

• 个案分析 •

二巯基乙醇解决 CD38 单克隆抗体对输血前检测的干扰及疗效分析*

袁 燕, 邓超干[△], 蔡钦泉, 罗钦泉

深圳市罗湖区人民医院输血科, 广东深圳 518001

关键词: 二巯基乙醇; CD38 单克隆抗体; 多发性骨髓瘤

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2022.08.027

中图法分类号: R733.3

文章编号: 1673-4130(2022)08-1021-04

文献标志码: C

多发性骨髓瘤是一种浆细胞异常增殖的恶性疾病, 在很多国家是血液系统第 2 位常见恶性肿瘤, 仅次于淋巴瘤^[1]。随着新药出现及检测手段的提高, 多发性骨髓瘤的诊断和治疗不断改进和完善。2019 年 7 月, 中国国家药品监督管理局批准达雷妥尤单抗(DARA)上市, 该药是人源化抗 CD38IgG1 κ 单克隆抗体, 可以通过多种免疫介导的作用机制诱导肿瘤细胞的快速死亡。文献[2]增加了达雷妥尤单抗联合治疗部分及相关注意事项, 随着指南的修订, DARA 已经成为了一种高效的治疗多发性骨髓瘤的一线药物。CD38 是一种完整的跨膜糖蛋白, 在红细胞表面也有不同程度的表达^[3-5]。它具有多种功能, 包括酶活性、细胞内钙调节和受体介导的黏附。DARA 的抗骨髓瘤活性通过 CD38 单克隆抗体(简称 CD38 单抗)介导的免疫机制发生, 包括补体依赖性细胞毒性、抗体依赖性细胞毒性、抗体依赖性细胞吞噬作用和免疫抑制调节性 T 细胞的免疫调节性耗竭, 通过 CD38 直接的表面信号传导途径, 发生肿瘤细胞凋亡^[6]。CD38 单抗免疫机制会干扰输血相容性检测, 导致抗体筛查阳性和交叉配血不合。本文通过回顾 2 例使用 DARA 治疗的多发性骨髓瘤患者接受 32 次输血治疗, 总结分析 0.2 mol/L 二巯基乙醇(2-Me)对输血相容性检测的处理及输血实践的影响。

1 资料与方法

1.1 研究对象 病例 1: 男性患者, 64 岁, 2016 年确诊多发性骨髓瘤, 先后行硼替佐米/地塞米松(VD)方案、硼替佐米/阿霉素/地塞米松(PAD)方案治疗后, 病情好转, 期间曾有输血治疗。2020 年 2 月病例 1 患者因多发性骨髓瘤再次入院, 2020 年 2—4 月其在本院行 DARA+PAD 治疗, 由于病例 1 患者贫血因此给予其输血治疗。病例 2: 女性患者, 62 岁, 既往无重大病史, 孕 2 产 2, 无输血史, 2020 年 6 月发现肾功能不全入院, 诊断为多发性骨髓瘤。病例 2 患者一直在

本院进行规律化疗和其他对症治疗, 2020 年 6 月 20 日至 2021 年 6 月行 DARA+PAD 方案治疗, 由于病例 2 患者贫血因此给予其输血治疗。病例 1 和病例 2 患者输注的血液来自无偿献血者, 由深圳市血液中心分离制备为去白细胞悬浮红细胞。

1.2 对照 阴性对照为未使用 CD38 单抗治疗且无不规则抗体的血浆标本; 阳性对照为未使用 CD38 单抗治疗但不规则抗体阳性, 经鉴定 3 份标本中分别含抗 E、抗 JK^a、抗 M 抗体。采用 0.2 mol/L 的 2-Me 处理抗筛细胞前后进行抗体筛查实验, 验证 2-Me 消除 CD38 单抗干扰对意外抗体检测的影响。

1.3 仪器与试剂 戴安娜全自动血型配血仪(型号: WADiana Compact); 久保田离心机(型号: KA-2200); 电热恒温水槽(型号: CU-600 型); 正反定型血型卡(西班牙 Diagnostic Grifols, 批号: 18009.01、20012.01); 抗人球蛋白卡(西班牙 Diagnostic Grifols, 批号 19116.01、19189.01、20122.01); ABO 血型反定型细胞(上海血液生物, 批号: 20205304、20205308、20205335); 抗体筛查细胞(上海血液生物, 批号: 20207043、20217005); 十二系抗体鉴定细胞(上海血液生物, 批号: 20200226、20200611、20201113); 凝聚胺试剂(珠海贝索, 批号: A191001、A191101、A200802); 0.2 mol/L 2-Me(上海血液生物, 批号: 20191201、20200302、20201901)。

1.4 处理红细胞 用移液器吸取待灭活红细胞(献血者红细胞、抗筛细胞), 用生理盐水悬浮, 1 000 × g 离心 1 min 后弃掉上清液; 用生理盐水洗涤 4 次; 最后 1 次洗涤后吸取 25 μ L 压积红细胞, 用生理盐水配制成 2%~5% 待灭活红细胞悬液(20 μ L 压积红细胞加 500 μ L 生理盐水配制成 3% 的红细胞浓度); 2%~5% 待灭活红细胞悬液与 0.2 mol/L 2-Me 1:4 混合; 37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 30 min, 孵育期间混匀 3~4 次; 孵育结束后用生理盐水洗涤 4 次, 弃去上清液, 用生理盐

* 基金项目: 2021 年罗湖区第二批软科学研究计划项目(LX20210901)。

[△] 通信作者, E-mail: 373485287@qq.com。

本文引用格式: 袁燕, 邓超干, 蔡钦泉, 等. 二巯基乙醇解决 CD38 单克隆抗体对输血前检测的干扰及疗效分析[J]. 国际检验医学杂志,

水配成需要的红细胞悬液浓度。

1.5 检测方法 病例 1 和病例 2 患者标本用微柱凝胶法行 ABO 和 RhD 血型试验、直接抗人球蛋白试验 (DAT-IgG); 抗筛细胞和献血者红细胞灭活前后均采用微柱凝胶法、凝聚胺法与病例 1 和病例 2 患者标本行抗体筛查、交叉配血。按照试剂说明书进行试验和结果判读^[7]。

1.6 红细胞输注效果评价 病例 1 和病例 2 患者输注红细胞后 24~48 h 内检测血红蛋白, 依据血红蛋白增加值和临床症状体征的改善, 综合判断红细胞输注效果。

2 结 果

2.1 CD38 单抗治疗前病例 1 和病例 2 患者输血相容性检测 病例 1 和病例 2 患者在治疗前抗体筛查、DAT-IgG、自身对照均阴性、交叉配血实验主次侧均无凝集无溶血, 见表 1。

表 1 CD38 单抗治疗前病例 1 和病例 2 患者输血相容性检测结果

项目	血型	DAT-IgG	抗体筛选			交叉配血	
			I	II	III	微柱凝胶法	凝聚胺法
病例 1 患者	O+	-	-	-	-	无凝集无溶血	无凝集无溶血
病例 2 患者	B+	-	-	-	-	无凝集无溶血	无凝集无溶血

2.2 CD38 单抗治疗后病例 1 和病例 2 患者输血相容性检测 病例 1 和病例 2 患者 ABO 和 RhD 血型不受影响, 自身对照和 DAT-IgG 阳性。见表 2。抗体筛查试验选择含抗 E、抗 JK^a、抗 M 抗体血浆做对照, 用 2-Me 处理抗筛细胞, 结果见表 3。交叉配血试验, 用 0.2 mol/L 的 2-Me 处理献血者红细胞前后进行试

验, 结果见表 4。

表 2 CD38 单抗治疗后病例 1 和病例 2 患者血型、DAT-IgG、自身对照结果

项目	血型	DAT-IgG	自身对照
病例 1 患者	O+	1+	1+
病例 2 患者	B+	±	±

表 3 CD38 单抗治疗后病例 1 和病例 2 患者和对照抗体筛查结果

项目	处理抗筛细胞前			2-Me 处理抗筛细胞后		
	I	II	III	I	II	III
阴性对照血浆	-	-	-	-	-	-
阳性对照血浆 1(抗 E 抗体)	3+	-	3+	3+	-	3+
阳性对照血浆 2(抗 JK ^a 抗体)	1+	-	-	1+	-	-
阳性对照血浆 3(抗 M 抗体)	3+	3+	-	3+	3+	-
病例 1 患者	2+	2+	2+	-	-	-
病例 2 患者	2+	2+	2+	-	-	-

2.3 输注效果评价 微柱凝胶法交叉配血主侧无凝集, 次侧凝集强度小于或等于自身对照及 DAT-IgG 凝集强度, 故判为相合。住院治疗期间, 病例 1 患者共输注 13 次、病例 2 患者共输注 19 次相合红细胞。输注后 24~48 h 内复查血常规, 依据输注 1 U 红细胞可使体质量为 60 kg 的成年人血红蛋白(Hb)水平提高约 5 g/L[或使血细胞比容(HCT)提高约 0.015%]及临床症状体征的改善, 综合判断红细胞输注有效。病例 1 和病例 2 患者输注前后 Hb 及 HCT 变化情况见表 5、6。

表 4 抗 CD38 单抗治疗后病例 1 和病例 2 患者交叉配血结果

项目	交叉配血	未处理献血者红细胞				2-Me 处理献血者红细胞后			
		微柱凝胶法		凝聚胺法		微柱凝胶法		凝聚胺法	
		主侧	次侧	主侧	次侧	主侧	次侧	主侧	次侧
病例 1 患者	22 袋红悬液	均 2+	均 ±	均 -	均 -	13 袋-, 9 袋 ±	均 ±	均 -	均 -
病例 2 患者	51 袋红悬液	均 2+	均 ±	均 -	均 -	19 袋-, 32 袋 ±	均 ±	均 -	均 -

注: 2+ 为 2+ 凝集, ± 为弱凝集, - 为无凝集。

表 5 病例 1 患者输注红细胞效果评价

输注次数	输注量(U)	输注前		输注后		Hb 增加值 (g/L)	HCT 增加值 (%)	症状体征	效果评价
		Hb(g/L)	HCT(%)	Hb(g/L)	HCT(%)				
第 1 次	2	49	0.148	65	0.193	16	0.045	改善	有效
第 2 次	2	65	0.193	75	0.223	10	0.030	改善	有效
第 3 次	2	57	0.173	70	0.206	13	0.033	改善	有效
第 4 次	2	60	0.175	64	0.190	4	0.015	改善	有效
第 5 次	2	59	0.171	65	0.191	6	0.020	改善	有效
第 6 次	2	64	0.184	70	0.209	6	0.025	改善	有效
第 7 次	2	59	0.173	64	0.190	5	0.017	改善	有效

续表 5 病例 1 患者输注红细胞效果评价

输注次数	输注量(U)	输注前		输注后		Hb 增加值 (g/L)	HCT 增加值 (%)	症状体征	效果评价
		Hb(g/L)	HCT(%)	Hb(g/L)	HCT(%)				
第 8 次	2	65	0.195	77	0.229	12	0.034	改善	有效
第 9 次	2	62	0.180	68	0.201	6	0.021	改善	有效
第 10 次	2	58	0.170	65	0.198	7	0.028	改善	有效
第 11 次	2	57	0.169	67	0.207	10	0.038	改善	有效
第 12 次	2	58	0.172	68	0.207	10	0.035	改善	有效
第 13 次	2	63	0.199	72	0.216	9	0.017	改善	有效

表 6 病例 2 患者输注红细胞效果评价

输注次数	输注量(U)	输注前		输注后		Hb 增加值 (g/L)	HCT 增加值 (%)	症状体征	效果评价
		Hb(g/L)	HCT(%)	Hb(g/L)	HCT(%)				
第 1 次	2	63	0.185	71	0.221	8	0.036	改善	有效
第 2 次	2	56	0.175	64	0.202	8	0.027	改善	有效
第 3 次	2	75	0.232	88	0.272	13	0.040	改善	有效
第 4 次	2	68	0.217	63	0.192	7	0.012	改善	有效
第 5 次	2	54	0.168	68	0.216	14	0.048	改善	有效
第 6 次	2	62	0.189	84	0.247	22	0.058	改善	有效
第 7 次	2	60	0.195	69	0.216	9	0.021	改善	有效
第 8 次	2	69	0.214	91	0.268	22	0.054	改善	有效
第 9 次	2	71	0.220	86	0.265	15	0.045	改善	有效
第 10 次	2	60	0.182	77	0.229	17	0.047	改善	有效
第 11 次	2	77	0.229	83	0.248	6	0.019	改善	有效
第 12 次	2	64	0.201	78	0.229	14	0.028	改善	有效
第 13 次	2	60	0.180	67	0.205	7	0.025	改善	有效
第 14 次	2	55	0.166	67	0.202	12	0.036	改善	有效
第 15 次	2	67	0.202	78	0.230	11	0.028	改善	有效
第 16 次	2	63	0.188	81	0.247	18	0.059	改善	有效
第 17 次	2	67	0.208	73	0.221	6	0.013	改善	有效
第 18 次	2	61	0.178	73	0.219	12	0.041	改善	有效
第 19 次	2	60	0.181	84	0.252	24	0.071	改善	有效

3 讨论

本研究中病例 1 和病例 2 患者使用 CD38 单抗治疗 3 d 后开始输血相容性检测, ABO 及 RhD 血型检测不受影响, 符合 DE VOOGHT 等^[8]报道的 CD38 抗原与抗 CD38 单抗的结合不影响患者 ABO 和 RhD 血型鉴定; 直接抗球蛋白实验由用药前阴性转为阳性, 病例 1 患者呈 1+凝集, 病例 2 患者呈 ±凝集, 由于 CD38 单抗药物治疗疾病时会结合到患者红细胞表面, 而红细胞表面有不同程度表达的 CD38 抗原分子^[3-5], 导致了 DAT-IgG 不同程度的阳性, 符合 SUL-LIVAN 等^[9]研究表明。

交叉配血和不规则抗体筛选实验时, CD38 单抗会结合到献血者和筛选红细胞表面, 干扰交叉配血实验主侧和不规则抗体检测^[10-11]。本研究中交叉配血试验同时采用微柱凝胶法和凝聚胺法, 微柱凝胶法主侧结果均为 2+凝集, 凝聚胺法主侧为无凝集, 说明凝聚胺试验对 CD38 相关的抗原-抗体反应不敏感, 符合 YE H 等^[12]报道的 CD38 单抗不干扰凝聚胺试验。也

可以解释为在低离子环境下, 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。所以当患者需要紧急输血时, 没有足够的时间解决 CD38 单抗引起的凝集, 可选择凝聚胺法进行交叉配血试验, 同时参考用药前的抗体筛选结果, 发放经凝聚胺法交叉配血相合的献血者红细胞即可。有条件的实验室可对患者进行 Rh 血型分型, 发放经凝聚胺法交叉配血相合且 Rh 表型与患者相匹配的献血者红细胞, 可最大限度降低致敏和同种抗体产生的风险^[13]。

本报道中处理献血者红细胞和抗筛红细胞的方法参考文献^[14]的操作标准, 因国内尚无 0.2 mol/L 的二硫苏糖醇(DTT)商品试剂, 本实验室无法获得此试剂, 考虑 2-Me 和 DTT 都属于还原剂, 故采用市售 0.2 mol/L 的 2-Me 处理红细胞。病例 1 和病例 2 患者输注经 2-Me 处理后微柱凝胶法交叉配血相合的红细胞后, 均无溶血等输血不良反应。本研究显示, 每输注 2 U 红细胞后 Hb 及 HCT 值均有增加, 偶有 Hb

增加低于 10 g/L,分析其原因可能与病例 1 和病例 2 患者输血导致血液稀释有关,随访发现其症状和体征均有改善,故综合判断输注有效。说明经 0.2 mol/L 的 2-Me 处理红细胞配血相合后可安全输注给经 DARA 治疗的患者,符合邵林楠等^[15]提出的 0.2 mol/L DTT 与 0.2 mol/L 的 2-Me 去除红细胞表面 CD38 抗原效果基本一致,无 DTT 试剂时可以用 2-Me 替代,也符合糜坚青等^[13]制订的 2-Me 处理红细胞的制备和检测流程。

本报道中处理后的红细胞主侧交叉配血都会呈轻微溶血反应,糜坚青等^[13]提出该溶血是由 2-Me 试剂引起,并非不规则抗体的作用,不同品牌 2-Me 会出现不同程度的溶血,应避免使用造成大量溶血的试剂。处理后的献血者红细胞行微柱凝胶法交叉配血,主侧部分呈弱凝集反应,这可能与试剂处理红细胞的能力、红细胞上 CD38 抗原数量、2-Me 的浓度、2-Me 与红细胞的比、微柱凝胶卡的灵敏度有关,本文未做更深入的研究。0.2 mol/L 的 2-Me 灭活红细胞过程中需多次洗涤及孵育,整个操作过程耗时较长,并非所有献血者都能相合,因此建议实验室在每次交叉配血试验时准备多份献血者红细胞平行处理,可缩短 DARA 治疗患者等待输血时间及减少试剂的消耗。

2-Me 会使红细胞上的某些抗原反应性变性或减弱,在评估使用这些试剂的试验结果时,应考虑到这一点。已知 2-Me 能使红细胞表面的 Kell 血型抗原变性,由于东亚人群中 Kell 血型多态性单一,基本为 K-k+型,K+血型的频率约为 0.07%,一般不做 Kell 血型抗原检测^[16],因此本研究未采取 Kell 血型抗原阳性为对照试验,采用 3 个阳性对照标本,分别为高频抗 E 抗体、抗 JK^a 抗体、抗 M 抗体,选择包含以上 3 个对应抗原的抗筛细胞反应,处理细胞前后的试验结果一致,说明 2-Me 未破坏红细胞上的 E 抗原、JK^a 抗原、M 抗原,证明 2-Me 处理红细胞方法有效。

与此同时,DARA 治疗患者及其家属、护理人员、医生、输血科工作人员都需要了解 CD38 单抗药物治疗后对输血相容性检测的干扰及对输血治疗的影响。输血科工作人员在进行输血前审核时,应注意输血申请单上的临床诊断,当抗体筛选发现有非特异性凝集,需仔细查看患者的病例及用药史,并与临床医生充分沟通,及时选择正确的检测方法。

综上所述,使用 0.2 mol/L 的 2-Me 处理红细胞后再进行输血相容性检测,可消除 CD38 单抗的干扰,为 CD38 单抗治疗的患者提供安全有效的血液。

参考文献

[1] WANG S,XU L,FENG J,et al. Prevalence and incidence of multiple myeloma in urban area in China: a national population-based analysis[J]. *Front Oncol*, 2019, 9(1):

1513.

- [2] 中国医师协会血液科医师分会,中华医学会血液学分会,中国医协会多发性骨髓瘤专业委员会. 中国多发性骨髓瘤诊治指南(2020 年修订)[J]. *中华内科杂志*, 2020, 59(5):341-346.
- [3] ALBENIZ I,DEMIR O,TURKER-SENER L,et al. Erythrocyte CD38 as a prognostic marker in cancer[J]. *Hematology*, 2007, 12(5):409-414.
- [4] MEHTA K,SHAHID U,MALAVASI F. Human CD38, a cell-surface protein with multiple functions[J]. *FASEB J*, 1996, 10(12):1408-1417.
- [5] ZOCCHI E,FRANCO L,GUIDA L,et al. A single protein immunologically identified as CD38 displays NAD⁺ glycohydrolase, ADP-ribosyl cyclase and cyclic ADP-ribose hydrolase activities at the outer surface of human erythrocytes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1993, 196(3):1459-1465.
- [6] MORANDI F,HORENSTEIN A L,COSTA F,et al. CD38: a target for immunotherapeutic approaches in multiple Myeloma[J]. *Front Immunol*, 2018, 28(9):2722.
- [7] 陈麟凤,庄健美,张金荣,等. 直接抗人球蛋白试验阳性强度对患者红细胞输注效果的影响[J]. *中华医学杂志*, 2020, 100(44):3510-3514.
- [8] DE VOOGHT K M K,LOZANO M,BUENO J L,et al. International forum on typing and matching strategies in patients on anti-CD38 monoclonal therapy[J]. *Vox Sang*, 2018, 113(26):36-52.
- [9] SULLIVAN H C,GERNER-SMIDT C,NOOKA A K,et al. Daratumumab(anti-CD38) induces loss of CD38 on red blood cells[J]. *Blood*, 2017, 129(22):3033-3037.
- [10] DIZON M F. The challenges of daratumumab in transfusion medicine[J]. *Lab Med*, 2017, 48(1):6-9.
- [11] RASIKA S,MITU D,PRERNA S,et al. Daratumumab (Anti-CD38) interference with serological testing: an emerging challenge for blood banks in developing countries [J]. *Glob J Transfus Med*, 2017, 32(2):163-165.
- [12] YEH T J,YEH C J,LIU Y C,et al. Manual polybrene method for pre-transfusion test could overcome the interference of daratumumab therapy in myeloma [J]. *Transfusion*, 2019, 59(8):2751-2752.
- [13] 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.
- [14] FUNG M K. AABB 技术手册[M]. 18 版. 桂嵘,译. 长沙:中南大学出版社,2019.
- [15] 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.
- [16] 王玲玲,杨颖,朱自严. 中国人群 Kell 血型 K 阳性的分子特征及分型试剂盒的研制和应用[J]. *临床输血与检验杂志*, 2008, 10(2):110-113.