

《基于骨髓样本的多发性骨髓瘤微小残留病灶检测专家共识(2024年版)》解读

傅铮铮¹



专家简介:傅铮铮,苏州大学附属第一医院副教授、主任医师,任国家血液系统疾病临床医学研究中心副主任、中华医学会血液分会浆细胞学组副组长、中国医师协会血液分会骨髓瘤专家委员会委员、中国抗癌协会血液肿瘤分会委员、女医师协会靶向治疗专委会委员、江苏省医师协会血液分会委员、江苏省抗癌学会血液肿瘤分会/江苏省医学会血液分会/江苏省研究型医院协会浆细胞疾病学组副组长、中国医药教育协会血液学专业委员会常务委员、亚太骨髓瘤网成员和国际骨髓瘤协会会员。作为项目负责人先后获江苏省卫生厅科教兴卫重点人才基金、国家自然科学基金、江苏省自然科学基金、中国抗癌协会血液肿瘤专业委员会基金。近年来在国内外杂志发表文章 100 余篇,其中第一作者和通讯作者 30 余篇。获得过教育部、科技部科技进步二等奖,江苏省新技术引进奖等。

[摘要] 多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是血液系统第二大常见恶性肿瘤,标准的整体治疗模式及新药为主的方案极大地改善了 MM 患者的生存,但微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)的存在可导致绝大多数患者的复发。目前,二代流式细胞术(next-generation flow cytometry, NGF)和二代测序(next-generation sequencing, NGS)是基于骨髓样本检测 MM 患者 MRD 的主流技术。为了推进 MM 患者 MRD 检测技术的标准化和规范化,中华医学会血液学分会实验诊断学组及浆细胞疾病学组、中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会讨论制订了在 MM 患者中应用 NGF 和 NGS 技术进行 MRD 检测的中国专家共识。为更好地指导临床实践,本文拟对共识的临床和实验室部分进行解读。

[关键词] 多发性骨髓瘤;骨髓微小残留病灶;二代流式细胞术;二代测序

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2024.09.003

[中图分类号] R733.3 **[文献标志码]** A

Interpretation of expert consensus on minimal residual disease detection in multiple myeloma based on bone marrow samples(2024)

FU Chengcheng

(Department of Hematology, the First Affiliated Hospital of Soochou University, Suzhou, 215006, China)

Corresponding author: FU Chengcheng, E-mail: fuchengchengsz@163.com

Abstract Multiple myeloma(MM) is the second most common hematologic malignant tumor. Standard of care and new drug-based regimens have greatly improved the survival of MM patients, but minimal residual disease(MRD) causes relapse in the vast majority of patients. At present, next-generation flow cytometry(NGF) and next-generation sequencing(NGS) are the mainstream technologies for detecting MRD based on bone marrow samples. To standardize and normalize MRD detection, the Experimental Diagnosis Group and Plasma Cell Disease Group of the Hematology Branch of the Chinese Medical Association, and the Multiple Myeloma Professional Committee of the Chinese Medical Doctor Association discussed and formulated the Chinese expert consensus on the application of NGF and NGS technology for MRD detection in MM patients. To better guide clinical practice,

¹苏州大学附属第一医院血液科(江苏苏州,215006)

通信作者:傅铮铮,E-mail:fuchengchengsz@163.com

this article intends to interpret the clinical and laboratory parts of the consensus.

Key words multiple myeloma; bone marrow minimal residual disease; next-generation flow cytometry; next-generation sequencing

多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)属于浆细胞肿瘤,是血液系统第二大常见恶性肿瘤。标准的整体治疗模式和多种免疫治疗药物包括 CD38 单抗、ADC 单抗、CAR-T 细胞疗法和双特异性单克隆抗体等进入初诊和复发难治患者的临床使用,极大推动了治疗进展。患者缓解率和无进展生存率大大提高,因此需要在常规血清学缓解基础上进行更敏感的微小残留病灶(minimal residual disease, MRD)监测,对缓解深度进行评价和预后评估。连续 MRD 监测则用来评估深度缓解的持续性。为了使国内各单位对 MRD 的检测和分析逐步实现标准化和规范化,尽量减少在结果解读和预后评估标准上的差异,中华医学会血液学分会实验诊断学组及浆细胞疾病学组、中国医师协会多发性骨髓瘤专业委员会经过讨论形成了《2024 年基于骨髓样本的多发性骨髓瘤 MRD 检测中国专家共识》(以下简称共识)。其中涉及到 MRD 的检测技术主要有二代流式细胞术(next-generation flow cytometry, NGF)和二代测序(next-generation sequencing, NGS)。本文将针对共识中重要的部分作详细解读。

1 临床部分

1.1 骨髓样本采样细节要求

获得最佳质量的骨髓样本对于 MRD 的检测结果至关重要。共识指出,NGF 要求至少采取 3~5 mL 骨髓样本[(5~20)×10⁶ 个细胞];NGS 骨髓采集量以 3~5 mL 为宜,若白细胞计数偏低,应适当调整采集量,使有核细胞总数达到 2×10⁶ 个以上。

在临床实践中应强调骨穿时第一抽样本送检 MRD^[1]。骨髓样本会随着穿刺时抽吸次数的增多而逐渐稀释,继而造成有核细胞数的明显下降,引起假阴性结果。

用于 NGF 的新鲜骨髓样本要求 EDTA 或肝素抗凝;用于 NGS 的新鲜骨髓应保存在 EDTA 或枸橼酸钠抗凝的采血管,禁止使用肝素抗凝管。如本地实验室不具备检测条件需要外送,需注意保存转运条件。NGF 强调对存活细胞进行检测,理想状态下采集骨髓样本后应立即检测;如需要外送,应将骨髓样本常温运输,于 48 h 内进行检测。NGS 样本如需外送,应置于 4℃ 冷藏运送,72 h 内进行检测,此外也可使用冻存的骨髓、细胞或者 DNA。

1.2 两种检测手段:取舍还是联合?

目前 NGF 的灵敏度可以达到(2~6)×10⁻⁶, NGS 的灵敏度可以达到 1×10⁻⁶。FORTE 临床研究的数据表明,NGF 和 NGS 在 10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 灵敏度上的一致性分别为 86% 和 78%^[2]。尽管通常情况下两种检测手段具有良好的一致性,两种检测手段的结果并非绝对相同。此外,NGS 可以识别初诊基线时的不同克隆,并监测每个克隆的变化趋势及后续有无克隆演变的发生。因此,如条件允许可联合使用两种检测手段。

1.3 MRD 监测时间点

共识强调在临床实践中应进行 MRD 的连续监测。原则上,在常规疗效评估可能达 CR 时开始 MRD 检测,此后在每个治疗阶段结束应进行 MRD 检测;维持治疗阶段 MRD 转阴患者每年至少监测 1 次,未转阴患者每半年监测 1 次,直至疾病复发或进展。在缓解持续时间方面,达到持续 MRD 阴性(国际骨髓瘤工作组将其定义为至少间隔 12 个月的连续 2 次 MRD 阴性)比在较短时间间隔内 MRD 阴性更为重要。

1.4 MRD 检测灵敏度

目前国际骨髓瘤工作组对 MRD 阴性的定义是至少在 10⁻⁵ 灵敏度级别达到阴性。当然更高灵敏度比如使用 10⁻⁶ 作为检测阈值可能具有更加良好的预后生存区分度。MASTER 研究结果显示,在达到持续 MRD 阴性(至少间隔 12 个月的连续 2 次 MRD<10⁻⁵)的患者中,MRD 在 10⁻⁶ 灵敏度持续阴性的患者预后优于 MRD 在 10⁻⁵ 灵敏度持续阴性的患者,因此该研究提出维持 MRD<10⁻⁶ 可能最适合作为中止治疗前后的目标^[3]。目前越来越多的临床研究正在探索以 MRD 监测驱动治疗决策,未来研究结果可能会进一步改变 MM 的治疗模式。

1.5 MRD 的临床意义

MRD 转阴对预后生存的预测优于传统血清学疗效评估。一项大型 Meta 分析显示 MRD 阴性可以显著提高 PFS(HR=0.33, 95%CI 0.29~0.37, P<0.001)和 OS(HR=0.45, 95%CI 0.39~0.51, P<0.001);在可移植患者中,MRD 阴性患者 PFS 和 OS 分别为 61 个月和未达到,而阳性患者分别为 24.1 个月和 60.9 个月;在不可移植患者中,MRD 阴性患者 PFS 未达到,而阳性患者 PFS 为 26.9 个月^[4]。另一项 Meta 分析纳入了 14 项针

对新诊断 MM 患者的临床研究,共 1 273 例患者,MRD 阴性患者的中位 PFS 和 OS 分别为 54 个月和 98 个月,而阳性患者分别为 26 个月和 82 个月。在获得 CR 的患者中,MRD 阴性的 CR 患者生存更优,PFS 和 OS 分别为 56 个月和 112 个月,而 MRD 阳性的 CR 患者 PFS 和 OS 分别为 34 个月和 82 个月,2 组间差异有统计学意义^[5]。另一项纳入了 609 例患者的汇总分析显示,持续 MRD 阳性的 CR 患者,其预后可能与接近 CR、甚至 PR 的患者类似,PFS 分别为 27、27、29 个月,OS 分别为 59、64、65 个月^[6]。未来通过 MRD 持续阴性能否实现临床治愈值得进一步探索。

2 二代流式 MRD 的检测

缓解深度是评价治疗疗效和预测生存期的关键要素,MM 中的 CR 因其检测技术有限,无法区分残留肿瘤细胞和多克隆浆细胞。NGF 可以达到预期 2×10^{-6} 左右的检测限,即在几乎 90% 的 MM 患者中检测到一百万个正常细胞内的 2 个肿瘤细胞。从技术角度来看,将 MRD 作为生存终点替代指标的关键在于重现性,基于 NGF 和 NGS 的 MRD 评估方法的经验正在积累。

2.1 NGF 推荐抗体组合

目前推荐的双管 8 色方案,最初是由国际临床细胞分析学会 (ICCS) 和欧洲临床细胞分析学会联合共识小组提出并验证的^[7-8]。为了能够粗略区分正常和异常的 PC,CD19、CD56、CD27、CD138、CD38 和 CD45 都包括在管 1 和管 2 中。在管 1 中加入表面单克隆抗体 CD81 和 CD117,而在管 2 中加入胞浆抗 Kappa 和抗 Lambda 多克隆抗体以提供更多的确认信息。特别重要的是,EuroFlow 联盟开发了一种在 MM 中使用 NGF 进行 MRD 检测的高灵敏度、完全标准化的方法^[9]。EuroFlow NGF 最突出的特点是优化了每一个抗体的克隆、荧光素和滴度,采用标准的样本前处理过程,结果采用 Infinicyt 软件把两管数据融合成一管,可分析细胞数高达 10^7 个。

近年来,EuroFlow 联盟、ICCS 及其他一些实验室研究也推荐了单管十色的 NGF 方案,该单管包含了上述两管所有的标记物。这种方法降低了试剂成本,同时又能一管获取更多的细胞。实验室在推荐方案的抗体克隆号和荧光素搭的选择中可以参考 EuroFlow 和 ICCS 的推荐。

2.2 NGF 的质量控制问题

如果实验室采用不同于推荐方案的实验组合,需要验证每个标记物和荧光素组合的分辨能力。确定抗体性能的方法之一是将染色分辨率与方案中使用的所有其他抗体一起评估,而不是单独使

用该抗体,最好是通过定义阴性和阳性染色群体并计算其染色指数来实现。同时还需要验证该组合对区分和检测残留肿瘤细胞和多克隆 PC 的能力与推荐组合等效。

在“预裂解”样本处理程序中,大量骨髓样品在细胞染色之前需先用大体裂解液裂解,接着标记抗体,再上机。但该方法在习惯了“染色后裂解红细胞”的实验室中,可能比较难转换,将多管骨髓样本按照常规程序(先染色后裂解)处理后,最后混在一起增加可获取的细胞总数的“混合管”方法也是可以接受的。

计算 MRD 定量结果的方法为异常单克隆浆细胞占所有白细胞的百分比。当异常细胞不表达 CD45 时(如 PCN),白细胞数量应包含 CD45 阳性白细胞和阴性区的异常细胞。同时报告方法学最低检出限(limit of detection, LOD)和(或)最低定量限(lower limit of quantification, LLOQ)^[10]。2014 年,Keeney 等^[11]进行了一项调查,以检查参与美国病理学家学院能力计划的实验室中通过流式细胞术检测 MRD 的普遍性和性能。他们发现实验室之间的 LOD 存在巨大差异。为此,作者建议纳入一项新要求,即每个实验室应记录用于 MRD 检测的流式细胞术方法的检测灵敏度,并将此信息包含在最终诊断报告中。国际上的研究认为 20 个成群细胞是 LOD 比较保守的值。共识建议 MM MRD 的 LOD 至少为 0.001%,这意味着至少要获取 200 万个细胞;而 LLOQ 是指可重复定量检出 MRD 阳性细胞群体的最小细胞数,推荐可定量肿瘤细胞群体的最小细胞数为 50 个,如果预期灵敏度要达到 1×10^{-5} 水平,意味着至少要获取 500 万个细胞。

2.3 室间质量评估

由于流式 MM MRD 检测已成为确定新疗法疗效和患者反应深度的重要方法,因此,独立实验室之间测试结果的分析、解释具有可重复性就非常重要。2013 年美国对骨髓瘤流式 MRD 的一项调查表明,流式细胞术数据分析缺乏标准化方法导致 MM MRD 分析和解释存在较大差异^[12]。从那时起,一系列努力使这些方面标准化。例如,英国国家外部质量评估服务中心最近倡导了一个室间质量评估计划,该计划评估了流式细胞术检测 MM MRD 的可重复性。在这项研究中,将含有 0、0.1%、0.01%、0.001% 和 0.0001% 的 5 批骨髓样本的稀释系列分发给 10 个国际实验室,其中 8 个实验室提交了答复。这些实验室被要求使用他们自己实验室建立的程序对细胞进行染色,并根据 MM MRD 测试的样本染色、采集、分析和报告的

共识指南对骨髓瘤细胞的存在进行定量评估。总体而言,该研究证明了低至 0.001% 的 MRD 水平还存在良好的检测线性,8 个实验室中 6 个检测到 PCN 的最低限水平为 0.000 1%。然而,在方案设计、荧光染料偶联物和使用的裂解试剂中发现了偏差。该研究得出的结论是,如果 MFC 对 MM MRD 的评估进一步标准化,也可以减少实验室间的差异。在我国,流式 MM MRD 还无相应的室间质量评估计划,结合我国现状,开展多中心的室间比对是切实可行的应对办法。

3 NGS MRD 检测

在中国 MM 患者中基于二代测序 MRD 的检测技术尚处于刚刚起步阶段,该技术具有标本要求低、灵敏度高、易于实现技术标准化等优点。但是作为新的 MRD 技术,除了需满足 NGS 实验技术的基本操作规范以外,由于基因重排检测的特殊性,共识也规范了一些在该技术使用过程中需要注意的内容。

3.1 基线样本需要选择合适的目标基因

临床和实验室一直非常关心的重要问题是在临床 NGS MRD 应用中免疫球蛋白 IGH 和 IGK 序列在多大程度上足够特异性。追踪肿瘤细胞特异性不足的 CDR3 序列可能会导致 MRD 假阳性结果。目前国内外相关文献报道较少。MRD 标志物跟踪的适用性取决于在正常 B 细胞库中偶然遇到相同序列的概率。这可能导致一个错误的 MRD 阳性结果。Briney 等^[13]通过个体 B 细胞群测序估计了人体中大约有多达 1×10^{11} 个独特的重链序列,而据估计,轻链库的多样性比重链库的多样性低约 4 个数量级,即 1×10^7 个独特的轻链序列。Rustad 等^[14]应用数据库分析了 500 条独立样本的克隆序列,结果显示 99.3% 的 IGH 序列是独特的,而 IGK 序列的唯一性概率仅 58.5%。并且随着样本量的增加,它们继续减少,而没有达到一个平台期。独立样本中轻链克隆的流行率分布高度偏向于 0,但有长尾,部分序列在 >50% 的样本中偶然出现。综上所述,MM 患者在基线上确定的显性克隆序列是长期跟踪恶性克隆的可靠生物标志物,包括 IGH 和大多数轻链克隆,但少部分重排类型在人群中出现概率较高,会导致假阳性的结果,需慎重选择。

3.2 MRD 样本阳性克隆定义标准的解读

文献报道 MM 整体基因组景观以亚克隆异质性和复杂的进化模式为特征,具有进化的 CDR3 序列的亚克隆在治疗过程中有可能成为主导地位^[15]。为了更好地区分不同克隆,共识正文中缓解期样本 MRD 阳性的定义标准细分成了 3 种情

况,以更好地提示临床在 MRD 过程中检测到在不同显著性克隆的临床意义。国外的一项研究分析了来自 905 个浆细胞骨髓瘤和健康对照样本的免疫球蛋白库 CDR3 序列^[14]。在所有基线患者中均发现了克隆重链和(或)轻链表达,其中 3.2% 的患者中有一个或多个亚克隆与主克隆相关。接着分析了 45 例患者的 101 个序列样本,提示显性克隆 CDR3 序列随着时间的推移保持相同。总体来看,亚克隆变异的发生频率相对较低。

3.3 NGS MRD 临床报告中涉及的部分技术参数、术语的解读

临床上更接受 MRD 报告为二分参数:高于(阳性)或低于(阴性)某一阈值。尽管这种做法有局限性,但它适用于 MRD 在疾病管理的作用。目前 MM 患者的 NGS MRD 临床报告尚未见国内外相关文献,可参考 CLL 患者的 MRD 检测报告共识^[16]。报告 MRD 数据时,必须提供每个样品的检测限,这一点至关重要。检测限取决于使用的检测方法以及样品质量,主要取决于可用于分析的细胞数量或 DNA 量。对于 MRD 阴性,建议使用术语“不可检测的 MRD”(U-MRD),比“MRD⁻”或“MRD 阴性”更准确,作为描述在指定的报告阈值下无法检测到可测量疾病负荷的通用术语。对于 MRD 阳性,建议提供可检测 MRD 的定量结果。

利益冲突 作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Meseha M, Hoffman J, Kazandjian D, et al. Minimal residual disease-adapted therapy in multiple myeloma: current evidence and opinions [J]. *Curr Oncol Rep*, 2024 Apr 27. doi: 10.1007/s11912-024-01537-2. Epub ahead of print.
- [2] Oliva S, Genuardi E, Belotti A, et al. Multiparameter flow cytometry(MFC)and next generation sequencing (NGS)for minimal residual disease(MRD)evaluation: Results of the FORTE trial in newly diagnosed multiple myeloma (MM) [J]. *J Clin Oncol*, 2020, 38 (15_ suppl): 8533.
- [3] Costa LJ, Chhabra S, Medvedova E, et al. Minimal residual disease response-adapted therapy in newly diagnosed multiple myeloma (MASTER): final report of the multicentre, single-arm, phase 2 trial [J]. *Lancet Haematol*, 2023, 10(11): e890-e901.
- [4] Munshi NC, Avet-Loiseau H, Anderson KC, et al. A large meta-analysis establishes the role of MRD negativity in long-term survival outcomes in patients with multiple myeloma [J]. *Blood Adv*, 2020, 4 (23): 5988-5999.
- [5] Munshi NC, Avet-Loiseau H, Rawstron AC, et al. Association of minimal residual disease with superior survival outcomes in patients with multiple myeloma: a meta-analysis [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(1): 28-35.

- [6] Lahuerta JJ, Paiva B, Vidriales MB, et al. Depth of response in multiple myeloma: a pooled analysis of three PETHEMA/GEM clinical trials [J]. *J Clin Oncol*, 2017, 35(25): 2900-2910.
- [7] Wood B, Jevremovic D, Béné MC, et al. Validation of cell-based fluorescence assays: practice guidelines from the ICSH and ICCS-part V-assay performance criteria [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2013, 84(5): 315-323.
- [8] Flores-Montero J, de Tute R, Paiva B, et al. Immunophenotype of normal vs myeloma plasma cells: Toward antibody panel specifications for MRD detection in multiple myeloma [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1): 61-72.
- [9] Flores-Montero J, Sanoja-Flores L, Paiva B, et al. Next Generation Flow for highly sensitive and standardized detection of minimal residual disease in multiple myeloma [J]. *Leukemia*, 2017, 31(10): 2094-2103.
- [10] Stetler-Stevenson M, Paiva B, Stoolman L, et al. Consensus guidelines for myeloma minimal residual disease sample staining and data acquisition [J]. *Cytometry B Clin Cytom*, 2016, 90(1): 26-30.
- [11] Keeney M, Halley JG, Rhoads DD, et al. Marked variability in reported minimal residual disease lower level of detection of 4 hematolymphoid neoplasms: a survey of participants in the college of American pathologists flow cytometry proficiency testing program [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2015, 139(10): 1276-1280.
- [12] Flanders A, Stetler-Stevenson M, Landgren O. Minimal residual disease testing in multiple myeloma by flow cytometry: major heterogeneity [J]. *Blood*, 2013, 122(6): 1088-1089.
- [13] Briney B, Inderbitzin A, Joyce C, et al. Commonality despite exceptional diversity in the baseline human antibody repertoire [J]. *Nature*, 2019, 566(7744): 393-397.
- [14] Rustad EH, Misund K, Bernard E, et al. Stability and uniqueness of clonal immunoglobulin CDR3 sequences for MRD tracking in multiple myeloma [J]. *Am J Hematol*, 2019, 94(12): 1364-1373.
- [15] Lohr JG, Stojanov P, Carter SL, et al. Widespread genetic heterogeneity in multiple myeloma: implications for targeted therapy [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(1): 91-101.
- [16] Wierda WG, Rawstron A, Cymbalista F, et al. Measurable residual disease in chronic lymphocytic leukemia: expert review and consensus recommendations [J]. *Leukemia*, 2021, 35(11): 3059-3072.

(收稿日期: 2024-05-28)

(本文编辑: 阮方)

本刊文后参考文献著录规范

为了反映论文的科学依据和作者尊重他人研究成果的严肃性以及向读者提供有关信息的出处, 论文中应列出参考文献。所列的参考文献应限于作者直接阅读过的、最主要的、且为发表在正式出版物上的文章。参考文献应注重权威性和时效性, 要求引用近 3~5 年发表的文献(以近 3 年为佳)。参考文献附于正文之后, 著录方法采用顺序编码制, 即按论文中引用文献编码依次列出。格式如下(主要列出期刊和专著):

[期刊] 作者(3 位以内姓名全列, 每位之间加“,”; 3 位以上只写前 3 位, “,”后加“等”或“et al”)。文题 [J]。刊名, 年份, 卷(期): 起-止页。

[专著]

作者(3 位以内姓名全列, 每位之间加“,”; 3 位以上只写前 3 位, “,”后加“等”或“et al”)。文题 [M]// 主编。书名。版次。出版地: 出版者, 出版年: 起-止页。

主编(3 位以内姓名全列, 每位之间加“,”; 3 位以上只写前 3 位, “,”后加“等”或“et al”)。书名 [M]。版次。出版地: 出版者, 出版年: 起-止页。