

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2023.01.13

· 临床研究 ·

抗 CD38 单抗治疗多发性骨髓瘤的抗体鉴定策略*

邹昕¹, 范小杰², 虞茜¹, 许飞¹, 杨红梅¹(1.常州市中心血站输血研究室, 江苏常州 213004; 2.常州市第一人民医院检验科, 江苏常州 213004)

摘要:目的 分析经抗 CD38 单抗治疗的多发性骨髓瘤患者的抗体并探索鉴定策略。方法 选取 2019 年 11 月至 2021 年 6 月用抗 CD38 单抗治疗且配血不合的 30 例多发性骨髓瘤患者作为研究对象。用 0.2 mol/L 二硫苏糖醇 (DTT) 处理的谱细胞对患者血清标本进行抗体特异性鉴定; 对有自身抗体的患者用血清倍比稀释法鉴别同种抗体及自身抗体; 于第 1、7、14、28、35 天监测 DTT 处理后的红细胞在生理盐水和血型分析用稀释液中的游离血红蛋白浓度。结果 用 DTT 处理的谱细胞鉴定发现, 24 例均为阴性; 1 例检出抗 E 同种抗体合并自身抗体; 5 例检出自身抗体。利用倍比稀释法确认, 4 例自身抗体没有特异性, 1 例检出类抗 C 自身抗体。生理盐水组与血型分析用稀释液组游离血红蛋白浓度随贮存时间延长不断上升, 两组差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 经抗 CD38 单抗治疗的多发性骨髓瘤患者, 建议用 DTT 处理的谱细胞合并血清倍比稀释法快速初步鉴别同种抗体、自身抗体以及 CD38 单抗干扰; 血型分析用稀释液可以用于保存 DTT 处理的谱细胞。

关键词: 抗 CD38 单抗; 自身抗体; 二硫苏糖醇; 同种抗体

中图分类号: R446

文献标志码: A

Strategies for identification of antibody in multiple myeloma patients treated with anti-CD38 MoAb

ZOU Xin¹, FAN Xiaojie², YU Xi¹, XU Fei¹, YANG Hongmei¹(1. Transfusion Research Laboratory, Changzhou Blood Center, Changzhou 213004, Jiangsu; 2. Department of Clinical Laboratory, Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213004, Jiangsu, China)

Abstract: Objective To analyze the antibodies in the multiple myeloma patients treated with anti-CD38 MoAb antibodies and explore the strategies for identification of antibodies. **Methods** A total of 30 patients with multiple myeloma who were treated with anti-CD38 MoAb and exhibited crossmatching incompatibility from November 2019 to June 2021 were selected as the study subjects. 0.2 mol/L dithiothreitol (DTT)-treated profiling cells were used to identify the specificity of various antibodies in the studied serum samples. The serum of the patients with autoantibodies were identified by multiple dilution method. The concentrations of free hemoglobin in normal saline and diluent for blood group analysis were monitored on the day 1, 7, 14, 28 and 35. **Results** The identification for profiling cells treated with DTT revealed that none was detected as positive antibodies in the 24 cases. Anti-E alloantibodies combined with autoantibodies were detectable in 1 case. Autoantibodies were detectable in 5 cases who were conformed by diluted serum. Among them, 4 cases showed no antibody-related specificity, and one mimicked the specificity of anti-C antibody. The concentrations of free hemoglobin in both saline group and diluent group showed increased trend with the prolongation of storage time, but the difference between the two groups showed statistically significant. **Conclusion** DTT-treated spectrum cells combined with serum dilution method can be used to identify the alloantibodies, autoantibodies quickly and easily in the multiple myeloma patients who were treated with anti-CD38 MoAb. The diluents for blood group analysis can be used to preserve the DTT-treated spectrum cells.

Key words: anti-CD38 MoAb; autoantibodies; dithiothreitol; alloantibody

多发性骨髓瘤 (multiple myeloma, MM) 是一种浆细胞恶性增殖性疾病, 发病率在血液系统肿瘤中排第 2 位^[1]。达雷妥尤 (Daratumumab, Dara) 是人源抗 CD38 抗体, 是 MM 治疗领域中第一种显示了单药临床活性的抗体^[2-3]。CD38 抗原在红细胞上也有一定量的表达, 该类药物会干扰间接抗人球蛋白试验 (indirect antiglobulin test, IAT) 结果, 引起抗

体筛查泛凝集, 掩盖自身抗体和同种抗体, 同时 MM 患者血清中也常出现蛋白质凝集干扰, 多重因素影响使实验室检测抗体及输血相容性试验复杂化, 出现真假阳性等, 导致输血困难^[3-4]。国内外推荐用二硫苏糖醇 (DL-dithiothreitol, DTT) 处理细胞并用凝聚胺法对此类患者进行抗体鉴定。本研究结合实际, 探索 DTT 处理谱细胞合并血清倍比稀释

* 基金项目: 常州市青年科技人才项目 (QN202133); 常州市中心血站科研基金 (XZ202107); 常州市科技局项目 (CJ20220240)。

作者简介: 邹昕, 1982 年生, 女, 主管技师, 硕士, 主要从事输血研究; 范小杰, 1983 年生, 男, 主管技师, 大学本科, 主要从事临床免疫检验研究; 二者对该文具有同等贡献, 同为第一作者。

通信作者: 杨红梅, 副主任技师, 主要从事输血研究, E-mail: yhmei83@126.com。

法对经抗 CD38 单抗治疗的 MM 患者血清中同种抗体、自身抗体和单抗的鉴别过程,并提出抗体鉴定策略。

1 材料与方法

1.1 标本来源 收集 2019 年 11 月至 2021 年 6 月用抗 CD38 单抗治疗且因配血不合送我站鉴定抗体的 30 例 MM 患者标本,其中男 17 例,女 13 例,年龄 67~91 岁,8 例患者有输血史(8/30,26.7%)。

1.2 主要仪器与试剂 血清学专用离心机(日本久保田公司);F4040 半自动生化分析仪及血浆游离血红蛋白测定试剂盒(北京瑞尔达公司);孵育器、卡式离心机及微柱凝胶卡(长春博迅公司);单克隆抗 A/抗 B、抗 D、抗 C、抗 E、抗 c、抗 e、直接抗人球蛋白试剂(多特异性、抗 IgG、抗 C3d)、血型分析用稀释液(上海血液生物公司);DTT、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)(美国 Sigma 公司);抗体筛选红细胞(下文简称“抗筛细胞”,德国 CE 公司);谱细胞(荷兰 Sanquin 公司);抗 M、抗 E 抗体来自本科室既往抗筛阳性献血者血清。试剂均在有效期内。

1.3 直接抗人球蛋白试验 取少许红细胞用生理盐水洗涤 3 次,配成 3%浓度的红细胞悬液待用,将 50 μ L 多特异性、抗 IgG 及抗 C3d 试剂分别加入标记好的试管中,再加入 50 μ L 待检红细胞悬液,混匀,盐水管为阴性对照,1 000 \times g 离心 15 s 观察结果,判断是否有凝集或溶血。

1.4 DTT 处理抗筛细胞和谱细胞效果评估 参照 Chapuy 等^[5] 配制 0.2 mol/L DTT。用 0.2 mol/L DTT 处理抗筛细胞(3 组)和谱细胞(16 组),具体实验方法参照《AABB 技术手册》(第 18 版)。

用经鉴定分别含有 IgM 抗 M 抗体(效价为 8)和 IgG 抗 E 抗体(效价为 16)的献血者血清对 DTT 处理的细胞进行效果评估。根据同种抗体的特异性,选取 MNSs 表型(MM)和 Rh 表型(EE)的抗筛细胞,用盐水法、IAT 法测定抗 M 和抗 E 效价。

根据 Lally 等^[6] 文献和细胞溶血程度对处理后的谱细胞测定 3 次效价,于 DTT 处理的第 1、10、20 天测定抗体效价。

用评估后的谱细胞对 30 例患者血清进行抗体鉴定实验。

1.5 血清倍比稀释法 对有自身抗体的标本进行

倍比稀释^[7],将患者血清按照 1:2、1:4、1:8、1:16、1:32 倍比稀释后进行抗体筛选试验,若血清与抗筛细胞凝集强度等比例一致下降,直至凝集强度为阴性,则不必进行抗体鉴定;若某一稀释倍数下,抗体筛选出现反应格局,以该稀释倍数用谱细胞进行抗体特异性鉴定。

1.6 游离血红蛋白浓度监测 DTT 处理后谱细胞(16 组)各分成 2 份,一份保存于生理盐水(A 组),另一份保存于血型分析用稀释液(B 组)。每天观察上清液颜色,参照 Lorenzen 等^[8] 用邻甲联苯胺法于第 1、7、14、28、35 天监测上清液游离血红蛋白浓度含量,具体方法参考试剂说明书。

1.7 统计学分析 用 SPSS 16.0 统计软件进行。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用配对 *t* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 直接抗人球蛋白试验 30 例患者中多克隆抗体试验阳性 6 例(6/30,20%),抗 IgG 阳性 5 例(5/30,16.7%),抗 C3d 阳性 3 例(3/30,10%)。血清中有蛋白质凝集干扰者 7 例(7/30,23.3%)。

2.2 DTT 处理抗筛细胞和谱细胞效果评估 DTT 处理抗筛细胞前后测定的抗 M 和抗 E 效价见表 1,处理后第一、二次抗体效价没有改变,第三次效价略有降低。

表 1 DTT 处理抗筛细胞前后测定的抗 M 和抗 E 抗体效价

处理因素	盐水法检测抗 M 效价	IAT 检测抗 E 效价
处理前	8	16
处理后	8	16
处理后 10 天	8	16
处理后 20 天	4	8

DTT 处理谱细胞前后对经抗 CD38 单抗治疗的 MM 患者的血清抗体鉴定格局结果见表 2。第 1~24 例用 DTT 处理后的谱细胞检测结果均为阴性。第 25 例用 DTT 处理后的谱细胞鉴定为可疑抗 E 合并自身抗体,凝聚胺试验进一步验证此结果。而第 26~30 例病例用 DTT 处理后的谱细胞鉴定结果仍为泛反应,且自身对照均阳性。对患者自身红细胞进行 DTT 处理,排除 CD38 抗原干扰。DTT 处理后的谱细胞和自身对照 IAT 结果仍然是阳性,且凝集强度增强,实验证明标本有自身抗体,且不排除有同种抗体存在。

表 2 30 例 MM 患者抗体鉴定结果

16 号 谱细胞	1~24 例患者			第 25 例患者			第 26~30 例患者		
	IAT ^a	IAT ^b	Poly ^a	IA ^a	IAT ^b	Poly ^a	IAT ^a	IAT ^b	Poly ^a
1	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
2	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
3	1+ ^s	0	0	1+ ^s	2+	3+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
4	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
5	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
6	1+ ^s	0	0	1+ ^s	2+	3+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
7	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
8	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
9	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
10	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
11	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+	2+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
12	1+ ^s	0	0	1+ ^s	2+	3+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
13	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
14	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
15	1+ ^s	0	0	1+ ^s	2+	2+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
16	1+ ^s	0	0	1+ ^s	1+ ^w	1+	2+ ^s	2+~4+	0~2+
自身	0	—	0	2+	2+	1+	3+	2+~3+	2+

注:a:未处理的细胞;b:处理后的细胞;Poly,凝聚胶法;s,强;w,弱。

2.3 血清倍比稀释法 用血清倍比稀释法对有自身抗体的标本进行抗体筛选和鉴定,结果见表 3 和表 4。第 26~29 例随着稀释度增加抗体凝集强度减弱,稀释至凝集强度为阴性的倍数为 4 至 128 倍

不等,自身抗体无特异性。第 25 例标本稀释至 2 倍,检出抗 E 合并自身抗体。第 30 例标本稀释至 32 倍,抗体鉴定结果符合抗 C 格局,患者自身抗原检测为 CCee,遂认为检出类抗 C 自身抗体。

表 3 血清倍比稀释后抗体筛查结果(IAT)

项目	C 抗原	E 抗原	第 25 例		第 30 例			
			原液	稀释 2 倍	原液	稀释 2~8 倍	稀释 16 倍	稀释 32 倍
I	+	0	1+	0	3+	3+	3+	2+
II	0	+	2+	2+	3+	3+	1+	0
III	0	0	1+	0	3+	3+	1+	0
自身细胞	—	—	2+	—	4+	—	—	—

注:I、II、III为 DTT 处理的抗筛细胞(批号:702013)。

表 4 血清抗体稀释鉴定结果(IAT)

项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
C 抗原*	+	+	0	0	+	0	0	0	0	0	+	w	+	+	0	+
E 抗原*	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0	+	+	0	0	+	0
第 25 例(稀释 2 倍)	0	0	2+	0	0	2+	0	0	0	0	1+	2+	0	0	2+	0
第 30 例(稀释 32 倍)	2+	1+	0	0	1+	0	0	0	0	0	2+	1+	2+	2+	0	2+

备注:DTT 处理的谱细胞(批号:8000451970);*, C/E 抗原的鉴定格局表。

2.4 游离血红蛋白浓度 DTT 处理后的谱细胞在生理盐水(A 组)和血型分析用稀释液(B 组)中上清液游离血红蛋白浓度水平见表 5。A 组谱细胞第 2 天开始溶血,第 7 天几乎完全溶血。B 组谱细胞

第 10 天肉眼观察开始略有溶血现象,但直至保存后期基本不变。从保存的第 7 天开始,A 组上清液的游离血红蛋白浓度上升,与 B 组相比差异有统计学意义(P<0.05)。

表 5 A、B 组游离血红蛋白浓度检测结果(g/L)

组别	n	第 1 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天	第 35 天
A	16	0.263±0.168	1.843±0.168	2.265±0.315	3.165±0.428	3.255±0.531
B	16	0.123±0.068	0.163±0.098	0.398±0.088	0.824±0.128	0.967±0.168
t(P)值		0.63(>0.05)	4.14(<0.05)	4.54(<0.05)	4.18(<0.05)	3.76(<0.05)

3 讨论

经抗 CD38 单抗治疗的 MM 患者在配血时常会引起 IAT 实验泛反应^[9-10], 自身抗体和同种抗体常常被掩盖和忽略。国内外推荐用 DTT 处理细胞, 用凝聚胺法进行抗体鉴定、交叉配血。本实验用 0.2 mol/L DTT 预先处理谱细胞, 通常用 K⁺ 和 E⁺ 红细胞作为巯基试剂处理的对照细胞, 本实验室没有抗 K 试剂, 所以选择具有代表性的 IgM 型抗 M 和 IgG 型抗 E 评估 DTT 处理谱细胞的效果, 用 0.2 mol/L DTT 处理后的谱细胞能特异性检出抗 M、抗 E 抗体, 实验证明红细胞上的 M 和 E 抗原未受影响, 结果与文献一致^[11-12]。通过对保存液中上清液游离血红蛋白浓度的监测, 证实 DTT 处理的谱细胞在血型分析用稀释液中保存更佳, 但后期红细胞抗原略有下降^[13]。本实验证实 DTT 能够消除抗 CD38 单抗的影响, 鉴定出同种抗体和自身抗体。对有自身抗体的标本进一步研究发现, DTT 处理后抗筛 IAT 凝集强度增加, 且这些病例特点是无输血史, 自身对照阳性, 凝聚胺法结果不定, 血清中可能有自身抗体。当 CD38 单抗与自身抗体竞争而优先结合于红细胞对应抗原上, 谱细胞鉴定结果显示弱阳性, 而 DTT 破坏了红细胞上的 CD38 抗原, 自身抗体与谱细胞广泛结合, 凝集强度增强^[14]。那如何区分这部分自身抗体呢? 传统自身抗体吸收法既费时又费力, 其次该类患者血清中单抗药物干扰, 可能会影响吸收放散的效果。鉴于自身抗体大多高亲和力低效价, 根据文献^[15-16], 本研究尝试采用血清倍比稀释法对抗体进行快速鉴定, 前 4 例在稀释的过程中, 谱细胞的凝集强度一致减弱, 证明自身抗体无特异性。第 30 例患者自身抗体很强, 当血清稀释至 32 倍时发现患者有抗 C 抗体, 根据患者自身 Rh 分型 CCee, 无输血史, 认为该抗体可能为类抗 C 自身抗体, 随后避开该抗原输血治疗, 贫血症状得到改善。该稀释法的不足之处是只有当同种抗体或特异性抗体强于自身抗体时, 该方法有效。在时间允许的前提下可以结合自体或异体吸收技术排除自身抗体以及基因型配合输注从而避免产生同种异体免疫反应。

4 参考文献

[1] Kumar SK, Callander NS, Hillengass J, *et al.* NCCN guidelines insights: multiple myeloma, version 1.2020 [J]. *J Natl Compr Canc*

- Netw*, 2019, 17(10): 1154-1165.
- [2] Barwick BG, Gupta VA, Vertino PM, *et al.* Cell of origin and genetic alterations in the pathogenesis of multiple myeloma [J]. *Front Immunol*, 2019, 10: 1121.
- [3] 刘进, 何海燕, 李璐, 等. 达雷妥尤单抗治疗复发/难治多发性骨髓瘤的疗效与安全性 [J]. *中华血液学杂志*, 2021, 42(1): 27-32.
- [4] 胡佳, 张秀莲. 达雷木单抗治疗多发性骨髓瘤的研究进展 [J]. *肿瘤研究与临床*, 2020, 32(11): 807-809.
- [5] Chapuy CI, Aguad MD, Nicholson RT, *et al.* International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing [J]. *Transfusion*, 2016, 56(12): 2964-2972.
- [6] Lally K, Hayes C, His R, *et al.* Extended use of DTT-treated reagent red cells in the era of anti-CD38 therapy [C]. *AABB Annual Meeting*, 2016, 56(S4): 136A.
- [7] 刘凤霞, 黄蓉, 王勇军, 等. 自身抗体干扰输血相容性检测处理对策 [J]. *中国输血杂志*, 2021, 34(8): 803-808.
- [8] Lorenzen H, Lone AN, Nielsen M, *et al.* Thirty-three-day storage of dithiothreitol-treated red blood cells used to eliminate daratumumab interference in serological testing [J]. *Vox Sang*, 2018, 113(7): 686-693.
- [9] 李伟超, 程道胜. CD38 单抗治疗多发性骨髓瘤的配血策略 [J]. *临床输血与检验*, 2020, 22(6): 624-627.
- [10] 邵林楠, 于卫建, 周世航. 单克隆抗-CD38 抗体对红细胞血型血清学检测的干扰及解决方法现状 [J]. *临床输血与检验*, 2020, 22(6): 653-659.
- [11] 邵林楠, 张树婷, 王霓, 等. 三种试剂对红细胞表面 CD38 抗原去除效果的研究 [J]. *临床输血与检验*, 2021, 23(1): 65-67.
- [12] 马玲, 刘太香, 郑凌, 等. 采用二巯苏糖醇消除抗 CD38 单抗干扰血型血清学检测 1 例 [J]. *中国输血杂志*, 2020, 33(10): 1115-1116.
- [13] Hosokawa M, Kashiwagi H, Nakayama K, *et al.* Distinct effects of daratumumab on indirect and direct antiglobulin tests: a new method employing 0.01 mol/L dithiothreitol for negating the daratumumab interference with preserving K antigenicity (*Osaka method*) [J]. *Transfusion*, 2018, 58(12): 3003-3013.
- [14] Sato Y, Shimoda M, Sota Y, *et al.* Enhanced humoral immunity in breast cancer patients with high serum concentration of anti-HER2 autoantibody [J]. *Cancer Med*, 2021, 10(4): 1418-1430.
- [15] 邸艳辉, 白宇, 王新华. 红细胞同种抗体和自身抗体特点及临床应用分析 [J]. *临床血液学杂志*, 2021, 34(2): 130-132.
- [16] 封彦楠, 马春娅, 杨鑫, 等. 类同种自身抗体患者血清学特点及抗体分布回顾性分析 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2021, 29(4): 1301-1307.

(收稿日期: 2021-12-16)

(本文编辑: 王海燕)