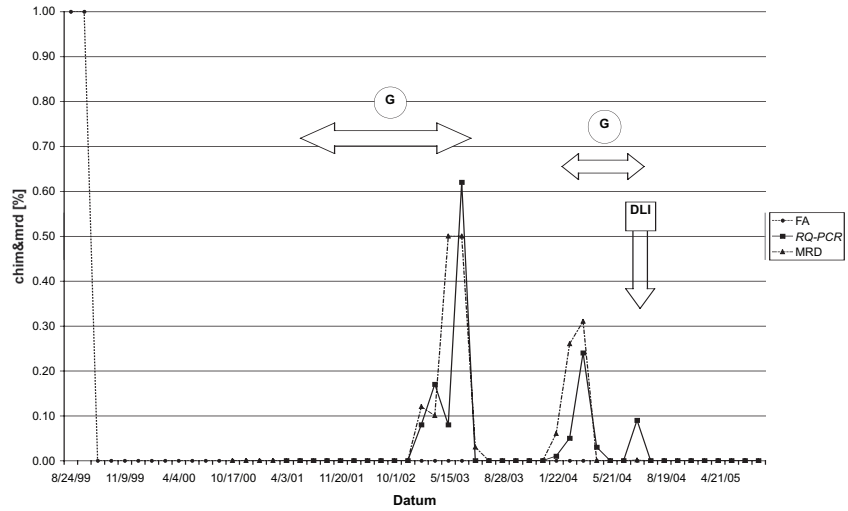
Na našem pracovišti jsme pro detekci chimérismu pomocí RQ-PCR převzali 11 polymorfismů krátkých insercí a delecí z publikace Alizadeh a kol. (7) a marker vázaný na chromozom Y (26). Podmínky reakce jsme modifikovali použitím jiného reakčního objemu a délkou denaturace a změnili jsme rovněž množství templátu, typ značení sond a použité reagencie, což znamenalo především příznivější finanční dopad. 100 ng DNA bylo smícháno s 12,5 µl univerzálního mixu (2x ABsolute QPCR ROX Mix, ABgene), 600 nM primery a 200 nM sondou (BHQ1-FAM, Generi Biotech), v reakčním objemu 25 µl. Na přístroji RG-3000 (Corbett Research) byla reakce iniciována inkubací 15 minut při 95 °C, po které následovalo 50 amplifikač-

proLékaře.cz | 22.11.2026

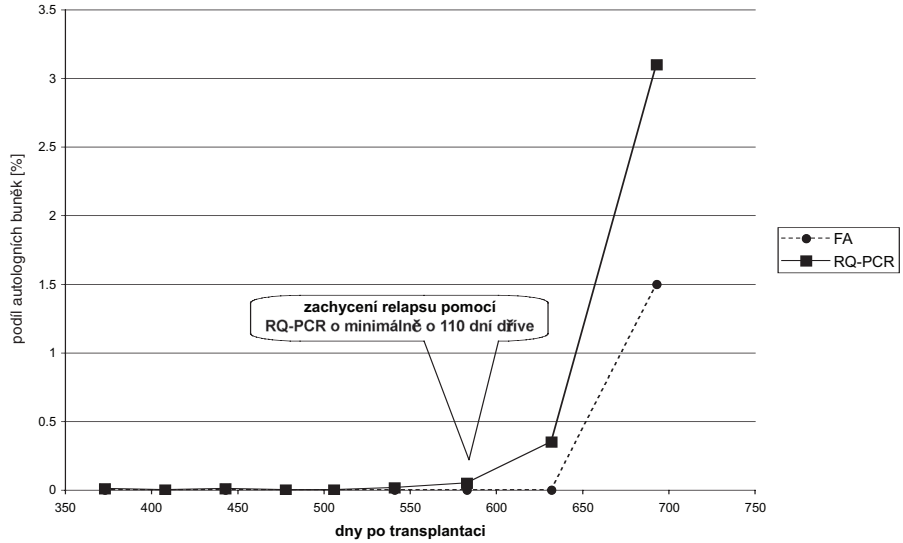
Tab. 1. Přehled všech publikovaných prací (citace tučně) a některých abstraktů z konferencí European Group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) a American Hematology Association (ASH) od r. 2003 (kurzivou), zabývajících se bezprostředně metodikou a využitím RQ-PCR pro stanovení chimérismu. Z uvedených polymorfismů vychází nejlépe použití detekce markeru vázaných na chromozom Y, a to pro jeho mez detekce. Pro větší specifičnost reakce a tedy menší riziko falešně pozitivních výsledků se jeví výhodnější aplikace polymorfismů typu inserce/delece před použitím SNP. Výhody a nevýhody rozdílného principu PCR je uveden v textu.

Publikace	Polymorfismus RQ-PCR	Princip	Informativita	Mez stanovitelnosti	Alternativní metoda	Výsledky a poznámky
Oliver et al. JMD. 2000 (15)	1 SNP	TaqMan		5%	Southern Blot	první publikace testující možnost apliakce SNP-RQ-PCR (detekce genu CYP2C9) pro monitorování chimérismu po alogenní transplantaci krvetvorných buněk
Fehse et al. J Hematother Stem Cell Res. 2001 (17)	Y	TaqMan		<0,001%	nested a/nebo kvant. PCR (bcr/abl) FISH (Y, bcr/abl)	soubor 40 pacientů, poprvé aplikace RQ-PCR s detekcí markeru chr. Y; u dvou pacientů zaznamenán nárůst mikrochimérismu časně před relapsem
Alizadeh et al. Blood. 2002 (7)	18 krátkých in/del Y	TaqMan	>90%	0,1%	STR	první publikace s uceleným panelem 19 polymorfismů (18+Y) s rozdílem alespoň dvou nukleotidů 4 klinické příklady včetně jednoho s detekcí znovuobjevení autologní krvetvorby na hladině 0,1% 58 dní před relapsem)
Wilhelm et al. Biol Chem. 2002 (18)	1 in/del 1 SNP	SYBR Green		0,03% (in/del) 1,6% (SNP)		použití 2 polymorfismů asociovaných s klinickým rizikem – 10 bp in/del polymorfismu v promotoru faktoru VIIc a 4G/5G SNP v genu PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1)
Elmaagacli et al. EBMT 2003 (8)	12 SNP Y	TaqMan		0,01% 0,001% (Y)	STR	*410 vzorků od 72 pacientů: 290 vzorků (71%) stejný výsledek oběma metodami – 100 (25%) KC, 186 (45%) SC; 19 pacientů záchyt SC jen díky RQ-PCR, osm z nich zrelabovalo; + detekce chr. Y u jiných 45 pacientů*
Thiede et al. EBMT 2003 (9)	Y			0,001%	STR	*retrospektivní analýza 43 pacientů; pacienti v remisi: stabilní chim. 0,0002–0,024% relabující pacienti: rostoucí SC, záchyt 120 dní dopředu*
Naparstek et al. ASH 2003 (19)	SNP			0,625%	STR	*nalezení autologní krvetvorby u archivovaných vzorků relabujícího pacienta, pomocí STR klasifikovaných jako KC*
Maas et al. Leukemia. 2003 (20)	7 SNP Y	TaqMan	97%	0,1-0,01%	FISH	aplikace SNP-RQ-PCR u 80 „T-cell-depleted“ transplantovaných pacientů od HLA identického příbuzného; popis léčebné odpovědi jednoho CML pacienta na DLI
Uzunel et al. EBMT 2004 (10)	11 SNP			0,01%	VNTR	*20 pacientů s akutní lymfatickou leukemií; porovnávání vzorků z PB vs. BM; (17krát vyšší podíl autologních buněk v BM); u relabujících pacientů vyšší (>0,1%) nebo rostoucí podíl vlastních buněk (v porovnání s VNTR záchyt relapsu o 0–3,4 měsíců dříve)*
Baak et al. ASH 2004 (11)	Y	TaqMan		0,01%	STR FISH	*analýza 36 vzorků od 11 pacientů; v 19 z nich SC detekován pouze pomocí RQ-PCR; u jednoho pacienta s rostoucím SC, detekovaným pouze RQ-PCR, zaznamenán relaps, naproti tomu remise u osmi pacientů, kde stabilní SC na úrovni 0,01–0,1%)*
Lucas et al. ASH 2004 (21)	HLA			0,000%		*detekce cytotoxických T-lymfocytů proti antigenu EBV (virus Epstein Barrové) při imunoterapii refrakterní Hodgkinovy choroby*
Rabascio et al. EBMT 2005 (22)	in/del Y	TaqMan				*polymorfismy jako Alizadeh et al., odečet SC z kalibrační řady; analýza chim. u 14 pacientů ve třech obdobích po transplantaci (den +28, +56, +84); vysoká reprodukovatelnost a opakovatelnost RQ-PCR*
Buno et al. EBMT 2005 (23)	3 “null” alely 6 in/del Y	TaqMan		0,01%	STR FISH	*porovnání použitých metod na základě vzorků ředění hypotetických dárce a příjemce: fluorescenční STR/FISH: mez detekce 1% vs. RQ-PCR 0,01%; horší správnost kvantifikace vzorků s vyšším podílem příjemcovských buněk analyzovaných RQ-PCR pomocí markerů nezávislých na pohlaví (tj. kromě detekce chr. Y)*
Jiménez-Velasco et al. EBMT 2005 (24)	3 “null” alely 10 in/del Y	jednoduše značené sondy	86%	0,01%		*porovnání chimérismu v kostní dřeni (BM) a periferní krvi (PB)-v BM přetrvávající SC cca 0,5% více než tři roky po SCT=> pro analýzu lepší PB (navíc u pacientů s fúzním genem sice SC v BM, ale MRD negativní)*
Harries et al. Bone Marrow Transplat. 2005 (25)	6 SNP Y	TaqMan	100%	1%	STR	použití dvou různě značených sond pro detekci obou alel SNP současně v jedné zkumavce, výpočet chimérizmu ze vzorce, nezávislého na účinnosti reakce; u 10 pacientů z 12 KC oběma metodami
Jiménez-Velasco et al. Leukemia. 2005 (12)	4 “null” alely (včetně Y) 6 in/del	jednoduše značené sondy	80,3%	0,01%	VNTR	61 dvojic dárce/příjemce, narůstající SC před relapsem pozorován v 88,2% případů pacientů s akutní leukemií, v porovnání s 44,4% u VNTR; medián zachycení relapsu 58 dní
Masmas et al. Biol Blood Marrow Transplant. 2005 (26)	16 krátkých in/del Y	TaqMan		0,1%		vychází z Alizadeh et al.(7), nové primery pro detekci chr. Y, eliminace dvou nejméně informativních polymorfismů, úprava podmínek; automatizace
Masmas et al. ASH 2005 (27)	krátké in/del SNP					kinetika chimérismu krátce po transplantaci v populacích buněk CD4+, CD8+ a CD15+
Halaburda et al. EBMT 2006 (28)	6 “null” alel 9 in/del	TaqMan				12 pacientů; možná predikce akutní reakci štěpu proti hostiteli
Picardi et al. EBMT 2006 (29)	11 SNP Y	TaqMan			FISH VNTR	18 pacientů; SC dle RQ-PCR pozorován u všech, kteří následně zrelabovali, a o 45 dní (0–315) dřív než u ostatních
Eshel et al. Lab Hematol. 2006 (30)	1 SNP	SYBR Green		0,5%		detekce SNP v genu pro cytochrom P450 (CYP2C9) u jediné dvojice dárce-příjemce
Kroger et al. Exp Hematol. 2006 (13)	7 in/del Y	TaqMan		0,01% (in/del) 0,001% (Y)	imunofixace PCR s pacient specifickými primery (IgH)	62 vzorků 22 pacientů s mnohočetným myelomem (MM) + 48 vzorků BM a PB od 34 pacientů s jinou diagnózou MM: remise u 15 z 16 (93%) pacientů se stabilním nebo klesajícím SC vs. 5 relapsů z 6 pacientů s rostoucím SC KC v plazmě (PB) je opožděno oproti T lymfocytům pacienti s GvHD-častější u pacientů, kteří KC v den +180 (43% vs. 18%)
Koldehoff et al. Am J Hematol. 2006 (14)	7 in/del 3 SNP Y	TaqMan	92,6%	~0,01% 0,001% (Y)	VNTR STR FISH	in/del+SNP vs. VNTR/STR: 470 vzorků od 135 pacientů; 26% rozdílných výsledků (RQ-PCR=SC vs. FA=KC) => záchyt 70% relapsů pomocí RQ-PCR vs. 30% relapsů podle FA Y-RQ-PCR vs. XY-FISH: 580 vzorků od 134 pacientů; záchyt 36 vs. 12 relapsů
Bai et al. Eur J Haematol. 2006 (31)	11 SNP Y	SYBR Green	100%	0,1%	TaqMan RQ-PCR STR FISH	18 pacientů; kvantifikace na základě kalibrační křivky 0,01–100%

proLékaře.cz | 22.11.2026



Obr. 1. Pacient s chronickou myeloidní leukemií (CML): KC dle FA, zároveň zbytková nemoc (MRD) pomocí detekce fúzního genu bcr/abl pozitivní. Ve všech takových odběrech byl pomocí RQ-PCR retrospektivně potvrzen mikrochimérismus. Obdobný fenomén byl pozorován u dalších 9 CML pacientů. *Legenda: G = Glivec, DLI = infuze dárcovských lymfocytů*



Obr. 2. Pacient s akutní myeloidní leukemií, vykazujícím dlouhodobě KC dle FA, den +693 náhle SC 1–2 %. Retrospektivní analýza předchozích odběrů pomocí citlivější metody RQ-PCR odhalilo signifikantní přítomnost autologní krvetvorby již v den +583 (SC 0,1 %) a v den +632 – nárůst na SC 0,3 %. Relaps onemocnění byl tedy metodou RQ-PCR zachycen o 110 dní dříve.

ních cyklů (95 °C/20 s a 60 °C/60 s). Jako referenční gen sloužil albumin (32). Treshold analýzy reakce byl standardně nastaven na 0,005 a výpočet podílu minoritní DNA byl proveden podle výše uvedeného vzorce.

Do září 2005 výhradně používaná metoda FA byla postupně nahrazována nejprve u pacientů, kde podíl vlastní krvetvorby vycházel menší než jedno procento. Dále u těch, kteří měli pozitivitu na minimální zbytkovou nemoc (MRD), ale vykazovali přitom kompletní chimérismus (KC). Retrospektivní analýza těchto vzorků metodou RQ-PCR opakovaně potvrdila mikrochimérismus (obr. 1).

Rovněž retrospektivní RQ-PCR analýza vzorků pacientů s akutní myeloidní leukemií (AML), předcházejích náhlému znovuobjevení se autologní krvetvorby, odhalila smíšený chimérismus (SC) i u těch odběrů, pomocí FA již klasifikovaných jako KC (obr. 2).

Přechod na RQ-PCR se dosud uskutečnil u 82 našich pacientů, z toho 24 tvoří skupina, u které detekujeme pohlavně specifický marker. Informativní polymorfismus nebyl nalezen u čtyř z 62 genotypizovaných pacientů (6,5 %).

Jak již bylo řečeno, metoda RQ-PCR nemůže zcela nahradit metodu FA. U nově transplantovaných pacientů začínáme s analýzou chimérismu pomocí FA, a teprve když u nich podíl autologní krvetvorby klesne pod jedno procento, přecházíme na RQ-PCR. Pokud přetrvává SC na vyšší úrovni, je u daného pacienta používána metoda FA s fluorescenční detekcí i dále.

Vzhledem k výše zmíněné variabilitě mezi jednotlivými PCR reakcemi se nám, u vzorků se SC, osvědčilo provádět současně s novým odběrem analýzu chimérismu i u odběru předcházejícího. Pokud se pak takovýto kontrolní výsledek liší od výsledku vydaného, je tento „rozpor“ zohledněn či komentován při klasifikaci chiméris-

proLékaře.cz | 22.11.2026

mu nového odběru. V tomto ohledu se jeví výhodnější vydávat výsledek SC v určitém intervalu, získaného výpočtem více rovnic (nejlépe z různých polymorfismů) u FA, respektive amplifikací vzorků ve dvou paralelách u RQ-PCR.

Výsledky pod mezí stanovitelnosti, ale v rámci meze detekce (bez udání exaktní hodnoty), jsou pak vydávány intervalem SC < 1 % respektive SC < 1 % u FA resp. SC < 0,1 % respektive SC < 0,1 % u RQ-PCR. U výsledku KC je vhodné vždy použitou metodu uvést.

Diskuse

Znovuobjevení se autologní krvetvorby či nárůst smíšeného chimérismu zpravidla souvisí s vyšším výskytem relapsu onemocnění, jež patří mezi časté příčiny selhání transplantace krvetvorných buněk a to především u akutních leukemií (pro přehled viz např. 4, v rámci naší republiky práce 33–35). Prediktivní význam samotného SC zůstává nicméně nadále nejednoznačný (36–37). Jinými slovy, není možné stanovit obecně platnou hladinu SC, jejíž dosažení by pro všechny pacienty znamenalo vyšší riziko relapsu (12). Pokud navíc uvažujeme o významu mikrochimérismu, stane se situace jenom komplikovanější. Řada prací však už nyní jasně ukazuje, že aplikace citlivější metody, kterou RQ-PCR představuje, umožňuje zachycení signifikantně většího množství relapsů, než pomocí FA, případně jiných, běžně používaných metod. Jiménez-Velasco a kol. pomocí RQ-PCR, ve srovnání s FA VNTR oblastí, zachytili signifikantně větší množství relapsů (88,2 vs. 44,4 %), s mediánem předpovědi 58 dní (21). Obdobné výsledky byly publikovány i při srovnání RQ-PCR a STR či FISH (8–11, 13–14) – viz tabulka 1. Naše první výsledky ukazují totéž – analýza vzorků pomocí metody RQ-PCR odhalila SC dříve, než bylo znovuobjevení autologní krvetvorby před relapsem zaznamenáno metodou FA s fluorescenční detekcí (viz také obr. 2).

Použití RQ-PCR dále umožnilo objasnění situace u MRD pozitivních pacientů s KC. Ve všech těchto případech bylo potvrzeno, že tato diskrepance je zapříčiněna pouze horší mezí detekce původně použité metody.

Naproti tomu v případech, kdy vychází SC, avšak pacient je MRD negativní, pochází autologní populace z nemaligního klonu, u myeloidních leukemií tedy z lymfocytární řady (38–40). Zdá se tedy, že stanovení chimérismu pomocí RQ-PCR, zvláště v kombinaci s analýzou v jednotlivých buněčných liniích krve, může být použita k monitorování MRD u těch pacientů, kde jiný molekulární marker (např. fúzní gen) není k dispozici (41).

Závěr

Mezí detekce metoda RQ-PCR velmi přispívá k časnému odhalení relapsu u pacientů transplantovaných pro malignity krevních buněk, a umožňuje tak včasnou klinickou intervenci. Klinický význam absolutních hodnot chimérismu, a zvláště pak mikrochimérismu, však musí být dále hodnocen.

Literatura

1. **Thomas ED.** Bone marrow transplantation: a review. Semin Hematol 1999; 36: 95–103.
2. **Antin JH, Childs R, Filipovich AH, et al.** Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2001; 7: 473–485.
3. **Thiede C, Bornhäuser M, Ehninger G.** Strategies and clinical implications of chimerism diagnostics after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Acta Haematol 2004; 112: 16–23.
4. **Bader P, Niethammer D, Willasch A, Kreyenberg H, Klingebiel T.** How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? Bone Marrow Transplant 2005; 35: 107–119.
5. **Horký O, Dvořáková D, Mayer J.** Kvantitativní analýza chimerismu po alogenní transplantaci hematopoetických buněk. Trans Hemat dnes 2004; 10: 70–75.
6. **Lion T.** Summary: Reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. Leukemia 2003; 17: 252–254.
7. **Alizadeh M, Bernard M, Danic B, et al.** Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. Blood 2002; 99: 4618–4625.
8. **Elmaagacli AH, Hlinka M, Steckel NC, Beelen DW.** A new sensitive quantitative real-time PCR method for chimerism analyses can help to identify patients at high risk for leukemic relapse after allogeneic stem cell transplant earlier than STR-PCR chimerism analyses. Bone Marrow Transplant 2003; S123
9. **Thiede C, Kellermann T, Schwerdtfeger R, et al.** Real-time PCR for the SRY-gene allows sensitive and quantitative chimerism analysis after allogeneic blood stem cell transplantation: clinical results in 43 patients. Bone Marrow Transplant 2003; 31: S31.
10. **Uzunel M, Sundin U, Mattsson J, Schaffer M, Hauzenberger D, Ringden O.** Sensitive and quantitative chimerism analysis in ALL patients with real-time PCR. Bone Marrow Transplant 2004; 33: S101.
11. **Baak U, Marinets O, Rieger O, et al.** Real-time quantitative Y chromosome specific PCR vs. XY-FISH vs. fluorescent STR-PCR for chimerism analysis after allogeneic sex-mismatched PBSCT. ASH Annnual Meeting Abstracts 2004; 104: 5047
12. **Jiménez-Velasco A, Barrios M, Román-Gómez J, et al.** Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null aleles and insertion/deletion polymorphisms. Leukemia 2005; 19: 336–343.
13. **Kroger N, Zagrivnaja M, Schwartz S, et al.** Kinetics of plasma-cell chimerism after allogeneic stem cell transplantation by highly sensitive real-time PCR based on sequence polymorphism and its value to quantify minimal residual disease in patients with multiple myeloma. Exp Hematol 2006; 34: 688–694.
14. **Koldehoff M, Steckel NK, Hlinka M, Beelen DW, Elmaagacli AH.** Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real time polymerase chain reaction with single nucleotide polymorphism, standard tandem repeats, and Y chromosome-specific sequences. Am J Hematol 2006; 81: 735–746.

proLékaře.cz | 22.11.2026

15. **Oliver DH, Thompson RE, Griffin CA, Eshleman JR.** Use of single nucleotide polymorphisms (SNP) and real-time polymerase chain reaction for bone marrow engraftment analysis. J Mol Diagn 2000; 2: 202–208.
16. **Sachidanandam R, Weissman D, Schmidt SC, et al.** A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. Nature 2001; 409: 928–933.
17. **Fehse B, Chukhlovin A, Kuhlcke K, et al.** Real-time quantitative Y chromosome-specific PCR (QYCS-PCR) for monitoring hematopoietic chimerism after sex-mismatched allogeneic stem cell transplantation. J Hematother Stem Cell Res 2001; 10: 419–425.
18. **Wilhelm J, Reuter H, Tews B, Pingoud A, Hahn M.** Detection and quantification of insertion/deletion variations by allele-specific real-time PCR: application for genotyping and chimerism analysis. Biol Chem 2002; 383: 1423–1433.
19. **Naparstek E, Vainas O, Eshel R.** Real-time PCR SNP assay for monitoring chimerism after allogeneic stem cell transplantation. Blood 2003; 102: Abstract 5460.
20. **Maas F, Schaap N, Kolen S, et al.** Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. Leukemia 2003; 17: 621–629.
21. **Lucas KG, Sun Q, Chorney K, Erickson T, Nelson JL.** Microchimerism detection by HLA-specific real-time polymerase chain reaction analysis in recipients of allogeneic Epstein Barr virus specific cytotoxic T lymphocytes. ASH Annual Meeting Abstracts 2004; 104: 2648.
22. **Rabascio C, Raia V, Muratori E, et al.** Quantitative PCR for chimerism kinetics in non-myeloablative allo-transplants. Bone Marrow Transplant 2005; R1181.
23. **Buno I, Barrios M, Navarro G, et al.** A methodological algorithm for chimerism quantification after stem cell transplantation. Bone Marrow Transplant 2005; P598.
24. **Jiménez-Velasco A, Barrios M, Roman-Gomez J, et al.** Differential prognostic significance of bone marrow and peripheral blood mixed chimerism determined by real-time quantitative PCR after SCT in patients with acute leukemia. Bone Marrow Transplant 2005; P599.
25. **Harries LW, Wickham CL, Evans JC, Rule SA, Joyner MV, Ellard S.** Analysis of haematopoietic chimerism by quantitative real-time polymerase chain reaction. Bone Marrow Transplant 2005; 35: 283–290.
26. **Masmas TN, Madsen HO, Petersen SL, et al.** Evaluation and automation of hematopoietic chimerism analysis based on real-time quantitative polymerase chain reaction. Biol Blood Marrow Transplant 2005; 11: 558–566.
27. **Masmas TN, Petersen SL, Madsen HO, et al.** Kinetics of early donor chimerism after nonmyeloablative haematopoietic stem cell transplantation monitored with high-resolution real time quantitative PCR. ASH Annual Meeting Abstracts 2005; 106: 3669.
28. **Halaburda K, Guz K, Orzinska A, et al.** Real-time PCR for early chimerism evaluation in peripheral blood mononuclear cells of allogeneic stem cell recipients: potential value for prediction of acute graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant 2006; 37: S95.
29. **Picardi A, Spagnoli A, Cordone I, et al.** Reliable quantification of haematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation by real-time quantitative PCR analysis. Bone Marrow Transplant 2006; 37: S322.
30. **Eshel R, Vainas O, Shpringer M, Naparstek E.** Highly sensitive patient-specific real-time PCR SNP assay for chimerism monitoring after allogeneic stem cell transplantation. Lab Hematol 2006; 12: 39–46.
31. **Bai L, Deng YM, Dodds AJ, Milliken S, Moore J, Ma DD.** A SYBR green-based real-time PCR method for detection of haemopoietic chimerism in allogeneic haemopoietic stem cell transplant recipients. Eur J Haematol 2006; 77: 425–431.
32. **Chiu RW, Murphy MF, Fidler C, Zee BC, Wainscoat JS, Lo YM.** Determination of RhD zygosity: comparison of a double amplification refractory mutation system approach and a multiplex real-time quantitative PCR approach. Clin Chem 2001; 47: 667–672.
33. **Formánková R, Sedláček P, Kršková L, Říhová H, Šrámková L, Starý J.** Chimerism-directed adoptive immunotherapy in prevention and treatment of post-transplant relapse of leukemia in childhood. Haematologica 2003; 88: 117–118.
34. **Formánková R, Honzátková L, Sieglová Z, Starý J, Sedláček P, Brdička R.** Detailed monitoring of hematopoietic chimerism in a child treated by adoptive immunotherapy for high risk of relapse after BMT for acute myeloid leukemia. Bone Marrow Transplant 2000; 25: 453–456.
35. **Formánková R, Honzátková L, Moravcová J, Sieglová Z, Dvořáková R, Nádvorníková S., Vítek A, Lukášová M, Starý J, Brdička R.** Prediction and reversion of post-transplant relapse in patients with chronic myeloid leukemia using mixed chimerism and residual disease detection and adoptive immunotherapy. Leuk Res 2000; 24: 339–347.
36. **Baron F, Sandmaier BM.** Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. Leukemia 2006; 20: 1690–1700.
37. **Khan F, Agarwal A, Agarwal S.** Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. Bone Marrow Transplant 2004; 34: 1–12.
38. **Serrano J, Roman J, Sanchez J, et al.** Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. Blood 2000; 95: 2659–2665.
39. **Roman J, Alvarez MA, Torres A.** Molecular basis for therapeutic decisions in chronic myeloid leukemia patients after allogeneic bone marrow transplantation. Haematologica 2000; 85: 1072–1082.
40. **Horký O, Mayer J, Borský M, Pospíšilová J, Krejčí M, Dvořáková D.** Dynamics of lineage-specific chimerism in patients after non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. Haematologica 2006; 91(S1): 304.
41. **Elmaagacli AH.** Real-time PCR for monitoring minimal residual disease and chimerism in patients after allogeneic transplantation. Int J Hematol 2002; Suppl. 2: 204–205.

Mgr. Ondřej Horký
Centrum molekulární biologie a genové terapie, IHOK, FN Brno
Černopolní 9
625 00 Brno

Došlo do redakce: 23. 11. 2006
Přijato: 12. 3. 2007