

去除 CD38 单抗对输血相容性检测干扰的方法并文献复习

张德峰¹ 孙胜君² 于淑红¹

[摘要] 目的:回顾有关达雷妥尤单抗干扰输血相容性检测的文献,以及规避潜在问题的方法,并寻求为安全的输血实践提供临床和实验室建议。**方法:**采用聚凝胺或二硫苏糖醇(DTT)处理红细胞的方法,进行输血相容性检测。**结果:**聚凝胺或 DTT 处理后的红细胞用于输血相容性检测,不规则抗体筛查及鉴定结果为阴性,交叉配血试验相合。**结论:**聚凝胺或 DTT 处理红细胞的方法可以去除达雷妥尤单抗对输血相容性检测的干扰。

[关键词] CD38;单克隆抗体;输血相容性检测

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2024.08.009

[中图分类号] R457.1 **[文献标志码]** A

Methods of removing interference of CD38 monoclonal antibody in blood transfusion compatibility detection and literature review

ZHANG Defeng¹ SUN Shengjun² YU Shuhong¹

(¹Department of Blood Transfusion, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai, 264000, China;

²Department of Clinical Laboratory, Yangtaishan Hospital)

Corresponding author: YU Shuhong, E-mail: sxkysh@sina.com

Abstract Objective: To review the literatures on Daratumumab interfering the blood transfusion compatibility testing, as well as ways to avoid these potential problems, and seek clinical and laboratory recommendations for the safety of blood transfusion practice. **Methods:** Using the polybrene or dithiothreitol(DTT) to treat red blood cells for blood transfusion compatibility testing. **Results:** Red blood cells treated with polybrene or DTT were used for blood transfusion compatibility testing, results of irregular antibody screening and identification were negative, and cross-matching was compatibility. **Conclusion:** The application of red blood cells treated with polybrene or DTT can remove the interference of Daratumumab in blood transfusion compatibility testing.

Key words CD38; monoclonal antibody; blood transfusion compatibility test

达雷妥尤单抗(Daratumumab, Dara)是一种人源化、抗 CD38 的 IgG1 κ 型小分子单克隆抗体^[1],已广泛应用于多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)的治疗,且具有较好的临床疗效和安全性。由于红细胞表面表达一定水平的 CD38 分子,因此, Dara 可干扰输血相容性检测,主要包括不规则抗体筛查、交叉配血等试验。本文报道 1 例 Dara 对输血相容性检测试验的干扰及应对方案,并进行相关文献复习。

1 资料与方法

1.1 一般资料

患者,女,71 岁,临床诊断为 MM。无输血史,既往妊娠史 G1P1。本次入院注射 Dara 1 000 mg。实验室检查结果显示,血红蛋白 41 g/L,总胆红素 7.8 μ mol/L,不规则抗体筛查试验阳性,交叉配血不合。现临床申请输血治疗,需进一步处理。

1.2 主要仪器与试剂

抗 A、抗 B、抗 D(IgM)单克隆抗体、聚凝胺试

剂、抗人球蛋白(抗 IgG、C3 d)单克隆抗体、反定型细胞、抗体筛选及鉴定细胞购自上海血液生物医药有限责任公司;抗人球蛋白卡购自美国伯乐公司;抗体鉴定谱细胞购自荷兰三昆试剂有限公司;0.2 mol/L 二硫苏糖醇(Dithiothreitol, DTT)试剂由本实验室配制,所有试剂均在有效期内使用。Kubota KA-2200 血清离心机购自日本久保田公司;凝胶卡孵育器及离心机购自美国伯乐公司。

1.3 方法

1.3.1 血型鉴定及直接抗人球蛋白试验 用生理盐水将患者红细胞洗涤 3 次,配制成 3% 的红细胞悬液,试管法检测 ABO/RhD 血型抗原及直接抗人球蛋白试验(direct antiglobulin test, DAT)。

1.3.2 不规则抗体筛查及鉴定、交叉配血 采用盐水法、聚凝胺法和微柱凝胶法。

1.3.3 DTT 处理红细胞 参考文献[2]中 DTT 处理红细胞的方法,3% 红细胞悬液和 0.2 mol/L DTT 以 1:4 的比例,37℃ 孵育 30 min,破坏红细胞上的 CD38 抗原分子,制备 CD38 破坏后的抗体鉴定谱细胞(对照组为无 DTT 的 PBS 组)、3 例献血者红细胞及对照细胞。

¹烟台毓璜顶医院输血科(山东烟台,264000)

²烟台市烟台山医院检验科

通信作者:于淑红, E-mail: sxkysh@sina.com

1.3.4 效价测定 将患者血清倍比稀释,依次将稀释血清加入标记好的试管中,在所有孔中加入等量红细胞悬液(3 号筛选细胞),混匀后取 40 μ L 加入凝胶抗人球蛋白卡中,37℃ 孵育 15 min,用专用离心机离心 10 min 并观察结果。

2 结果

2.1 血型鉴定及 DAT

试管法检测血型为 B 型、RhD 阳性,见表 1。DAT 阴性。

表 1 血型鉴定结果

试剂	Anti-A	Anti-B	Anti-D	Alc	Bc	Oc	自身 c
凝集强度	0	4+	4+	2+	0	0	0

2.2 不规则抗体筛查及鉴定、交叉配血

不规则抗体筛查结果显示盐水、聚凝胺试验阴性,抗人球蛋白卡反应呈现弱的泛凝集,见表 2。抗体鉴定反应特性同不规则抗体筛查结果。与 3 名献血者交叉配血结果显示盐水法、聚凝胺法主侧配血相合;微柱凝胶法主侧 1+,次侧相合。

表 2 不规则抗体筛查结果

抗体筛查	筛选 I	筛选 II	筛选 III	自身 c	对照 c
盐水法	0	0	0	0	0
聚凝胺法	0	0	0	0	1+
柱凝集法	1+s	1+s	1+s	1+s	1+s

2.3 DTT 处理红细胞

处理后的对照细胞(三昆 7 号谱细胞)抗原表型由 e^+K^+ 转为 e^+K^- 。处理后的谱细胞抗体鉴定为阴性,PBS 对照组谱细胞反应均为 1+凝集。患者血清与处理后的献血者红细胞主侧配血相合。

2.4 效价测定

患者血清中 CD38 抗体效价为 4 096(与 3 号抗筛细胞反应)。

3 讨论

CD38 作为 MM 的治疗靶点,识别和介导治疗性抗体作用于骨髓瘤细胞,涉及的作用机制主要有^[3]:①直接的杀伤作用;②通过多种免疫相关机制诱导肿瘤细胞凋亡,包括通过补体依赖的细胞毒性作用、抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用、抗体依赖性细胞吞噬作用、细胞凋亡等;③通过免疫调节作用,增强机体抗肿瘤作用^[4]。

由于红细胞弱表达 CD38,Dara 可能与红细胞上 CD38 结合,通常仅在间接抗球蛋白试验中产生干扰,表现出 1+或较弱的泛凝集反应^[5],如抗体筛选试验和交叉配血试验。在停用 Dara 后,IAT 阳性结果可能持续长达 6 个月^[6]。而 Hu5F9-G4,一种以高亲和力靶向 CD47 的人源化 IgG4 抗体,

在包括立即离心在内的所有测试阶段都会产生干扰,表现为 3+~4+反应性,主要是由于红细胞上 CD47 的表达水平的较高。CD47 作为 Rh 复合体的组成部分^[7],其表达因 Rh 表型不同而不同,但红细胞上 CD38 的表达水平在个体间没有差异。研究发现,Dara 可致患者自身红细胞中 CD38 抗原脱落,而抗 CD47 单抗治疗未观察到 CD47 的损失,这可能是由于红细胞膜中的大部分 CD47 与细胞骨架相连。因抗原丢失,Dara 治疗的患者 DAT 及放散液可为阴性或弱阳性,但 Dara 通常不干扰 ABO/RhD 血型。三期临床试验观察结果显示,伊沙妥昔单抗,一种靶向浆细胞和肿瘤细胞表面 CD38 的 IgG1 型单克隆抗体,对 IAT 的干扰并不普遍。体外试验研究发现,Dara 可以直接识别红细胞表达的 CD38,而伊沙妥昔单抗需要一个辅助因子,如小鼠抗 CD38 抗体(HB-7 或 AT13/5)或 CD38 抑制剂。研究表明体外情况下,伊沙妥昔单抗所识别的红细胞上的表位是被掩盖的^[8],这可能是 Dara 和伊沙妥昔单抗对 IAT 干扰的差异的原因。

随着 CD38 单抗药物广泛应用于临床治疗^[9],输血前检验中的单克隆抗体干扰可能会变得更加普遍,进一步使血清学研究复杂化。临床上重要的红细胞同种抗体可能被 Dara 掩盖,导致急性或迟发性溶血性输血反应。因此,探索去除药物干扰的简便有效的解决方案,对保证安全输血具有重要的意义。目前,用于消除 Dara 在输血前检验中干扰的方法主要分为四类^[10]:①CD38 抗原缺乏、减少或被破坏的红细胞用于输血前检验^[11],如 DTT 处理红细胞;②阻断试剂红细胞和献血者红细胞上的 CD38 抗原,如 DARAEx[®],其主要成分为不含人 Fc 区的抗 CD38 抗体^[12],处理红细胞时,该抗体结合 CD38 并覆盖抗原表位,抑制 Dara 的凝集作用。DARAEx[®]最初仅适用于 Bio-rad 凝胶卡(CA, USA),改进的 DARAEx[®]方案也可用于 Grifols Engineering 的 Grifols DG 凝胶卡;③IAT 试验前中和患者血浆中抗 CD38 抗体,如抗独特型抗体,其对 Dara 的 Fab 具有高度特异性,不会识别 isat-uximab 等其他抗 CD38 单克隆抗体的 Fab。另外,有研究通过将人类 CD38 表达盒稳定转导入 MEL-745A 细胞,在强启动子作用下,细胞表面 CD38 分子高表达。对 CD38 高表达细胞进行亚克隆,从而得到 Darasorb 细胞^[13]。研究显示 Darasorb 细胞约 49 万份 CD38 拷贝,而每个红细胞约 100 个 CD38 分子。因此,构建的 Darasorb 细胞表面 CD38 分子表达量约是红细胞表量的 5 000 倍,可有效地吸收血浆中的游离 Dara。研究也启示了 Darasorb 细胞和其他药物抗体的吸收细胞可以成为免疫血液学实验室的有用补充,而且针对高频抗原抗体的吸收细胞可以类似地获得;④扩展患者抗原分型与献血者红细胞表型匹配。单抗药物靶向治疗后,可能出现一定程度的贫血或血小板减少,

反而增加了患者的重复输血,这使得在开始治疗前必须扩展表型/基因分型和抗体筛查,同时考虑扩展匹配的红细胞用于输血,特别是经常需要输血支持的患者^[14-16]。

本试验结果显示:Dara 在抗人球蛋白介质中干扰患者不规则抗体筛查及交叉配血的结果,而在盐水、聚凝胺介质中不受影响。CD38 分子结构上为单链跨膜糖蛋白,包括 N 端的胞质尾,单次跨膜域和带有羧基的胞外端^[17]。聚凝胺是一种多聚阳离子聚合物,可与红细胞表面带负电荷的分子结合。CD38 分子在胞外携带负电荷的羧基,极易与凝聚胺分子结合,进而干扰 CD38 分子与 CD38 单抗的结合,这可能是聚凝胺试验不被影响的原因。DTT 处理红细胞也是一种有效的、常用的消除 Dara 干扰的方法,已经在输血实验室中常规应用^[18]。红细胞表面的 CD38 分子胞外结构有 6 个二硫键,对还原剂 DTT 的变性反应十分敏感,DTT 处理可以水解红细胞表面 CD38 分子的三级结构,从而破坏 CD38 分子与 Dara 的结合,并消除其对间接抗人球蛋白试验的干扰^[19-20]。需注意的是,DTT 可破坏红细胞上 Kell、LW、Lutheran 等血型系统相关抗原,导致相应抗体的漏检^[21]。

目前,通过在 Dara 治疗前、治疗后采取一系列的检测手段,可以在一定程度上消除干扰作用,但每种方法都存在优缺点,需要不断优化并总结出最适合输血管管理的办法。为了保证临床用血安全以及治疗效果,患者、临床、输血实验室之间密切的沟通,安全输血意识的不断提高则至关重要。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 杜春红,隋委伽.达雷妥尤单抗对输血相容性检测的干扰及应对方案[J].中华医学杂志,2021,101(33):2645-2648.
- [2] 糜坚青,蔡晓红,王少元,等.CD38 单克隆抗体对输血相容性检测干扰及其应对方案的专家共识[J].中国输血杂志,2021,34(4):327-334.
- [3] van de Donk NWCJ, Richardson PG, Malavasi F. CD38 antibodies in multiple myeloma: back to the future[J]. Blood, 2018, 131(1): 13-29.
- [4] 季嘉敏,赵万红.多发性骨髓瘤免疫治疗进展[J].临床血液学杂志,2023,36(9):680-687.
- [5] Du CH, Sui WJ, Huang HT, et al. Effect of clinical application of anti-CD38 and anti-CD47 monoclonal antibodies on blood group detection and transfusion therapy and treatment [J]. Leuk Res, 2022, 122: 106953.
- [6] 宋婕,孔永奎,王书亚,等.去除 CD38 单抗对输血相容性检测干扰的简便方法的建立[J].中国输血杂志,2021,34(9):974-977.
- [7] Velliquette RW, Aeschlimann J, Kirkegaard J, et al. Monoclonal anti-CD47 interference in red cell and platelet testing[J]. Transfusion, 2019, 59(2): 730-737.
- [8] Chami B, Okuda M, Moayeri M, et al. Anti-CD38 monoclonal antibody interference with blood compatibility testing: Differentiating isatuximab and daratumumab via functional epitope mapping[J]. Transfusion, 2022, 62(11): 2334-2348.
- [9] Nedumcheril MT, DeSimone RA, Racine-Brzostek SE, et al. Overcoming drug interference in transfusion testing: a spotlight on daratumumab[J]. J Blood Med, 2021, 12: 327-336.
- [10] 张警丹,李鹏,李强,等.抗 CD38 单克隆抗体对多发性骨髓瘤患者交叉配血干扰及输血疗效的影响[J].临床血液学杂志,2022,35(8):539-542.
- [11] Li YY, Li CY, Zhang L, et al. Long-term storage protocol of reagent red blood cells treated with 0.01M dithiothreitol (DTT) for pre-transfusion testing of patients receiving anti-CD38 therapy, daratumumab[J]. Hematology, 2023, 28(1): 2186037.
- [12] Feldman A, Duek AM, Mandel-Benado M, et al. Effective neutralization of daratumumab effects on pre-transfusion testing: a method modification [J]. Clin Lab, 2022, 68(9).
- [13] Ehrend E, Manns P, Harenkamp S, et al. Preanalytic depletion of medicinal anti-CD38 antibody from patient plasma for immunohematology testing [J]. Blood, 2021, 138(9): 814-817.
- [14] Feng CC, Chang CW, Lien ZY, et al. Better resolving of anti-CD38 antibody interference with blood compatibility testing by using manual polybrene method-compared with dithiothreitol-pretreatment indirect antiglobulin test [J]. J Clin Lab Anal, 2023, 37(8): e24891.
- [15] Safic Stanic H, Kruhonja Galic Z, Lukic M, et al. Risk of new alloimmunization in patients on anti-CD38 treatment using tube LISS-IAT method[J]. Transfus Apher Sci, 2024, 63(2): 103873.
- [16] Song J, Fu R. Review: Effects of anti-CD38 monoclonal antibodies on red blood cell transfusion and interventions [J]. J Clin Lab Anal, 2021, 35(12): e23832.
- [17] Zhou Y, Chen LY, Jiang TS, et al. 2-Mercaptoethanol (2-ME)-based IATs or Polybrene method mitigates the interference of daratumumab on blood compatibility tests[J]. Hematology, 2021, 26(1): 365-370.
- [18] Yadav S, Gundeti S, Bhave A, et al. Role of daratumumab in the frontline management of multiple myeloma: a narrative review [J]. Expert Rev Hematol, 2023, 16(10): 743-760.
- [19] 强新晨,杨华莹,邵俊良.应用二硫苏糖醇消除达雷木单抗对输血相容性检测干扰的探讨[J].中国实验诊断学,2022,26(3):400-403.
- [20] 骆宏,王贞,廖志坚,等.抗-CD38 单克隆抗体对输血前检测试验的干扰及其处理措施[J].中国输血杂志,2020,33(3):272-275.
- [21] 黎裕元,张玲,蔡葵,等.改良 DTT 法用于减少达雷妥尤单抗对血清学检测造成的干扰[J].中国实验血液学杂志,2023,31(5):1543-1549.

(收稿日期:2024-01-08)