

我们如何做好抗HLA抗体检测的质量控制

何军 吴德沛

苏州大学附属第一医院、江苏省血液研究所,血液学协同创新中心,苏州 215006

通信作者:何军,Email:junhe1964@163.com

基金项目:国家自然科学基金(81671549、81273266);江苏省医学创新团队与领军人才项目(CXTDB2017009)

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2019.04.001

How we do anti-HLA antibodies detection of quality control better

He Jun, Wu Depei

Jiangsu Institute of Hematology, Center for Clinical Laboratory, The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 215006, China

Corresponding author: He Jun, Email: junhe1964@163.com

随着我国异基因造血干细胞移植(allo-HSCT)病例的急剧增加,无论是在HSCT前后检测到患者血清中的抗人类白细胞抗原(HLA)抗体,都是影响HSCT造血重建延缓、移植物抗宿主病(GVHD)发生及总生存率等的重要因素,尤其是抗供者特异性HLA抗体(DSA)^[1-3]。近年国内移植中心相继开展了抗HLA抗体检测项目,但实验方法选择、DSA鉴定和判断、结果报告规范性及存在假阳性和假阴性结果的错误报告等问题,给抗HLA抗体检测项目的临床推广带来很多困惑。我中心开展抗HLA抗体检测已十多年,是国内首个获得美国组织相容性及免疫遗传学协会(ASHI)认证的HLA配型实验室。笔者通过对2例临床送检HLA抗体检测的结果分析,探讨抗HLA抗体检测的规范化和质量控制对临床诊疗的重要性。

一、病例

例1,男,26岁,诊断急性髓系白血病(AML)M_{2a},行HLA-8/10相合(A、C位点错配)单倍型造血干细胞移植(haplo-HSCT),移植后33d因肠道GVHD伴血小板减少(PLT 8×10⁹/L)而送检抗体检测。混合抗体筛查实验结果显示:阴性对照(NC)=31,阳性对照(PC)=9387,PC/NC=302,最高一个#50微珠荧光强度(MFI)为190,故判读为抗体阴性;特异性抗体检测结果显示:HLA-DQ9、DQ8、DQ4、DQ7的MFI值分别为7203、6525、6504、6208,判读为HLA-II类抗体阳性。以上两个实验结果不

一致的原因:混合抗体筛查实验灵敏度低导致抗体检测的假阴性结果,而特异性抗体检测是判断抗体阳性的金标准。

例2,男,1岁,诊断湿疹血小板减少伴免疫缺陷综合征(WAS综合征),脐血干细胞移植前混合抗体筛查,NC=1336,最高#19微珠MFI值为1056,#97微珠MFI值为2918,因NC背景值高,无法判断此实验结果为阴性或阳性,故采用吸附珠子吸附后再次检测,NC降至195。特异性抗体检测结果:HLA A25抗体的MFI值为18781,B38抗体的MFI值为6946,判读为HLA-I类抗体阳性。造成实验中NC值高的原因是患者非空腹状态采血或血清中存在变性蛋白干扰检测结果。

以上两个病例提示,必须进行从样本采集开始的全流程质量控制,才能保证HLA抗体检测和结果分析符合临床诊断和治疗的要求。

二、重视抗HLA抗体检测的规范化

(一)HLA和HLA抗体

1. HLA:抗原分天然抗原、人工抗原、胸腺依赖和非胸腺依赖抗原、超抗原。天然抗原分自身抗原和异己抗原,在异己抗原中包括微生物及其代谢产物的异种抗原、异嗜性抗原、肿瘤抗原等。HLA为同种异体抗原,受控于主要组织相容性系统,异己HLA是引起移植物排异的主要移植抗原,且抗原性最强。

2. HLA抗体:抗体是生物学功能概念,是免疫

应答中的重要产物,主要存在于体液中且具有免疫功能,抗体介导的免疫称为体液免疫。HLA抗体分为HLA-I类抗体(包括HLA-A、B、C位点的抗体)和HLA-II类抗体(包括DR、DQ、DP位点的抗体)两类。

3. 抗体产生的原因:25%~30%的患者在输血后产生抗体,其中90%~95%为HLA抗体,5%~10%为抗血小板抗体。女性妊娠后可产生抗HLA抗体,国内研究报告占10%~15%,并且随着妊娠次数的增加,产生抗HLA抗体的比例增高^[4]。

(二)检测抗HLA抗体的主要方法

国内外实验室主要采用以下四种方法检测HLA抗体:①微量补体依赖性细胞毒方法(CDC);②酶联免疫吸附实验(ELISA);③流式细胞术(FCM);④免疫磁珠液相芯片(Luminex)技术。CDC法可迅速检测患者的HLA抗体,但需要分离供者细胞且敏感性低,且不能检测非补体激活的抗HLA抗体。ELISA方法无需分离细胞,敏感性也有所提高,可同时检出HLA-I类和HLA-II类抗体,但操作繁琐且费时,一次只能检测一个指标,故在临床应用中受到一定限制。FCM可同时筛选出抗HLA-I类和II类IgG、IgM抗体。该方法敏感性较高,但检测通量小,无法分辨抗体的特异性,可重复性和稳定性受技术人员的影响较大,故在临床未大规模应用。Luminex法具有高敏感性,高特异性,高通量,操作简便、快速和准确等优点,故被普遍应用于HSCT和器官移植领域,是ASHI推荐的抗HLA抗体检测方法。

(三)抗HLA抗体检测的初筛实验和确认实验

1. 初筛实验:分混合抗体(Mix)初筛和群体反应抗体(PRA)筛查实验。混合抗体检测应用体外重组合成的抗原,可初步筛查患者血清中HLA-I、HLA-II类和MICA抗体。群体反应抗体(PRA)检测是应用人的不同细胞株制备混合抗原,筛选患者血清标本中HLA-I类的HLA-A、B、Cw抗体类型和HLA-II类的DR、DQ、DP抗体类型。应用以上两种初筛实验方法进行抗体检测是以抗体阳性或阴性报告实验结果,在初筛实验中会存在一些假阳性或假阴性的结果,故实验室对于一些可疑的实验结果必须采用抗HLA特异性抗体检测方法进行确认,另外初筛实验结果也是无法判读抗体的特异性及DSA分析。各个移植中心在决定采用混合抗体或群体反应抗体检测的方法进行抗HLA抗体初筛的同时,实验室必须先建立判断抗体阳性的cut off值,

而不能把cut off值直接设定MFI值小于500为阴性。

2. 确认实验:应用来源于人的一种细胞株制备纯化的抗原进行HLA特异性抗体(SAB)检测,可明确初筛实验中可疑阳性结果,更主要是分辨血清标本中HLA抗体特异性和MFI强度。如患者血清中检测到HLA-I类抗体中的A2、B46、Cw1和HLA-II类抗体中的DR7、DQ2、DP4抗体,根据供者的HLA基因分型结果分析其细胞表面抗原类型,从而判断患者血清中抗体是否为DSA、非DSA、交叉反应或天然抗体,以及当患者血清中抗体的MFI大于8000时,临床上可作为移植的高危因素进行抗体清除治疗^[1]。因此,HLA特异性抗体检测方法是当供者拟进行HLA错配移植时,鉴定预存或新生DSA及危险度的金标准^[5]。苏州大学附属第一医院HLA配型实验室应用MFI值判断抗HLA抗体检测结果的cut off值见表1。

三、检验前、中、后的质量控制是保证HLA抗体检测结果正确性的关键

(一)检验前的质量控制

1. 样本采集、处理和保存的要求:患者空腹,采用促凝管采集外周血2~3 ml,混匀后短暂室温放置,溶血及脂血样本时必须重新采集。在收到新鲜血液标本后2500 r/min(离心半径8 cm)离心5~10 min,离心后的标本不能含有任何颗粒或残存纤维蛋白,吸取上层血清至1.5 ml离心管中,在-20℃冰箱中保存不超过1个月。推荐在抗体检测前将血清置于-80℃冰箱冻存,并将血清以15000 r/min(离心半径6.5 cm)离心10~15 min。

2. 样本核收和查询临床信息:双人核对样本来源及相关信息,针对治疗或移植前后送检的样本,特别需要查询临床信息(潜在供者的HLA基因分型结果、治疗时间和方案等),以便在分析实验结果和发报告单时判断是否存在DSA并给予必要的提示。

(二)试剂的质量控制(质控)

实验室对所有收到的试剂均需进行质控,试剂质控通过才可用于临床检测。在试剂收样表中记录收到试剂的时间、数量、质控的时间、使用时间、过期时间、使用完毕的时间及工作人员签名。通过质控后的试剂要贴有质控标识、标记试剂数量、试剂盒上有打开时间和技术人员的签名。实验室进行试剂质控样本的数量可根据各个移植中心的每年度检测抗体的标本数量决定。

当实验室收到新批号的抗体试剂时,需要根据

表1 苏州大学附属第一医院HLA配型实验室判断抗HLA抗体检测结果的荧光强度(MFI)值

指标	混合抗体筛查		群体反应抗体筛查	特异性HLA抗体	DSA或NDSA
	HLA-I	HLA-II	(HLA-I、HLA-II)	(HLA-I、HLA-II)	
可接受阴性对照	< 300	< 300	< 300	< 300	
阴性	< 500	< 300	< 500	< 1 000	
可疑阳性 ^a	> 500 ~ 1 000	> 300 ~ 1 000	500 ~ 1 000	1 000 ~ 2 000	500 ~ 1 000 ^b
阳性	> 1 000 ~ 3 000	> 1 000 ~ 3 000	1 000 ~ 5 000	> 2 000 ~ 5 000	> 1 000 ~ 3 000
中等阳性	> 3 000 ~ 8 000	> 3 000 ~ 5 000	5 000 ~ 8 000	> 5 000 ~ 8 000	> 3 000 ~ 5 000
强阳性	> 8 000	> 5 000	> 8 000	> 8 000 ~ 10 000 ^c	> 5 000 ~ 8 000 ^d

注:DSA:抗供者特异性HLA抗体;NDSA:非供者特异性HLA抗体。^aHLA-I、II类微珠包被抗原强弱不同,约50%以上MFI值处于可疑阳性范围经HLA特异性抗体检测确认为抗体阳性^[2],^b当抗体的MFI值>10 000时需将血清重新稀释后再次检测,当患者从移植前抗体阴性转变成阳性,即使其抗体MFI值处于判断可疑阳性范围时,也需要提示临床密切随访;^c当患者移植前后DSA的MFI值>8 000或持续阳性,需要临床重视且视病情危重情况进行抗体清除处理

试剂公司提供的说明书核对与前一批次试剂的异同点(抗原类型、细胞株来源、微珠编号的变化等)。对于不同批号、相同批号不同到货时间试剂必须进行质控,而对于相同批号和到货时间而订购多支试剂的情况,推荐在实验室内部进行重复性和稳定性评估后再作决定。

(三)仪器的维护和校正

实验室应用Luminex或FCM进行抗体检测,必须建立严格的仪器维护和校正体系,因仪器的激光信号系统、光路系统、数据收集系统均可直接影响抗体检测结果,因此,每个月都必须采用标准微珠校正试剂进行仪器月维护,而每半年由专业工程师对仪器进行维护和校正。修复后的仪器必须选择至少3个不同MFI值临床样本进行检测,比对和判断仪器维修前后的检测结果是否在可接受范围。

(四)室内质控和室间质评

将HLA抗体检测结果导入分析软件后,首先分析NC、PC的MFI值,PC/NC比值,填写实验室内部质控记录表,并建议移植中心制定实验室内部的NC、PC可接受范围。

实验室在每批样本检测中,可采用两个不同水平的已知实验结果标本作为室内质控标本。质控标本覆盖整个实验全过程,可判断是否发生样本混淆、样本污染、技术人员操作失误造成假阳性或假阴性结果、评估仪器操作人员的稳定性和重复性,一旦发生上述错误,该批临床检测样本必须重新检测。

因目前国内还没有机构可以提供抗HLA抗体检测的室间质控品,故推荐可选择ASHI、美国医师协会(ACP)、美国UCLA大学免疫遗传中心提供的抗体质控血清作为实验室的外部质控标本,以此评

估该实验室在抗体检测方面的实验操作、结果分析和判断的水平。ASHI对于抗HLA抗体熟练检测(PT)合格的评判标准:该实验室与其他世界上各个中心上报结果的符合率达到80%以上。本实验室已经连续3年上报ASHI的PT结果均达到上述要求。

(五)技术人员的培训

由于抗HLA抗体检测受到技术人员能力和水平影响较大,故必须由经过Luminex相关技术及HLA基因分型培训的高年资技术人员操作。实验室至少需要专业培训3名技术人员从事抗体检测,技术人员经过个人重复性和稳定性、技术人员之间的重复性和误差性培训后,方可参与临床检测。实验室的技术人员应每年至少接受1次实验操作和解决问题能力的考核。

(六)报告单的规范化

在HLA抗体报告单中除了必须包括患者的基本信息、临床诊断、移植时间、清除抗体治疗时间、送检时间、检测试剂、实验方法外,还需要报告患者初次检测抗体的时间和结果、患者随访过程中抗体检测的时间和结果、抗体筛查的结果、特异性抗体的结果分析,以及实验结果的解释和说明,便于临床医生理解。

(七)影响抗HLA抗体检测结果分析关键因素

1. 设立判断抗体阳性的cut off值:由于各个实验室选择检测方法、选用的抗原来源和类型不同,故必须建立本实验室判断抗体阳性和划分抗体强度的cut off值。无论应用何种检测方法检测抗体,在判断抗体结果中都会存在一些模棱两可的cut off值灰区,因此,在抗体报告单中必须备注说明,建议临床进行确认实验以明确抗体是否为阳性,实验室

也可以采用两种以上的试剂复查抗体结果。

2. 设定样本阴性对照可接受的MFI值:样本阴性对照值过高,可对检测结果造成干扰,导致假阴性、假阳性结果。推荐选择以下方法降低NC背景值:冷冻血清经超速离心去除血清中的脂肪微粒;将血清使用样品稀释缓冲液包被吸附;使用吸附珠子包被,吸附后的血清再重新检测抗体,推荐使用珠子吸附的办法降低阴性对照值。如果实验室对于同一份血清标本采用两种试剂检测后阴性对照背景值高低不一致时,此情况绝大多数为技术人员洗板不净或洗涤强度不足所致。

3. 因抗原和抗体的结合达到一定的饱和度时无法正确检测到抗体的MFI值,故当患者血清中抗体的MFI值 $> 10\ 000$ 时,须对血清进行稀释后再检测和分析抗体强度。

4. 患者在移植前后抗体动态监测中一旦发现抗HLA抗体结果发生变化,特别是对于接受HLA错配供者移植的患者,即使是抗体MFI值处于实验室判断结果的cut off值灰区,也需要在报告单中进行备注,以便临床综合分析和重视。

四、抗HLA抗体检测的临床价值

1. 植入失败:无论供者HLA基因分型是否相合,患者血清检测到直接针对供者抗原的DSA是影响移植植入的重要因素。对脐血移植和非血缘供者造血干细胞移植的多因素研究发现,DSA阳性患者植入失败发生率比DSA阴性患者显著升高^[6-7]。

2. 造血重建延缓:移植前血清中检测到高MFI值的HLA抗体,特别是DSA阳性与移植后粒系、巨核系造血重建延缓有密切关系。若患者移植前无HLA抗体而移植后新生抗体,即使是低MFI值DSA和NDSA也是影响巨核系造血重建延缓重要因素之一^[7-8]。因此,抗HLA抗体是引起移植后粒系和巨核系造血重建延缓的不良因素。

3. GVHD:以往研究表明:抗HLA-I类抗体阳性儿童再生障碍性贫血患者HSCT后急性GVHD发生率较高^[2]。移植前抗HLA抗体阳性患者移植后II~IV度急性GVHD发生率显著高于阴性组,而且移植前后动态随访过程中抗HLA抗体持续阳性的患者,慢性GVHD的发生率高于其他患者^[8]。

4. 生存:移植前抗HLA抗体阳性患者移植后治疗相关死亡率升高、总生存率下降,这可能是抗体通过参与植入失败、GVHD等多项环节导致。我们以往研究发现,抗HLA抗体对AML/骨髓增生异常综合征(MDS)患者移植后生存的影响较急性淋巴

细胞白血病患者显著^[9]。2012年NMDP和CIBMT提供的选择无关错配allo-HSCT或脐血移植指导方针指出:移植前应常规进行抗HLA抗体检测和DSA分析^[9]。2018年EBMT发布了在haplo-HSCT中进行DSA检测和治疗的指导原则^[10]。

5. 对造血干细胞供者筛查抗HLA抗体的意义:若患者移植前HLA抗体阴性、供者为HLA抗体阳性,移植后早期检测到抗HLA抗体,且抗体种类与供者体内的抗体相似,提示移植后患者体内的抗HLA抗体为供者来源的致敏细胞分泌产生。这部分抗体的产生和消失有一定的规律,一般移植后1周之内逐渐上升,10~21 d达峰值,随后逐渐下降,这部分抗体的存在是患者移植后血小板无效输注的原因之一^[11]。

6. 持续抗HLA抗体阳性患者的HLA抗体检测频率:对于移植前HLA抗体强阳性和存在DSA的患者、移植前后抗体持续阳性的患者、移植后发生巨核系造血重建延缓和GVHD等不良事件的患者,以及在抗体干预治疗前后,都需要密切观察并进一步分析HLA抗体特异性及MFI值的变化,便于评估治疗的有效性和及时调整治疗方案^[12-14]。建议在移植后每月检测1次抗体水平,对于抗体阳性患者可增加检测的时间点,并分析抗体的特异性和MFI值的变化。

移植前HLA抗体MFI值 $> 10\ 000$ 或DSA $> 8\ 000$ 以上的患者,必须进行清除抗体治疗。清除抗体治疗有效的标准是MFI值下降到可接受范围。特别是脐血移植和haplo-HSCT,其植入失败的发生率明显升高^[9],必要时须重新选择供者,而针对再生障碍性贫血患者即使在移植前检测到低MFI值DSA也是不能接受的^[2,8]。

总之,对于供者HLA不完全相合的HSCT,在移植前后患者血清中检测到高MFI值的DSA是影响移植的重要因素,各移植中心已经将检测抗HLA抗体作为HSCT必查项目。制定抗HLA抗体检测的相应标准,以确保HLA抗体检测结果的准确性任重而道远。

参考文献

- [1] Huo MR, Xu YJ, Zhai SZ, et al. Prevalence and risk factors of antibodies to human leukocyte antigens in haploidentical stem cell transplantation candidates: A multi-center study [J]. Hum Immunol, 2018, 79 (9): 672-677. DOI: 10.1016/j.humimm.2018.06.003.
- [2] Zhu H, He J, Cai J, et al. Pre-existing anti-HLA antibodies

- negatively impact survival of pediatric aplastic anemia patients undergoing HSCT [J]. Clin Transplant, 2014, 28 (11):1225-1233. DOI: 10.1111/ctr.12450.
- [3] Morin-Zorman S, Loiseau P, Taupin JL, et al. Donor-specific anti- HLA antibodies in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Front Immunol, 2016, 7: 307. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00307. eCollection 2016.
- [4] Masson E, Vidal C, Deschamps M, et al. Incidence and risk factors of anti- HLA immunization after pregnancy [J]. Hum Immunol, 2013, 74 (8): 946- 951. DOI: 10.1016/j.humimm.2013.04.025.
- [5] Chowdhry M, Makroo RN, Thakur Y, et, al. The good, the bad, and the ugly of luminex donor- specific crossmatch [J]. HLA, 2018, 91(6): 501-506. DOI: 10.1111/tan.13239.
- [6] 张荣莉, 郑晓辉, 周卢琨, 等. 供者特异性HLA抗体对单倍体相合造血干细胞植入的影响[J]. 中华血液学杂志, 2018, 39(3): 190-195. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2018.03.004.
- [7] Solves P, Sanz J, Freiria C, et al. Factors influencing platelet transfusion refractoriness in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Ann Hematol, 2018, 97(1): 161-167. DOI: 10.1007/s00277-017-3168-6.
- [8] Pan ZJ, Yuan XN, He J, et al. Dynamic detection of anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies but not HLA- DP loci mismatches can predict acute graft- versus- host disease and overall survival in hla 12/12-matched unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematological malignancies [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2016, 22(1): 86-95.
- [9] Spellman SR, Eapen M, Logan BR, et al. A perspective on the selection of unrelated donors and cord blood units for transplantation [J]. Blood, 2012, 120(2):259-265. DOI: 10.1182/blood-2012-03-379032.
- [10] Ciurea SO, Cao K, Fernandez- Vina M, et al. The European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) consensus guidelines for the detection and treatment of donor-specific anti- hla antibodies (DSA) in haploidentical hematopoietic cell transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 2018, 53(5): 521-534. DOI: 10.1038/s41409-017-0062-8.
- [11] Uchiyama Y, Hoshino T, Mihara M, et al. Emergence of donor-derived anti- HLA antibody and subsequent transfusion-refractory thrombocytopenia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from an HLA-matched sibling donor in a patient with acute myeloid leukemia [J]. Rinsho Ketsueki, 2013, 54(2):214-218.
- [12] Zhao X, Zhao X, Huo M, et al. Donor- specific anti- human leukocyte antigen antibodies predict prolonged isolated thrombocytopenia and inferior outcomes of haploidentical hematopoietic stem cell transplantation [J]. J Immunol Res, 2017, 2017: 1043836. DOI: 10.1155/2017/1043836.
- [13] 潘芝娟, 何军. 抗HLA抗体对异基因造血干细胞移植前后的影响[J]. 中华血液学杂志, 2013, 34(9): 812-815. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2013.09.018.
- [14] Garnier A, Delbos F, Guillaume T, et al. Rituximab for second desensitization in patients with rebound of donor-specific anti-HLA antibodies before T-replete haplo-transplant using high-dose post- transplant cyclophosphamide [J]. Bone Marrow Transplant, 2018, 53(8):1044-1047. DOI: 10.1038/s41409-018-0107-7.

(收稿日期:2018-07-10)

(本文编辑:徐茂强)

·读者·作者·编者·

作者投稿须知

1. 按本刊要求写作:登录《中华血液学杂志》网站(<http://www.hematoline.com>),参见首页作者中心栏中的“投稿须知”及“写作指导”栏目。

2. 作者注册:请打开本刊网站首页点击“在线投稿”即进入中华医学会网站(<http://cmaes.medline.org.cn>)。在网站首页注册并申请为杂志作者(用户名和密码为您在中华医学会统一的登录信息,请牢记!忘记密码可通过电子信箱索取)。

3. 投稿:注册成功后进入“业务中心”。点击【远程稿件管理系统】,相应的功能即显示在下方。点击“作者投稿”,按要求填写内容,摘要在字数允许范围内尽可能详细,并上传原稿(点击“暂存”稿件进入【我的草稿】模块)。选择《中华血液学杂志》,并点击“投稿”。

4. 邮寄纸稿及介绍信:请在投稿平台上下载论文投送介绍信及授权书,签字盖章后连同原稿打印件(注明稿件编号)一并寄至本刊编辑部。

本刊编辑部