

Mari Haugan Jerpstad og Kristine Green Svinvik

DTT-behandling av erythrocytter hos pasienter behandlet med DARA

Bacheloroppgave i Bioingeniørfag

Veileder: Anne Lise Hjertø

Mai 2020

NTNU
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag

Mari Haugan Jerpstad og Kristine Green Svinvik

DTT-behandling av erythrocytter hos pasienter behandlet med DARA



Bacheloroppgave i Bioingeniørfag
Veileder: Anne Lise Hjertø
Mai 2020

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioingeniørfag



Kunnskap for en bedre verden

DTT-behandling av erythrocytter hos pasienter
behandlet med DARA

*DTT-treatment of erythrocytes for patients
treated with DARA*

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU)

Norwegian University of Science and Technology

Fakultet for Naturvitenskap, Institutt for Bioingeniørfag

Trondheim, 2020

Mari Haugan Jerpstad

Kristine Green Svinvik

Forord

Oppgaven er gitt av Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin (AIT), seksjon blodbanken ved St. Olavs Hospital i Trondheim. Oppgaven er utført som avsluttende bacheloroppgave ved Fakultet for Naturvitenskap, Institutt for Bioingeniørfag ved NTNU i Trondheim. Den opprinnelige oppgaven inneholdt en praktisk del som skulle utføres på St. Olavs lokaler. Den praktiske delen var ikke mulig å gjennomføre i det gitte tidsrommet, som følge av tiltak knyttet til korona-pandemien. Oppgaven ble derfor endret fra en praktisk metodevalidering til en teoretisk litteraturgjennomgang av temaet etter prosessoppstart.

Vi ønsker å takke våre veiledere under denne perioden. Førstelektor ved Institutt for Bioingeniørfag, Anne Lise Hjertø. Anne Lise var svært hjelpsom under selve skriveprosessen, og viste evne til fleksibilitet og stabilitet da gjennomføringen av oppgaven var usikker. Vi ønsker også å takke de faglige veilederne våre ved AIT på St. Olavs Hospital, Lege i Spesialisering (LIS), Nora Straumfors, og Lege i Spesialisering (LIS), Anders Nikolai Åsberg. Nora og Anders var behjelpelig med den medisinskteoretiske delen av oppgaven, og veiledet oss gjennom den litteraturmetodiske prosessen. Vi har kun møtt våre fagveiledere digitalt, men har klart å opprettholdt en god dialog til tross for kun digitale møter. Vi ønsker også å rette en takk til Maris søster, Sigrid, for rettleiding angående det skrivefaglige.

Trondheim, 20.05.2020



Mari Haugan Jerpstad



Kristine Green Svinvik

Sammendrag

Det opprinnelige formålet med oppgaven var å validere en ny metode som kunne tas i bruk ved rutinemessig blodbankarbeid på St. Olavs Hospital i Trondheim. Daratumumab (DARA) er et legemiddel som benyttes ved behandling av myelomatosepasienter. Blodtransfusjon til myelomatosepasienter behandlet med anti-CD38 (DARA), er en utfordring fordi anti-CD38 vil kunne gi falske positive svar ved antistoffscreening og utvidet forlik. Dithiothreitol (DTT)-behandling av erythrocytter er en metode som kan redusere DARA-interferens, og dermed sikre trygg utlevering av blodprodukter til denne pasientgruppen. Ettersom den praktiske delen av oppgaven ikke var mulig å gjennomføre, ble oppgaven omgjort til en litteraturgjennomgang av tema. Formålet med oppgaven ble endret fra å validere en ny metode, til å gjennomgå litteratur som kunne svare på om det var hensiktsmessig for St. Olavs å innføre DTT-metoden.

For å innhente litteratur ble det benyttet ulike søkemotorer, tilsendt litteratur fra St. Olavs, og kontaktpersoner ved andre sykehus. Søkemotoren PubMed ble primært brukt til innhenting av litteratur, med Google og Google Scholar som supplerende søkemotorer. Tilsendt litteratur fra fagpersoner inneholdt prosedyrer og presentasjoner som ikke lå offentlig tilgjengelig på nett. I tillegg ble det tatt kontakt med Oslo Universitetssykehus, Stavanger Universitetssjukehus og Haukeland sykehus.

Den internasjonale valideringsstudien i 2016, utført av amerikanske forskere, konkluderte med at DTT-metoden kunne innføres verden over. Andre studier støttet opp om at DTT-metoden er en robust og enkel metode. En viktig faktor var også at å innføre metoden kunne redusere kostnadene betraktelig. I senere tid er det også blitt undersøkt om DARA-interferens kan elimineres med andre metoder, slik som BMAP eller ved bruk av DARA-Fab. DTT-metoden har allerede vært i bruk i en rekke andre norske sykehus.

DTT-metoden gjør det tryggere å gi blodprodukter til myelomatosepasienter behandlet med DARA. DTT-metoden er bedre enn fenotypering og genotyping på flere områder. På bakgrunn av våre funn kan vi anbefale å innføre DTT-metoden for St. Olavs. En metodevalidering bør gjøres i forkant, slik som allerede planlagt. En alternativ mulighet er å undersøke andre metoder som også bevarer alle andre antigener på erythrocyttene.

Abstract

The initial purpose of this bachelor thesis was to validate a new method to be used at the blood bank at St. Olavs Hospital in Trondheim, Norway. Daratumumab (DARA), is used as treatment for multiple myeloma patients, and interferes with routine blood bank testing, such as antibody screening and crossmatching. Dithiothreitol (DTT)-treatment of erythrocytes is a method that can mitigate the DARA interference, and therefore make transfusion of blood safer for multiple myeloma patients treated with DARA. The aim of this thesis was changed after starting the writing proses. Instead of validating the DTT-method for St. Olavs Hospital, we conducted a literature review of the topic. Based on the review we were able to conclude on whether it is appropriate for St. Olavs Hospital to adopt the DTT-method.

We used three different search engines to collect literature. In addition, we received literature from experts on the subject and contacting people from other hospitals. Primary the search engine PubMed was used for collecting literature, with supplementary content from Google and Google Scholar. The literature we received from experts on the subject was mainly procedure manuals and presentations that were not available on the internet. We also got in contact with Oslo Universitetssykehus, Stavanger Universitetssjukehus and Haukeland sykehus. All information was collected through the internet since libraries were closed during this period.

In 2016, the international validation study concluded that the DTT-method is a great approach to reduce DARA interference worldwide. This was confirmed by other studies. The studies concluded that DTT would reduce costs while keeping good specificity and sensitivity in blood bank testing. It has also been examined if other methods could eliminate DARA interference. Examples is the use of DARA-Fab fragments or the BMAP-method. Other blood banks in Norway has already taken the DTT-method in use.

The DTT-method makes it possible to distribute suitable blood products for multiple myeloma patients treated with DARA. DTT-treatment is safer than pheno- and genotyping. Based on the literature review and interviews, we conclude that the DTT-method is appropriate for St. Olavs Hospital to introduce. A validation of the method should be done as initially planned. However, one could also consider other methods that also preserves other antigens on the erythrocytes.

Innholdsfortegnelse

Forord	I
Sammendrag.....	II
1 Innledning	1
1.1 <i>Kreftsykdommen myelomatose</i>	<i>1</i>
1.1.1 Patofysiologi myelomatose	1
1.1.2 Symptomer på myelomatose	1
1.1.3 Forekomst av myelomatose.....	2
1.1.4 Diagnostikk av myelomatose	2
1.1.5 Behandling for myelomatose.....	3
1.1.6 Immunterapi mot myelomatose	3
1.2 <i>Antigenet CD38.....</i>	<i>4</i>
1.3 <i>Immunterapi med Daratumumab</i>	<i>4</i>
1.3.1 Virkningsmekanismer	4
1.4 <i>Problemstillinger knyttet til blodtransfusjon hos myelomatosepasienter behandlet med DARA</i>	<i>6</i>
1.4.1 Normalt forløp ved blodtransfusjon	6
1.4.2 Utfordring ved pretransfusjonsundersøkelser hos pasienter behandlet med DARA	7
1.5 <i>Genotyping eller fenotyping av pasienter behandlet med DARA</i>	<i>8</i>
1.5.1 Metodeprinsipp genotyping.....	8
1.5.2 Metodeprinsipp fenotyping	8
1.5.3 Biologisk forlik etter geno- eller fenotyping	9
1.6 <i>DTT behandling av erythrocytter for pasienter behandlet med DARA</i>	<i>9</i>
1.6.1 Metodeprinsipp DTT.....	9
1.6.2 Utvidet forlik etter DTT behandling av erythrocyttene	9
1.7 <i>Problemstilling.....</i>	<i>10</i>
2 Materiale og metode	11
2.1 <i>Litteraturljennomgang</i>	<i>11</i>
2.1.1 Beskrivelse av søkemotorer og søkeord	11
2.1.2 Litteratursøk med Google.....	11
2.1.3 Litteratursøk med Google Scholar	12
2.1.4 Litteratursøk med PubMed.....	12
2.2 <i>Innhenting av informasjon fra fagpersoner</i>	<i>12</i>
2.2.1 Tilsendte dokumenter	12
2.2.2 Kontakt med fagpersoner	13

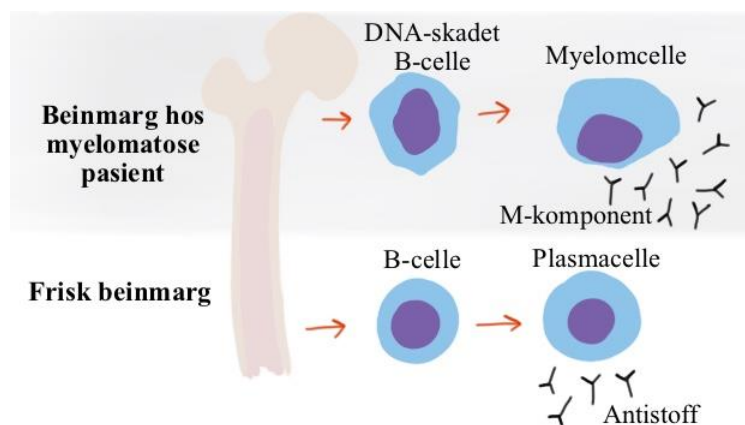
3	Resultater	14
3.1	<i>Hvordan hindre DARA-interferens</i>	14
3.2	<i>Internasjonal valideringsstudie av DTT-metoden.....</i>	15
3.3	<i>Retningslinjer for holdbarheten av DTT-behandlede erythrocytter.....</i>	17
3.4	<i>Case-rapport ved bruk av DTT-metoden</i>	17
3.5	<i>Utvidet holdbarhet av DTT-behandlede erythrocytter til 28 dager</i>	18
3.6	<i>Utvidet holdbarhet av DTT-behandlede erythrocytter til 33 dager</i>	19
3.7	<i>Modifisert DTT-prosedyre fra Danmark.....</i>	20
3.8	<i>Oska-metoden: 0,01 mol/L DTT konsentrasjon for å bevare Kell</i>	21
3.9	<i>Kostnadsstudie DTT versus genotyping</i>	21
3.10	<i>Andre metoder for å hindre DARA-interferens</i>	22
3.10.1	<i>Antistoff blokkering (BMAP) for å hindre DARA-interferens.</i>	22
3.10.2	<i>Tilsetning av DARA-Fab for å hindre DARA-interferens</i>	22
3.11	<i>Bruk av DTT-metoden ved andre sykehus i Norge.....</i>	23
4	Diskusjon.....	24
4.1	<i>Kildekritikk.....</i>	25
5	Konklusjon	27
6	Referanseliste	28

1 Innledning

1.1 Kreftsykdommen myelomatose

1.1.1 Patofysiologi myelomatose

Myelomatose er en malign tilstand hvor plasmaceller muterer til det som kalles myelomceller. Plasmaceller er en type leukocytter som produserer antistoffer. Plasmaceller produseres i benmargen i store knokler, slik som brystbenet, kragebenet, ribbena, ryggraden, bekkenet og i enden av lange knokler som armer og lår (Kreftforeningen, 2019). Plasmaceller finnes også fritt i blodbanen etter modning. Ved myelomatose får plasmaceller endret sitt DNA, som fører til at cellene deler seg ukontrollert og unngår apoptose. Den muterte plasmacellen er opphavet til myelomcelleklonet. Disse myelomcellene vil være identiske og produsere det samme immunglobulinet (Ig). Myelomcellene produserer store mengder av det monoklonale immunglobulinet kalt M-komponent. Immunglobulinet kalles først M-komponent når det blir funnet i urin eller blod (Institutt for kreftgenetikk og informatikk OUS, 2020a). Utskillelsen trenger ikke alltid å være komplette Ig, den kan også være av lette kjeder. Disse proteinene kalles Bence-Jones (Institutt for kreftgenetikk og informatikk OUS, 2020b).



Figur 1.1: Produksjon av plasmaceller hos en frisk person, og produksjon av myelomceller til en myelomatosepasient (egen illustrasjon).

1.1.2 Symptomer på myelomatose

Den store ekspansjonen av myelomceller tar over produksjonskapasiteten i benmargen slik at erytrocytter og andre leukocytter blir fortrent. Dette gir pasienten anemi og nedsatt immunforsvar (Schjesvold, 2019). Det store antallet myelomceller bryter også ned benvevet som kan føre til smertefulle brudd og hyperkalsemi i både blod og urin. Benskjørheten

kommer av at myelomcellene skaper en ubalanse i bennedbrytningen og -oppbyggingen. Ubalansen er forårsaket av at osteoklastaktiviteten øker, mens osteoblastaktiviteten blir inhibert (Sezer, 2009). En del myelompasienter får nyreskader og andre organskader grunnet den høye konsentrasjonen av kalsium, M-komponent og Bence-Jones proteiner. Høy konsentrasjon av disse stoffene fører til avleiring i nyrene og andre organer som igjen fører til skade i vev. Blodet kan også få høy viskositet på grunn av mye Ig. Mer viskøst blod kan føre til sirkulasjonsforstyrrelser (Jost, 2020).

1.1.3 Forekomst av myelomatose

I 2018 var insidensen 8 nye tilfeller av myelomatose pr. 100 000 innbygger. Fra perioden 2002 til 2018 har forekomsten vært stabil ved justering etter befolkningsvekst og større andel eldre i befolkningen. Myelomatose er i utgangspunktet uhelbredelig, men de fleste pasientene lever med kreftsykdommen i flere år med god livskvalitet. Overlevelsesraten for minst 5 år har økt fra 35 til 51 prosent i perioden 2002-2018. Yngre pasienter i alderen 18 – 64 år har vesentlig høyere overlevelsesrate, på 70 prosent. Overlevelsen reduseres med alder, noe som gir en total overlevelsesrate på 51 prosent (Årsrapport for lymfoide maligniteter 2018, 2019)

1.1.4 Diagnostikk av myelomatose

Det er flere analyser som kan tas i bruk for å diagnostisere myelomatose. Ofte blir flere tester og prøvesvar brukt sammen for å bekrefte kreftsykdommen. Utredning kan gjøres med CT-røntgen av skjelett, som viser ekspansjon av benmargen eller benskjørhet. Den mest vanlige metoden for å påvise myelomatose er utstryk og farging av benmargsprøver. Utstrykene påviser myelomceller ved mikroskopi. Benmargsutstryk er anbefalt metode av kreftregisteret (Årsrapport for lymfoide maligniteter 2018, 2019). Blodprøver som viser høy senkning og lav hemoglobinverdi kan også være en indikasjon. Hos pasienter med vedvarende uoppdaget myelomatose kan nyrefunksjonen være dårlig. Hos myelomatosepasienter kan kalsium være høy i blod og urin. Et annet typisk tegn på myelomatose er funn av M-komponent i urin og blod. Mengden av dette immunoglobulinet kan fungere som et indirekte mål på mengde myelomceller da det er myelomcellene som produserer M-komponent. Vurdering av M-komponent er mer brukt til oppfølging av sykdommen (Kreftforeningen, 2019).

1.1.5 Behandling for myelomatose

Siden myelomatose er en uhelbredelig krefttype, går behandlingen ut på å forhindre symptomer og bedre livskvaliteten til pasienten, mer enn å bekjempe sykdommen. Det viktigste målet er å bremse utviklingen. Sykdomsforløpet er langsomt, behandling er derfor ikke nødvendig før pasienten har fått symptomer (Kreftforeningen, 2019).

Cellegift kan gis, ofte sammen med kortison for å fjerne de fleste symptomene pasienten måtte ha. Når cellegiften har gitt ønsket effekt, dvs. at symptomene har blitt såpass milde eller forsvunnet helt, stoppes behandlingen. Den gjenopptas når symptomene kommer tilbake. Benmargen er veldig følsom for cellegift, men noen ganger kan det være ønskelig å tilføre en høy dose for å få bedre effekt. Ved høydosebehandling med stamcellestøtte (HMAS) tas stamceller ut fra benmargen før behandling. Stamcellene blir fryst ned og tatt vare på. Etter behandling med cellegift vil de nedfrosne stamcellene bli tilført pasienten slik at benmargsfunksjonen kan bygges opp igjen. Denne behandlingen er veldig krevende og forutsetter at pasienten er i relativ god form. Det er derfor helst de yngre pasientene som får tilbud om denne typen behandling. Strålebehandling gis ved skjelettsmerter da dette har vist god effekt. Behandlingen får svulstene til å krympe slik at skjelettet klarer å bygge seg opp igjen (Oslo universitetssykehus, 2017).

Etter behandling sliter ofte pasienter med komplikasjoner som lav hemoglobin, infeksjon, nyresvikt, benbrudd og hyperkalsemi. Det blir gitt behandling og oppfølging av de forskjellige komplikasjonene. En del av pasientene får vedvarende lav hemoglobinkonsentrasjon. I likhet med leukemipasienter blir produksjonen i beinmargen fortrengt slik at nydanning av erytrocytter blir redusert. I tillegg vil også cellegiften drepe friske celler som deler seg raskt, eksempelvis blodceller. Derfor vil myelompasienter trenge blodoverføring, både på grunn sykdommen og behandlingen. Siden myelomatosepasientene kan trenge flere blodoverføringer i sykdomsforløpet, er det stor fare for dannelse av irregulære antistoff. Det vil være vanskelig å finne forlikelig blod for disse pasientene (Kreftforeningen, 2019).

1.1.6 Immunterapi mot myelomatose

Det forskes og jobbes kontinuerlig med forbedring av behandling for myelomatosepasienter. En av de største nyvinningene i moderne medisin er immunterapi, som mange

myelomatosepasienter behandles med i dag. Prinsippet for immunterapi er å utnytte pasientens eget immunsystem for å bekjempe kreftsykdommen (Sharma et al., 2017). I denne oppgaven omtales immunterapi for myelomatosepasienter med Daratumumab (DARA). DARA er et monoklonalt antistoff mot antigenet CD38 som finnes på overflaten av myelomcellene. Antistoff-antigen bindingen fører til en immunrespons hos verten. Immunterapi med DARA er nærmere forklart i kapittel 1.3.

1.2 Antigenet CD38

CD38 er et transmembran glykoprotein type II. Proteinet har en kort N-terminal cytoplasmisk sekvens, og et lengre ekstracellulært domene (Malavasi et al., 1994). Massen til CD38 er 46 kDa, hvorav N-terminalen består av 22 aminosyrer, og det ekstracellulære domenet består av 256 aminosyrer. Antigenet uttrykkes normalt hos erytroide og myeloide celler i et tidlig stadie, B-celler, thymocytter, aktiverte T-celler, og NK-celler. Under normale tilstander i kroppen er ikke CD38 uttrykt i særlig stor grad (Deaglio et al., 2001). Ved myelomatose derimot er CD38 overuttrykt på myelomceller.

CD38 har en funksjon i regulering av celleaktivering, differensiering og proliferasjon hos hematopoetiske stamceller og andre tidlig-stadie hematopoetiske celler (Faramarz. Naeim, 2013). Mer spesifikke funksjoner som CD38 har er reseptor-mediert adhesjon, celledisagregasjon, og ectoenzymatisk aktivitet som bidrar til normalt intracellulært kalsiumnivå (Malavasi et al., 1994). Siden CD38 er uttrykt i større grad hos myelomceller, og dens funksjon i celledisagregasjon, er CD38 et potensielt angrepspunkt for immunterapi.

1.3 Immunterapi med Daratumumab

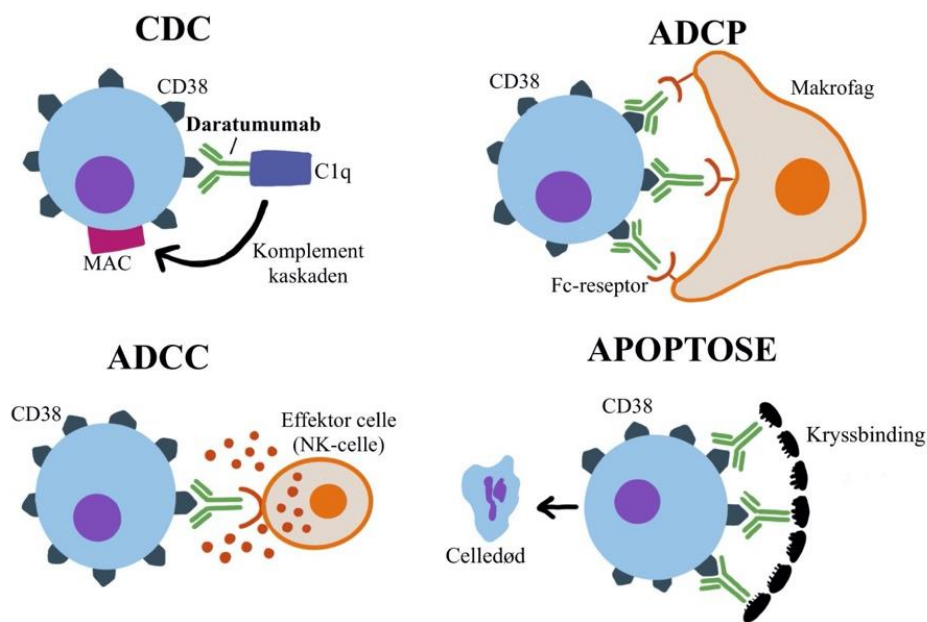
Daratumumab (DARA) er en type monoklonalt antistoff anti-CD38, mot antigenet CD38 (de Weers et al., 2011). DARA lager et kompleks med CD38 antigenet hos både myelomceller og erytroide celler. Anti-CD38 vil effektivt degenerere tumorceller via flere mekanismer. For at antistoffbehandling skal kunne fungere må antistoffet ha både cytostatiske og cytotoksiske egenskaper (Parren & van de Winkel, 2008).

1.3.1 Virkningsmekanismer

Sammen med å forstyrre celledisagregasjon gjennom bindingen mellom anti-CD38 og CD38, vil også DARA aktivere cytotoksisk-immun-effektor-funksjoner, slik som *Ab-dependent*

cellular cytotoxicity (ADCC) og *complement-dependent cytotoxicity* (CDC) (de Weers et al., 2011). Sammen med ADCC og CDC, induserer også DARA *antibody-dependent cellular phagocytosis* (ADCP) (Sanchez et al., 2016). Til samme utgjør dette tre forskjellige mekanismer.

Via (1) CDC-veien binder DARA seg til CD38 på myelomcellen. Fc-fragmentet binder seg til C1b i komplement-kaskaden som resulterer i MAC (membrane attack complex). MAC danner en transmembran kanal som trekker ekstracellulær væske inn i cellen. Det endelige resultatet av MAC dannelse er lysering av myelomcellen (Lea, 2006). Via (2) ADCC veien binder DARA seg til Fc-fragmentet og er da bundet til FcR-fragmentet i effektor-cellen (NK-celle), effektor-cellen aktiverer dermed en cytotoxisk prosess. Via (3) ADCP binder DARA seg til CD38, og dets Fc-fragment binder seg deretter til FcR-fragmentet til makrofager, dette induserer fagocytose. Den siste mekanismen for destruksjon av myelomcellene er apoptose. FcR-mediert kryssbinding av DARA induserer direkte apoptose (Laubach & Richardson, 2015).



Figur 1.2: Ulike virkningsmekanismer for DARA (egen illustrasjon).

Selv om DARA er et godt behandlingsalternativ for myelomatosepasienter er det enkelte pasienter som ikke responderer bra på behandlingen, og dermed ikke får like god prognose i sykdomsforløpet. Deregulering i noen av de mekanismene nevnt ovenfor er årsaken til

DARA-resistens (Saltarella et al., 2020). Noen pasienter utvikler resistens etter bruk av medikamentet over tid. Behandling med DARA fortsettes til pasienten får bedret sykdomsbilde.

1.4 Problemstillinger knyttet til blodtransfusjon hos myelomatosepasienter behandlet med DARA

1.4.1 Normalt forløp ved blodtransfusjon

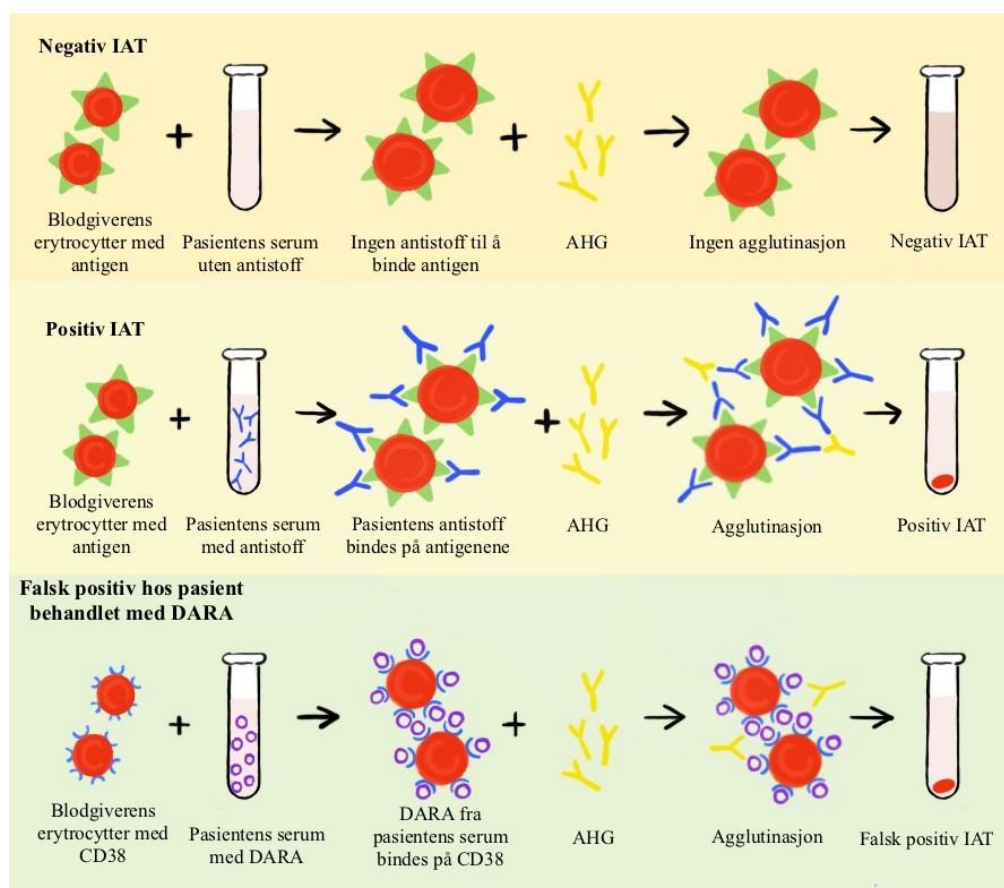
Alle pasienter som skal motta blodprodukter må ABO- og RhD-types, samt antistoffscreenes. Det finnes i hovedsak tre ulike teknikker for typing og screening: gel-kort-teknikk, tube-teknikk og solid-fase-teknikk. Ved St. Olavs benyttes gel-kort-teknikk. Antistoffscreening består av å screene pasienten for irregulære blodtypeantistoffer. Irregulære blodtypeantistoffer er antistoffer som opptrer etter at pasienten har blitt utsatt for fremmede blodtypeantigen. Immunisering kan skje i forbindelse med graviditet eller tidligere transfusjon. Irregulære blodtypeantistoffer opptrer ofte hos myelomatose-pasienter, siden de ofte trenger flere blodtransfusjoner gjennom sykdomsforløpet. Irregulære blodtypeantistoffer kan føre til hemolytisk transfusjonsreaksjon hos pasienten dersom man ikke tar hensyn til det når blodprodukter gis til pasienten (Hervig, 2017).

Antistoffscreeningen består av å inkubere tre kommersielle screeningceller sammen med plasma fra pasienten. Screeningceller er erythrocytter med kjente antigenuttrykk. Dersom man får en positiv reaksjon, altså synlig agglutinasjon, må man kjøre en utvidet antistoffundersøkelse, som kalles antistoff-identifisering. Antistoff-identifisering benytter samme prinsipp som antistoffscreeningen, bare med økt antall kommersielle screeningceller. Ved positiv reaksjon kan irregulært blodtypeantistoff identifiseres.

Når pasienten er blitt ABO- og RhD- typet, samt screenet for irregulære antistoffer, skal det velges blod til pasienten som er mest mulig forlikelig med blodet fra blodgiveren. I denne oppgaven er kun transfusjon av erythrocyttkonsentrat omtalt. Det velges blod som er negativt for det antigenet det irregulære antistoffet i blodet hos pasienten er rettet mot. I gelrør settes erythrocytter fra aktuelle blodgivere opp mot pasientens plasma for å se om det skjer en agglutinasjon som følge av antigen-antistoffbinding. Denne prosessen kalles utvidet forlik. Utvidet forlik må være negativt for at blodet kan transfunderes til pasienten (Helsedirektoratet, 2017).

1.4.2 Utfordring ved pretransfusjonsundersøkelser hos pasienter behandlet med DARA

Som beskrevet i kapittel 1.1 kan myelomatosepasienter ha behov for blodtransfusjon. Med hensyn til blodtransfusjon vil ikke CD38 hos erytroide celler forårsake hemolyse hos pasienten, siden anti-CD38 ikke produseres normalt hos noen blodgivere. Ved normalt forløp til blodtransfusjon skal irregulære antistoff screenes hos pasienten. Dette gjøres med en indirekte Coombs test (IAT). Hos pasienter behandlet med DARA opplever man falske positive IAT tester (Chapuy et al., 2015). Anti-CD38 i pasientens plasma binder seg til erythrocytter i screenings- og identifiseringspanel. Hvordan DARA interfererer med IAT er illustrert i figuren under. Antihumanglobulin er forkortet til AHG.



Figur 1.3: Hvordan DARA interfererer med IAT (egen illustrasjon).

På bakgrunn av falsk positiv IAT er det ikke mulig å identifisere irregulære blodtypeantistoff, og utvidet forlik vil også være falsk positivt. Hos denne pasientgruppen vil det derfor være vanskelig å finne forlikelig blod. Effekten av anti-CD38 på pretransfusjonsundersøkelser varer i opptil 6 måneder, også dersom behandlingen er avsluttet (Oostendorp et al., 2015).

Utfordringen med å finne forlikelig blod vil føre til økt tidsbruk og økt usikkerhet før og under transfusjon. For å sikre at myelomatosepasienter behandlet med DARA får trygg blodtransfusjon benyttes det i dag to forskjellige metoder. Den ene er genotyping eller fenotyping av pasientenes erythrocytter, den andre metoden er DTT-behandling av erythrocytter. Hvert enkelt laboratorium avgjør hvilken metode som benyttes.

1.5 Genotyping eller fenotyping av pasienter behandlet med DARA

På Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin (AIT) ved St. Olavs Hospital har de valgt å fenotype eller genotype alle de aktuelle pasientene for en stor andel klinisk viktige blodtypeantigener. Dette arbeidet sikrer at det er mulig å utlevere mest mulig fenotypelikt blod. Fenotypelikt blod vil si at blod fra blodgiver og blod fra pasient har flest mulig like blodtypeantigener. Det er ikke mulig å finne blodgiver og pasient som har 100% match. Det er derfor alltid en sjanse for at pasienten kan ha et irregulært blodtypeantistoff som reagerer med blodtypeantigenet til blodgiveren.

1.5.1 Metodeprinsipp genotyping

Genotyping er også ofte omtalt som genetisk blodtypering. For å identifisere HEA (human erytroide antigen) benyttes en PCR- og hybridiseringsbasert genotypetest. Ulike identifiseringspanel kan determinere ulike antall HEA avhengig av hvilket panel man velger å bruke. Aktuelle HEA man ønsker å teste for kan være antigener i blodtypesystemene Rh, Kell, Kidd, Duffy, MNS, Diego, Dombrock, Colton, Cartwright og Lutheran. Avhengig av panelene fører genotyping til fullstendig fenotyping, altså at man finner nøyaktig hvilke antigener som finnes på overflaten av erythrocyttene hos pasient/blodgiver (Gorakshakar et al., 2017).

1.5.2 Metodeprinsipp fenotyping

Fenotyping er en immunhematologisk-undersøkelse som bygger på hemagglutinasjonsprinsippet. HEA vil agglutinere med tilsvarende antistoff vha. antihumanglobulin reagens/Coombs reagens (AHG), dette vil gjøre utslag på IAT. Fenotyping forutsetter at man tilsetter et spesifikt antistoff for hvert antigen. Ved fenotyping velger man altså ut på laben hvilke antistoffer man ønsker å benytte, og velger på bakgrunn av dette mest mulig fenotypelikt blod med giveren å gi til pasienten.

1.5.3 Biologisk forlik etter geno- eller fenotyping

Etter at feno- eller genotypelikt blod er funnet må erythrocyttkonsentrat til myelomatosepasienter transfunderes med biologisk forlik. Biologisk forlik er en metode der det først transfunderes 10-20 mL feno- eller genotypelikt blod fra blodgiver, transfunderingen stoppes og pasienten blir observert i 10 minutter. Dersom pasienten ikke har noen tegn til transfusjonsreaksjon fortsettes transfusjonen sakte under overvåkning. Noen av kjennetegn på akutt hemolytisk transfusjonsreaksjon (AHTR) er rødflammet ansikt, blodtrykksfall, blekhet, ikterus, oliguri eller anuri, diffuse blødninger og mørk urin (Hervig, 2017).

1.6 DTT behandling av erythrocytter for pasienter behandlet med DARA

Siden myelomatosepasienter som er behandlet med DARA kan medføre falske positive IAT ved scening- og identifisering av irregulært blodtypeantistoff, er det utviklet flere metoder som nøytraliserer effekten av anti-CD38. En av de mest robuste metodene er DTT (dithiotreitol)-behandling av myelomatosepasientens erythrocytter (Chapuy et al., 2015). Andre metoder for nøytralisering er papain (Carreño-Tarragona et al., 2019) eller Manual Polybrene (Yeh et al., 2019). Manual Polybrene er den anbefalte metoden i Asia siden DTT vil redusere sensitiviteten til å finne antistoffer som er vanlig i Asia, slik som anti-Miltenberger (anti-Mia). DTT-metoden er den mest utbredte og aksepterte for bruk hos den kaukasoide rase.

1.6.1 Metodeprinsipp DTT

DTT er et virkestoff som destruerer disulfidiske bånd i CD38, og denaturerer dermed den tertiære strukturen til antigenet. Siden strukturen ødelegges, vil evnen til å binde antistoff avta. Når proteinstrukturen til CD38 er ødelagt, vil ikke DARA lenger kunne interferere med IAT ved blodbankarbeid. DTT denaturerer imidlertid også ulike blodtypeantigener. Disse er Cartwright (Yta), John Milton Hagen (JMH), Knops (Kna, McCa, YKa), Landsteiner Wiener (LWa), og alle Kell, Lutheran, Drombrock og Cromer antigener (Dizon, 2017). Antigenene rammes i ulik grad av DTT-behandlingen, og antigenene fører til ulik immunrespons dersom pasienten mottar uforlikelig blod. Som hovedregel gis det ut Kell-negativt blod, selv om screeningen er negativ (Chapuy et al., 2016).

1.6.2 Utvidet forlik etter DTT behandling av erythrocyttene

DTT vil fjerne det meste av cellebundet CD38. CD38 vil dermed ikke føre til falske positive IAT. Etter blodgiverens erythrocytter er behandlet med DTT kan man dermed utføre

pretransfusjonsundersøkelser og utvidet forlik uten fare for falske positive svar. DTT-behandlingen vil øke sikkerheten ved utlevering av blod, og bioingeniør og lege kan være trygge på at pasienten mottar blod som er fra en mest mulig forlikelig giver.

1.7 Problemstilling

Blodtransfusjon til myelomatosepasienter behandlet med anti-CD38 (DARA), er en utfordring fordi anti-CD38 vil kunne gi falske positive svar ved antistofscreening og utvidet forlik. Genotyping eller fenotyping er to metoder som ikke er optimale for sikker blodtransfusjon til pasientgruppen omtalt. DTT-behandling av erythrocytter er derfor en alternativ metode som er billigere og gir sikrere svar. I utgangspunktet skulle dette bachelorprosjektet være en metodevalidering, men på grunn av omstendighetene rundt korona-pandemien ble oppgaven omgjort om til en litteraturgjennomgang. I vår litteraturgjennomgang skal vi forsøke å svare på om det kan anbefales for St. Olavs Hospital å innføre DTT-behandling av erythrocytter. Sykehuset har tidligere forsøkt å validere metoden, men opplevde uspesifikke reaksjoner. St Olavs fikk kjennskap til at Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN) Tromsø benytter DTT-metoden, men de benytter andre gel-kort og screeningceller. Derfor var det interessant å undersøke om det var hensiktsmessig for St. Olavs Hospital å innføre metoden på nytt med andre typer gel-kort og screeningceller.

2 Materiale og metode

2.1 Litteraturgjennomgang

Som en konsekvens av nedstenging av campus var ikke Biblioteket for Medisin og Helse for studenter og ansatte ved St. Olavs Hospital åpent under oppgaveperioden. All litteratur brukt i oppgaven ble derfor innhentet digitalt, og ved bruk av NTNUs Virtuelle Private Nettverk (VPN). I forkant av oppgaveskrivingen fikk vi tilsendt ulike artikler og dokumenter fra overlege ved AIT St. Olavs, Barbora Dybvik. Vi tok utgangspunkt i disse artiklene for videre søk etter litteratur. Ved innhenting av litteratur ble det brukt tre ulike søkemotorer: Google, Google Scholar og PubMed.

2.1.1 Beskrivelse av søkemotorer og søkeord

Til å begynne med ble søkemotoren Google brukt til å få en bedre oversikt over DTT-behandling av erythrocytter. Deretter ble Google Scholar og PubMed mest brukt til å finne artikler som kunne gi detaljert informasjon om temaet. De aller fleste av artiklene ble funnet via PubMed, men noen artikler er også funnet via Google og Google Scholar. Det ble satt ulike kvalitetssikrende kriterier til både søkemotorene og funnene. En nærmere beskrivelse av funn og ulike kriterier er beskrevet i kapitlene nedenfor.

2.1.2 Litteratursøk med Google

Google er verdens mest brukte søkemotor. Google scanner flere ulike databaser, men filtrerer ikke søkeresultatene etter krav om kvalitet slik som akademiske søkemotorer gjør. Det er derfor viktig å være svært kildekritisk dersom Google brukes som søkemotor til innhenting av vitenskapelig litteratur. Google er en rask, enkel, og brukervennlig søkemotor. Ved hjelp av Google fant vi enkelt den danske artikkelen "*A modified DTT-protocol for eliminating DARA interference*", etter tips fra veileder. Tittelen til artikkelen ble brukt som søkeord siden denne var allerede kjent via veileder. Etter en søkeprosess, og funn av viktige artikler med PubMed og Google Scholar, ble igjen Google tatt i bruk for å finne artikler som evt. ikke kom opp etter søk hos de akademiske søkemotorene. Søkeord for å finne andre artikler enn de på PubMed og Google Scholar var: *daratumumab + dithiothreitol*. Det var gjennom dette søket at vi fant den tyske artikkelen "*Daratumumab Interference in Pretransfusion Testing Is Overcome by Addition of Daratumumab Fab Fragments to Patients' Plasma*". Artikkelen var publisert av Karger i det akademiske tidsskriftet *Transfusion Medicine and Hemotherapy*.

2.1.3 Litteratursøk med Google Scholar

I motsetning til Google, har Google Scholar et filter som gjør at det kun kommer opp søkeresultater som oppfyller visse kriterier til forfatter og akademisk innhold. Gjennom bruk av NTNUs VPN ble flere av artiklene funnet via Google Scholar tilgjengelig. Disse søkeresultatene var merket med «access by NTNU University Library». Ved søk av litteratur på Google Scholar kom som regel de samme artiklene som allerede var funnet via PubMed opp. Det kom imidlertid opp mange flere søkeresultater, men mange av disse var ikke like relevante for å svare på problemstillingen. Søkeord benyttet for å finne artikler på Google Scholar var *dithiothreitol + multiple myeloma*. Det ble ikke bruk noen artikler som kun ble funnet med Google Scholar i oppgaven. Flere av artiklene vi benytter nevner AABBs (*american association of blood bank*) tekniske manual som utgangspunkt i studien sin. For å finne den tekniske manualen ble det brukt søkeordene *technical manual of the American association*. Gjennom kobling til det elektroniske biblioteket til NTNU (Oria), ble "*Technical manual of the American Association of Blood Banks*" funnet. Manualen er ikke sitert i oppgaven, men var et nyttig utgangspunkt for å kunne forstå hva artiklene refererte til.

2.1.4 Litteratursøk med PubMed

PubMed er en søkemotor som kun inneholder biomedisinsk litteratur. Denne søkemotoren er amerikansk, og størsteparten av artiklene funnet om DARA og DTT var amerikansk. Vi fant totalt ti artikler ved å bruke søkeordene: *DTT + DARA*. Ingen av søkeresultatene var eldre enn 5 år, hvorav den eldste artikkelen var skrevet i juni 2015, og den nyeste i februar 2020. Av de ti søkeresultatene var det seks av artiklene som ble brukt. De siste fire ble sett på som irrelevant for problemstillingen. Andre søkeord var: *DTT + protocol + anti-CD38*. Ved dette søket kom det opp ett resultat som ble brukt i oppgaven. Et annet søk inneholdt: *dithiothreitol-treated red blood cells + daratumumab interference*. På dette søket kom det opp fire treff, hvor to av artiklene allerede var inkludert i oppgaven. De to siste artiklene i dette søket ble med i oppgaven. Totalt sett ble ni av elleve artikler funnet vha. søkemotoren PubMed.

2.2 Innhenting av informasjon fra fagpersoner

2.2.1 Tilsendte dokumenter

Ved kontakt med leger og bioingeniører ved seksjon blodbanken på St. Olavs Hospital fikk vi tilsendt relevante dokumenter. Vi fikk også tilsendt et dokument originalt fra Rigshospitalets

Symposium for bioanalytikere og laboranter 2019 hvor artikkelen "*A modified dithiothreitol protocol for eliminating daratumumab interference*" (Akhtar, 2018) var inkludert. Den samme artikkelen ble funnet med Google Scholar, men hele artikkelen i full-tekst var ikke tilgjengelig på internett.

2.2.2 Kontakt med fagpersoner

Gjennom skriveprosessen fikk vi gode innspill fra faglige veiledere til innhold i bacheloroppgaven. I tillegg til våre veiledere, tok vi selv kontakt med andre sykehus i Norge angående rutinene for pretransfusjonsundersøkelser hos myelomatosepasienter behandlet med DARA. Vi tok kontakt med fagkyndige ved Oslo Universitetssykehus (OUS), Haukeland sykehus, og Stavanger Universitetssjukehus.

3 Resultater

For å finne informasjon angående bruk av DTT gjorde vi søk på forskjellige plattformer. Dette er forklart nærmere i kapittel 2. I kapittel 3 blir det presentert flere artikler som har undersøkt hvordan bruken av DTT kan eliminere DARA-interferens. I tillegg er det lagt frem artikler som har undersøkt hvordan holdbarheten til DTT-behandlede erythrocytter kan forlenges. Det presenteres også en studie som har undersøkt hvordan kostnadene reduseres etter innføring av metoden. Til slutt er det lagt frem artikler som har undersøkt alternativer til DTT-behandling.

3.1 Hvordan hindre DARA-interferens

I 2015 adresserte og identifiserte Chapuy og kollegaer problemet med DARA-interferens og hvordan man muligens kunne løse dette. Funnet er beskrevet i artikkelen "*Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing*" (Chapuy et al., 2015). I studien ble det testet ulike måter å hindre at DARA ble bundet til erythrocyttene. For å bekrefte binding til CD38 på overflaten til erythrocytter ble det undersøkt om DARA klarte å binde seg til CD38+ eller CD38- HL60 celler. Dette ble målt med flowcytometri. For å fjerne CD38 på overflaten ble CD38+ HL60-cellene behandlet med DTT eller Trypsin. De behandlede HL60-cellene ble undersøkt ved å tilsette enten normale plasmaprøver tilsatt ulike konsentrasjoner med DARA, eller plasmaprøver fra myelomatosepasienter behandlet med DARA.

Resultatene av studien viste at både hos de normale plasmaprøvene tilsatt DARA og plasmaprøvene til de DARA-behandlede pasientene ble det observert DARA-interferens ved pretransfusjonsundersøkelser. Ved flowcytometri-undersøkelsene ble det bekreftet at DARA binder seg til CD38+ HL60 celler, men ikke til CD38- HL60 celler. Ved å behandle cellene med DTT ble bindingen til DARA redusert med 92%. Det ble også undersøkt behandling med løselig CD38 og anti-DARA idiotype, disse inhiberte også DARA binding til CD38.

Studien konkluderte med at DARA interfererer med rutinemessige pretransfusjonsundersøkelser ved å binde seg til CD38 på erythrocytter. DTT-behandling av erythrocytter er en robust metode for å redusere DARA-interferens. Det anbefales uansett geno- eller fenotyping før pasienten starter med DARA-behandling. Dette fører til tryggere transfusjon av blodprodukter til pasienter behandlet med DARA. DTT denaturer også Kell-antigener, og K-negativt blod bør gis ut til disse pasientene.

3.2 Internasjonal valideringsstudie av DTT-metoden

I 2016 ble det utført en internasjonal valideringsstudie for å finne ut om DTT metoden kunne benyttes ved rutinemessig blodbankarbeid verden over. Denne studien var også ledet av Chapuy og kollegaer, og hadde original-tittelen "*International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing*" (Chapuy et al., 2016). Bakgrunnen for studien var innrapporteringer om falske positive reaksjoner ved antistoffscreening, antistoffidentifisering og forlikelighetstesting hos DARA-behandlede pasienter. Studien var ledet av amerikanske forskere og leger ved ulike institusjoner i USA.

Studien undersøkte om de ulike laboratoriene som deltok i studien klarte å identifisere et ukjent irregulært antistoff i prøver tilsatt DARA, ved å bruke DTT-metoden for å eliminere CD38. Totalt deltok 25 laboratorier i studien: 16 fra Amerika, 5 fra Europa, 2 fra Asia, og 2 fra Oseania. Haukeland sykehus i Bergen var det eneste laboratoriet som deltok fra Norden. Laboratoriene skulle benytte den samme metoden for påvisning av irregulære antistoff som ble brukt til rutinemessig blodbankarbeid. 9 benyttet seg av gel-kort teknikk, 10 benyttet seg av tube-teknikk, og 6 benyttet seg av solid-fase teknikk. Blindprøver av plasma ble laget og sendt fra The Brigham and Women's Hospital (BWH) Blood Bank. Laboratoriene mottok to forskjellige plasmaprøver hver. Prøve 1 inneholdt kun DARA (10 mg/mL), og prøve 2 inneholdt DARA og et klinisk viktig antistoff. Før prøvene ble sendt til de ulike laboratoriene utførte BWH egne antistoffscreeninger og -identifiseringer, som skulle bli sammenliknet med funnene til de 25 institusjonene.

Sammen med plasmaprøvene mottok laboratoriene instruksjoner for hvordan analysene skulle utføres. Først skulle de utføre antistoffscreening av plasmaprøvene slik de normalt ville gjort. Det ble benyttet en 0 til 4+ skala for alle påviste antistoff. Etter utført antistoffscreening skulle laboratoriene på ny gjøre en antistoffscreening av plasmaprøvene, men denne gangen med DTT-behandlede panelceller. Instruksjoner for tillaging av DTT-reagens og DTT-behandling av panelcellene ble vedlagt. Dersom antistoffscreeningen ble negativ, skulle svaret innrapporteres. Dersom antistoffscreeningen ble positiv, skulle laboratoriet prøve å identifisere antistoffet ved å igjen bruke DTT-behandlede panelceller.

Deltagerne av studien fikk beskjed om å lage 0,2 mol/L DTT-løsning, ved å måle opp 1 g DTT i 32 mL *phosphate-buffered saline* (PBS) med en pH på 8,0. Kontroller av panelcellene, ble brukt til å forsikre om at DTT-reagenset var klart til bruk. Panelcellene (100 µL av 3-5% suspensjon) ble vasket fire ganger med PBS (pH 7,3) før det ble tilsatt 400 µL 0,2 mol/L DTT-løsning til hvert glass. Suspensjonen av DTT og panelceller ble inkubert ved 37 °C i 30 minutter. Suspensjonen skulle vendes 3-4 ganger under inkuberingsperioden. Suspensjonen ble deretter vasket fire ganger med PBS (pH 7,3) etter inkuberingen.

Resultatene fra de ulike laboratoriene ble sendt tilbake til forskningsgruppen i USA, der dataene ble behandlet. Alle stedene rapporterte at de observerte DARA-interferens ved test av ubehandlede panelceller. Reaksjonen var sterkest ved solid-fase testing med 4+, ved gel-kort teknikk var reaksjonen vanligvis 1+ til 2+, og ved tube-teknikk var reaksjonen vanligvis 1+. Steder som benyttet solid-fase testing ble bedt om å gjenta antistoffscreeningen ved å bruke gel-kort eller tube-teknikk. 24 av totalt 25 (96%) rapporterte positiv antistoffscreening ved bruk av gel-kort eller tube-testing. Det siste stedet rapporterte positiv antistoffscreening på begge prøvene med solid-fase teknikk. De som benyttet med solid-fase-teknikk analyserte testene om igjen ved bruk av enten gel-kort eller tube-teknikk. Ved antistoffscreening med tube-teknikk på ubehandlede panelceller, ble screeningen negativ ved bruk av *Polyethylene glycol* (PEG), men positiv ved bruk av *low-ionic-strength solution* (LISS). Ved nye antistoffscreening med DTT behandlede panelceller svarte 24 av 25 laboratorier at DTT behandlingen eliminerte den positive reaksjonen som ble sett ved prøve 1. DARA-interferens ble ikke observert ved tube-testing ved det siste stedet, pga. bruk av PEG i antistoffscreeningen og bruk av ubehandlede panelceller. Alle laboratoriene, 25 av 25, klarte å identifisere det ukjente antistoffet i prøve 2. På de 6 laboratoriene som fant anti-D, fant 4 steder anti-C i tillegg til anti-D. Klinisk Rh-antistoff ble bruk som kilde til anti-D ved tillaging av plasmaprøvene. Dette var allerede kjent for oppdragsgiveren og funn av både anti-D og anti-C var forventet.

Etter utført antistoffscreening på både prøve 1 og 2, ble laboratoriene spurt om å besvare et elektronisk spørreskjema. 19 av 25 (76%) laboratorier fullførte spørreundersøkelsen. 79% (15 av 19) av disse svarte at DTT-metoden var enkel å utføre. Tiden det tok for å teste prøve 1 med antistoffscreening og DTT-behandling var 2 timer. Median tid for testing av prøve 2 med antistoffscreening, identifisering og DTT-behandling var 4 timer. Tiden varierte stort mellom de ulike laboratoriene. 84% svarte at DTT-behandling oppfylte kravet når det kom til å

eliminere DARA-interferens. 90% svarte at de ønsket å innføre DTT-behandling som en del av deres prosedyre. Med bakgrunn i resultatene fra antistoffscreeningen og identifiseringen samt spørreundersøkelsen, konkluderte studien med at DTT-metoden var en robust og reproduktiv metode. DTT-metoden kan innføres ved transfusjonsmedisinske laboratorier verden over.

3.3 Retningslinjer for holdbarheten av DTT-behandlede erythrocytter

I 2017 publiserte teknisk spesialist for firmaet Immucor, Wendy L. Disbro, en holdbarhetsstudie av DTT-reagenser, "*Stability guidelines for dithiothreitol-treated red blood cell reagents used for antibody detection methods in patients treated with datatumumab*" (Disbro, 2017). Studien gikk ut på å teste stabiliteten til antigenene på DTT-behandlede erythrocytter. Dette ble gjort for å se om større mengder erythrocytter kunne behandles på samme tid, oppbevares, og brukes på et senere tidspunkt. Ferdig lagde DTT-behandlede panelceller er ikke å få tak i per dags dato. Panelceller ble behandlet med DTT og oppbevart på tre forskjellige måter. (1) DTT-behandlede panelceller ble oppbevart i Alsever's løsning (antikoagulasjonsmiddel) ved 2-8°C. Panelcellene ble vasket daglig, og suspendert i PBS med en pH på 7,3. (2) DTT-behandlede panelceller ble oppbevart i PBS med pH på 7,3. (3) DTT-behandlede panelceller var oppbevart i Alsever's løsning. Celler oppbevart ved metode (2) og (3) ble observert daglig 14 dager for å se etter hemolyse.

Ved oppbevaringsmetode (1) ble all antigen reaktivitet bevart på 2+ eller mer, med både enkel og dobbel dose av celler i 14 dager. Antigener i Rh-systemet ble bevart lengre enn antigener i Duffy-, Kidd- og MNS blodtypesystemer. På den tredje dagen begynte (2) å antyde hemolyse, med komplett hemolyse på dag åtte. Det ble ikke observert hemolyse i (3). Konklusjonen var at DTT-behandlede erythrocytter kan oppbevares i Alsever's løsning i 14 dager uten at det påvirker HEA. Dette kan spare laboratorietid, ressurser og penger.

3.4 Case-rapport ved bruk av DTT-metoden

En brasiliansk studie, kalt "*Transfusion management for patients taking an anti-CD38 monoclonal antibody*" (Bub et al., 2018), tok for seg resultater for pretransfusjonstesting hos myelomatosepasienter behandlet med DARA. Serumprøver fra fem ulike pasienter ble undersøkt. Ulike pretransfusjonundersøkelser inkludert i studien var ABO/Rh-typing, IAT,

DAT og eluat test. Det ble også gjort en daglig vurdering av holdbarheten til DTT-behandlede erythrocytter i Alsever's løsning.

Det ble ikke observert interferens ved ABO/Rh-typing i noen av prøvene. Det ble imidlertid observert DARA-interferens ved IAT. For DAT var to av fem prøver positive, men hadde negativ eluat test. Alle prøvene behandlet med 0,2 mol/L DTT klarte å forhindre vanskeligheter ved pretransfusjonsundersøkelsene. DTT-behandlede erythrocytter oppbevart Alsever's løsning var holdbare i 15 dager. Studien konkluderte med at DTT-metoden er en enkel og effektiv måte å hindre DARA-interferens. Antall kostbare serologiske undersøkelser kan bli redusert ved å innføre DTT-metoden, og oppbevare de DTT-behandlede erythrocyttene riktig.

3.5 Utvidet holdbarhet av DTT-behandlede erythrocytter til 28 dager

"Extending shelf life of dithiothreitol-treated panel RBCs to 28 days" (Sigle et al., 2018) er en artikkel fra Sveits, publisert 7. mars 2018. Studien undersøkte om det var mulig å forlenge holdbarheten på DTT-behandlede erythrocytter opptil 28 dager. Det ble testet om et allerede tilgjengelig kommersielt stabilitetsreagens kunne forlenge holdbarheten på DTT-behandlede panelceller. Studien undersøkte om antigener på panelcellene ble ivarettatt og om de kunne brukes til å detektere svak-reagerende alloantistoff.

Panelcellene ble vasket i PBS med pH 7,4 før de ble fortynnet til en femtedel med 0,2 mol/L DTT-reagens. Etter inkubasjon i romtemperatur i 30-35 minutter, ble panelcellene vasket fire ganger med PBS (pH 7,4). Tre ulike lot av panelceller ble anvendt. I tillegg ble det brukt to ulike lot for DTT. Ferdige DTT-behandlede panelceller ble vasket to ganger med ID-CellWash-P før 2-5% suspensjoner ble blandet med erythrocytt-stabilisatorreagens og oppbevart i 4 ± 2 °C.

Antigen påvisning av panelcellene ble utført med gel-kort både før og etter DTT-behandling, og før og etter tilsetning av stabiliseringsreagens. Dette ble gjort på dag 7, 14, 21 og 28.

Antigene D, C, c, E, e, Cw, Fya, Fyb, Jka, Jkb, Lea, Leb, P1, M, N, S, s ble testet for. Antigen fra Kell- og Lutheran-blodsystem ble ikke testet for siden disse var forventet til å bli falsk negative. Deretter ble det utført antistoffidentifikasjon ved bruk av DTT-behandlede panelceller oppbevart i stabilisatorreagens på dag 7, 14, 21 og 28. Antistoffidentifikasjonen ble

gjort med tube-teknikk hvor prøvene var tilsatt en kjent konsentrasjon av kommersielle antistoff med kjent spesifisitet. Negative kontroller ble tatt med for å teste for uspesifikke reaksjoner.

Studien fikk likt resultat ved dag 0 med og uten stabiliseringsreagens og på dag 28. Studien viste at både antigen ble bevart og det var mulig å påvise svak-reagerende alloantistoff i opptil 28 dager. Et unntak var antigenene Fya og Fyb som fikk svakere reaksjon og ofte negativt resultat. Dette vart likt for alle ulike LOT for DTT-reagens og screeningsceller.

3.6 Utvidet holdbarhet av DTT-behandlede erythrocytter til 33 dager

25. juli 2018 ble en dansk artikkel om et forsøk på å forlenge holdbarheten til DTT-behandlede panelceller opp til 33 dager publisert i Vox Sanguinis. Tittelen på studien var *“Thirty-three-day storage of dithiothreitol-treated red blood cells used to eliminate daratumumab interference in serological testing”* (Lorenzen et al., 2018). Det ble undersøkt om hemolyseringen av panelcellene kunne bremses slik DTT-behandlede panelceller kunne oppbevares og brukes over flere dager uten å trenge å lage nye. Det ble kjørt antistoff screening med panelcellene for å teste de, samt en måling av hemolyse.

Panelcellene ble laget i alikvoter med fortytning på 30:100 (volum erythrocytter: volum DTT), 30:75, 30:50 og 30:25 med 0,2 mol/L DTT. DTT for disse alikvotene ble laget med henvisning til AABB manualen. Disse alikvotene ble brukt for å utføre en antistoffscreening og antistoffidentifikasjon. Dette ble også utført på et ubehandlet panel for referanse. Analysen ble utført med gelkort og gradert fra 0 – 4+. Hemolysen ble analysert med Vitro 3600 på dag 1, 15 og 33. De ubehandlede panelcellene ble sjekket for hemolyse visuelt. Antistoffidentifikasjonen ble utført på dag 33 med DTT-behandlede celler og dag 1 med ubehandlede panelceller.

Hemolyse i alikvoten med 25 deler DTT ble målt til å være den laveste. Derfor ble denne fortytningen av panelcellene brukt til antistoffscreening og -identifikasjon.

Antistoffscreeningen fikk svakt positivt resultat på alle prøvene ved bruk av ubehandlede panelceller. Dette var for å påvise at DARA interfererer med prøveresultatene. Ved bruk av DTT-behandlede panelceller ble alle resultatene negative. Det viser at DTT fjerner DARA-interferens. Antistoffscreening og -identifisering fikk like gode resultater på dag 33 som

dag 1. Noen av reaksjonene til alloantistoffer ble svakere, men var fortsatt mulig å observere. Dette vil da bli påvirket av titerverdien til pasienten.

Studien konkluderte med at bruk av DTT er en enkel og billig metode for å fjerne DARA-interferens. Eneste ulempen var at det tar mye tid å lage DTT-behandlede panelceller. Ved å bruke DTT og fortynne 30:25 var det fortsatt mulig å fjerne DARA-interferens og unngå hemolyse ved oppbevaring over lengre tid.

3.7 Modifisert DTT-prosedyre fra Danmark

På Herlev Hospital i Danmark ble det undersøkt om den modifiserte DTT protokollen, beskrevet over i kapittel 3.6, hvor DTT-behandlede panelceller som blir laget i fortynningen 30:25, kunne brukes for å spare total arbeidstid (*turnaround time*). Studien ville validere metoden og undersøke om tiden som ble spart ved å kunne lagre DTT-behandlede panelceller, overveide ulempene med risikoen av hemolyse og tid brukt på å lage panelcellene. Tittelen på artikkelen var "*A modified DTT-protocol for eliminating DARA interference*" (Ahktar, 2018).

De DTT-behandlede panelcellene ble laget som beskrevet i *AABB's technical manual* med unntak av at fortynningen var i forholdet 30:25 (erytrocytt volum: DTT volum). Flere alikvoter av DTT-behandlede panelceller ble laget og distribuert til tre blodbanker i kapitalregionen og region Zealand i Danmark. Antistoffscreening ble utført både med ubehandlede panelceller og DTT-behandlede på plasmaprøver fra DARA-behandlede pasienter (n=50) og plasma fra pasienter (n=60) med kjente alloantistoff (n=70). Antistoffscreeningen ble utført med gelkort.

DTT-behandlingen gjorde at DARA-interferensen ble fjernet i alle 50 prøvene fra pasientene behandlet med DARA. 55 av 70 antistoff ble identifisert, hvor de resterende 15 var antistoff fra Kell-blodsystem. Disse var forventet å bli falsk negativ. Valideringen viste at det var mulig å fjerne DARA-interferens og utføre antistoffidentifikasjon med modifisert protokoll for DTT-behandlede panelceller. Ved å kunne bruke allerede lagd DTT-behandlede panelceller ble arbeidsprosessen med antistoffidentifikasjon redusert med 53 minutter. Dette viste at det var mulig å lage større mengder DTT-behandlede celler for å sende ut til blodbanker, og fortsatt opprettholde kvalitet og sikkerhet. Sammen med å lage større mengder

DTT-behandlede celler økte effektiviteten ved blodoverføring hos pasienter behandlet med DARA.

3.8 Oska-metoden: 0,01 mol/L DTT konsentrasjon for å bevare Kell

"Distinct effects of DARA on IAT and DAT: a new method employing 0,01 mol/L DTT for negating the DARA interference with preserving K-antigenicity" (Oska method)

(Hosokawa et al., 2018) er utført av Oska University Graduate School of Medicine i samarbeid med Oska University Hospital i Japan. Derav navnet Oska metoden. Studien ble først publisert i september 2018. Studien tok utgangspunktet i standardprosedyren til AABB (*american association of blood banks*), en organisasjon som har som oppgave å gjøre transfusjons medisin og bioterapi tilgjengelig verden over. For å lage en ny metode ble det tatt utgangspunktet i ulike konsentrasjoner av DTT til behandling av erytrocytter, sammen med å bruke en automatisk cellevask sentrifuge (himac MC450). Metoden ble sammenliknet med AABB prosedyren (0,2 mol/L) som bygger på forarbeid av Chapuy og kolleger.

Både en konsentrasjon på 0,01 mol/L og 0,15 mol/L klarte å redusere effekten til DARA. I kontrast til AABB prosedyren ble Kell-antigenene godt bevart hos pasienter behandlet med DARA. Oska metoden er presentert som en enkel og pålitelig metode, sammen med å vise en klar effekt av DARA på IAT og DAT. Likevel er det noen begrensninger ved studien. Det ble ikke benyttet kliniske eksempler av anti-K eller anti-k fra pasienter ved bruk av Oska metoden. AABB prosedyren kan også fungere som et kvalitetsstempel på at DTT metoden har fungert gjennom å destruere Kell antigener. Gjennom bruk av Oska metoden vil destruerings-av-Kell-kvalitetsstempelet gå på bekostning av å kunne identifisere Kell-antistoff.

3.9 Kostnadsstudie DTT versus genotyping

Artikkelen *"The impact of daratumumab in transfusion service costs"* (Cushing et al., 2019) omhandler beregning av kostnader for pretransfusjonstesting med DTT kontra genotyping eller fenotyping av 91 pasienter i New York over ett år. Ved å innføre DTT-metoden ble kostnadene nesten halvert. Estimert kostnad for genotyping var \$934,83 per pasient per år, og \$535,76 per pasient for DTT-metoden. Studien konkluderte med at ved å bruke en DTT-basert metode, hvor man selektivt genotyper for å sikre fenotypelikt blod, reduserte det kostnadene sammenliknet med en universell genotyping for å sikre fenotypelikt blod.

3.10 Andre metoder for å hindre DARA-interferens

I senere tid har det kommet flere artikler som undersøker andre metoder enn DTT for å hindre DARA-interferens. Den største utfordringen ved bruk av DTT er denaturering av kliniske viktige antigen. Det kan derfor være hensiktsmessig å se på alternative metoder.

3.10.1 Antistoff blokkering (BMAP) for å hindre DARA-interferens.

Studien "*A blockage monoclonal antibody protocol as an alternative strategy to avoid anti-CD38 interference in immunohematological testing*" (Ziza et al., 2019) er utført i samarbeid mellom ulike institusjoner i Brasil, og Churchill Hospital og Oxford University i England. Målet med studien var å introdusere en alternativ metode som forhindrer DARA-interferens. Målet var en rask og sikker metode, som i tillegg hadde lave kostnader. Metoden kalles BMAP som står for *Blockage Monoclonal Antibody Protocol*, men kan også kalles immunblokk. I protokollen benyttes anti-CD38 og antihumanglobulin (AHG). Fordelen med BMAP kontra DTT er at den ikke destruerer ulike human erytroide antigen (HEA).

20 myelomatosepasienter behandlet med DARA ble inkludert i studien. Erytrocytter fra blodgivere ble behandlet med anti-CD38 og som alle ble blokkert ved bruk av AHG. Hos 19 pasienter ble DARA-indusert agglutinasjon eliminert ved å både bruke DTT- og BMAP-behandlede erytrocytter. Hos den siste pasienten vedvarte agglutinasjonen når det ble testet mot BMAP-behandlede erytrocytter, alloantistoff hos denne pasienten ble identifisert. Pasientprøvene ble også blandet sammen med kommersielle antistoffer (anti-D, -C, -e, -K, -Jka, eller Kpb). Prøvene ble testet mot antigen-positive BMAP behandlede celler. Dette resulterte i antistoff identifisering.

Studien konkluderte med at DARA-interferens kunne nøytraliseres ved bruk av BMAP (anti-CD38 og AHG). BMAP er en lite kostbar, sikker og enkel metode, som samtidig bevarer HEA. Dette gjør at klinisk signifikante alloantistoffer kan identifiseres. BMAP kan potensielt brukes i andre situasjoner der spesifikke antistoffer kan interferere med pretransfusjonsundersøkelser.

3.10.2 Tilsetning av DARA-Fab for å hindre DARA-interferens

Studien *DARA "interference in pretransfusion testing is overcome by addition of DARA-Fab fragments to patients plasma"* (Werle et al., 2019) hadde en annen tilnærming til

problemstillingen. Den tyske studien satte opp en hypotese om å hindre DARA-interferens ved å blokke CD38-epitomer med DARA-Fab. Metoden var validert i 2017, samtidig som DTT-metoden.

For å produsere DARA-Fab ble DARA tilsatt i en spinnkolonne sammen med immobilisert papain i 16 timer ved 37°C. DARA ble delt inn i Fab og Fc fragmenter. Ved flere vasketrinn og sentrifugering ble DARA-Fab tilfredsstillende rent. DARA-Fab ble delt inn i alikvoter og oppbevart ved -20°C. DARA-Fab og panelceller (screeningceller og identifiseringsceller) ble inkubert med humant plasma tilsatt ulike konsentrasjoner av DARA eller plasma fra myelomatosepasienter behandlet med DARA. Inkuberingen skjedde ved 37°C i 15 minutter. Etter inkuberingen ble det brukt gel-kort for avlesning av reaksjoner.

Immunfiksert elektroforese viste fullstendig fragmentering av DARA i Fc og Fab fragmenter vha. papain proteolyse. DARA-Fab klarte effektivt å unngå agglutineringsreaksjoner med pasientens plasma og plasma tilsatt DARA. DARA-Fab forhindret ikke påvisning av alloantistoff. Studien presenterte en enkel, reproduktiv og lite kostbar metode for DARA-Fab fragmentering. Å blokkere CD38 epitopene med DARA-Fab er en enkel metode for å unngå falske positive AIT-resultater ved pretransfusjonsundersøkelser.

3.11 Bruk av DTT-metoden ved andre sykehus i Norge

Gjennom muntlig meddelelse fra veiledere fikk vi kjennskap til at UNN Tromsø, Oslo Universitetssykehus (OUS), og Nordlandssykehuset benytter DTT-metoden i dag. Gjennom å ta kontakt med andre sykehus i Norge fikk vi i tillegg kjennskap til hvordan sykehusene: OUS, Haukeland universitetssjukehus og Stavanger Universitetssjukehus hindrer DARA-interferens. OUS og Haukeland benytter DTT-metoden i dag, mens Stavanger har tidligere benyttet DTT-metoden, men valgt å gå over til en annen metode.

4 Diskusjon

I 2015 ble den første artikkelen som påpekte hvilken negativ effekt DARA-behandling av myelomatosepasienter hadde på pretransfusjonsundersøkelser, som omtalt i kapittel 3.1. Det følgende året gjorde de samme forskerne en valideringsstudie av metoden de mente var å foretrekke, nemlig DTT-metoden. De to studiene til Chapuy og kolleger, omtalt i kapittel 3.1 og 3.2, er ofte sitert i andre studier som omhandler problemstillinger knyttet til DARA-interferens. Studiene konkluderte med at DTT-metoden fungerer til dens formål. Nemlig å denaturere CD38-antigen på overflaten til erythrocytter for å unngå at anti-CD38 (DARA) fester seg til CD38-epitopen. I tillegg til dette er det i midlertid flere momenter man bør vurdere før innføring av DTT-metoden, slik som kostnader, tidsbruk og påvirkning av andre blodtypeantigen. I dette kapittelet skal vi ta for oss fordeler og ulemper ved bruk av DTT-metoden.

Genotyping eller fenotyping er kjent for å være kostbare analyser. Geno- eller fenotyping er standard prosedyre ved pretransfusjonsundersøkelser hos myelomatosepasienter behandlet med DARA ved St. Olavs Hospital i dag. I kostnads-studien fra New York ble det konkludert at ved å innføre DTT-metoden kunne kostnadene nesten halveres sammenliknet med bruk av geno-/fenotyping. Tallene studien kom fram til kan ikke direkte sammenliknes med hvordan kostnadene er i Norge, men fungerer likevel som en pekepinn ettersom forskjellene var så store. Det man kan anta er at DTT-metoden er billigere enn geno- eller fenotyping også i Norge.

For å beregne kostnader, er tidsbruk en viktig faktor. Dersom helsepersonell bruker lang tid på én pasient sier det seg selv at dette vil koste sykehuset penger. Dersom DTT-metoden ikke innføres må blodoverføring til myelomatosepasienter behandlet med DARA skje med biologisk forlik. Dette er en prosess som ikke bare medfører risiko for pasienten, men også er mer tidkrevende enn å sikre et trygt blodprodukt på forhånd. I Chapuy sin artikkel ble median tid for analysering av en prøve med DTT-behandlede erythrocytter beregnet til 4 timer. Under de fire timene ble det gjort antistoffscreening, identifisering og DTT-tillaging og behandling av panelceller. Denne tiden varierte imidlertid mye mellom de ulike laboratoriene. En måte å spare tid på er å øke holdbarheten til de DTT-behandlede erythrocyttene. Gjennom å lagre erythrocyttene slipper man sannsynligvis å bruke tid på å: lage ny DTT-løsning, og DTT-

behandling av erythrocytter. I vår litteraturgjennomgang fant vi tre studier som viste at det var mulig å øke holdbarheten av DTT-behandlede celler med 14, 28 og 33 dager.

Den største ulempen med DTT-metoden er at den denaturerer andre klinisk viktige antigener sammen med denaturering av CD38-antigenet. Hos den kaukasoide rase er hoveddelen Kell-negativ, dette kan dermed løses ved å transfundere Kell-negativt blod til myelomatosepasienter. Andre antigener som rammes er antigener i blodsystemene Cartwright, John Milton Hagen, Knops, Landsteiner, Lutheran, Drombrock og Cromer. På grunn av økt innvandring vil man også i Norge få innført et større mangfold av antigener som historisk sett ikke er vanlig i Norge. Dette er en stor ulempe med DTT-metoden som vil oppstå hyppigere i fremtiden. I senere tid har det kommet flere studier som undersøker andre metoder enn DTT-metoden for å unngå dette problemet. I kapittel 3 er det omtalt tre ulike studier. Oska-metoden, beskrevet i kapittel 3.8, er en modifisert DTT-metode som unngår denaturering av Kell-antigenet. DARA-Fab og BMAP, omtalt i 3.10, er andre, og mer fremtidsrettede metoder som bevarer alle de klinisk viktige antigenene, men samtidig nøytraliserer DARA-interferens. Siden det trolig vil bli økt bruk av immunterapi i fremtiden kan det være hensiktsmessig å undersøke BMAP-metoden.

Ved St. Olavs Hospital benytter de i dag geno- eller fenotyping, og deretter biologisk forlik av myelomatosepasienter behandlet med DARA. Biologisk forlik innebærer en viss risiko og kan føre til hemolytiske transfusjonsreaksjoner, samt dannelse av irregulære antistoffer. Ved å innføre DTT-metoden vil St. Olavs kunne eliminere de uspesifikke reaksjonene som kommer av DARA-interferens. Det kan da utføres forlikhetstesting for myelompasienter behandlet med DARA. Dette vil redusere risikoen ved blodtransfusjon. I tillegg vil det også redusere tid og kostnader i blodbankarbeid. DTT blir brukt i mange laboratorier verden rundt. Det er en metode som godt utprøvd. Samtidig har DTT-metoden sine begrensninger ved at DTT denaturerer antigener, deriblant Kell-antigen, som er et klinisk viktig antigen.

4.1 Kildekritikk

Ved innhenting av informasjon benyttet vi de tre søkemotorene Google, Google Scholar og PubMed. Den tyske studien som omhandler bruk av DARA-Fab ble funnet med Google. Det ble stilt strengere krav til å kunne bruke denne artikkelen sammenlignet med artiklene funnet med PubMed, siden Google ikke stiller noen krav til akademisk innhold. Den tyske artikkelen

var publisert av Karger i tidsskriftet "*Transfusion Medicine and Hemotherapy*". Dette tidsskriftet bruker single-blind peer review for å validere publikasjoner. Vi vurderte dermed at dette var en pålitelig kilde som kunne brukes i vår bacheloroppgave. Også den danske protokoll-studien ble funnet vha. Google, men denne var allerede kvalitetssikret av veileder, og publisert i "*Rigshospitalets Symposium for bioanalytikere og laboranter 2019*". Vi valgte derfor å benytte oss av denne artikkelen også. De fleste av artiklene sitert i resultater var kun tilgjengelig i full-tekst ved bruk av NTNUs VPN. "Access by NTNU University Library" ble sett på som et kvalitetsstempel, siden NTNU betaler for å få tilgang til disse artiklene.

5 Konklusjon

DTT-metoden er en enkel og robust metode som har blitt utprøvd, og er tatt i bruk hos mange blodbanker både i Norge og internasjonalt. Ved å innføre denne metoden vil St. Olavs Hospital spare både tid og penger. DTT-metoden vil sikre at utgivelse av blodprodukter blir tryggere enn ved å utføre biologisk forlik. Vi kan dermed konkludere med at DTT-metoden sannsynligvis vil være hensiktsmessig for St. Olavs Hospital å innføre. I fremtiden vil bruk av immunterapi bli mer utbredt, og det kan derfor være også hensiktsmessig å vurdere innføring av andre metoder som ikke denaturerer kliniske viktige antigener.

6 Referanseliste

- Ahktar, N. L. (2018). *Rigshospitalets Symposium for bioanalytikere og laboranter 2019*. 50, 51.
- Bub, C. B., Reis, I. N. D., Aravechia, M. G., Santos, L. D., Bastos, E. P., Kutner, J. M., & Castilho, L. (2018). Transfusion management for patients taking an anti-CD38 monoclonal antibody. *Revista Brasileira De Hematologia E Hemoterapia*, 40(1), 25–29.
<https://doi.org/10.1016/j.bjhh.2017.09.003>
- Carreño-Tarragona, G., Cedena, T., Montejano, L., Alonso, R., Miras, F., Valeri, A., Rivero, A., Lahuerta, J. J., & Martinez-Lopez, J. (2019). Papain-treated panels are a simple method for the identification of alloantibodies in multiple myeloma patients treated with anti-CD38-based therapies. *Transfusion Medicine*, 29(3), 193–196. <https://doi.org/10.1111/tme.12508>
- Chapuy, C. I., Aguad, M. D., Nicholson, R. T., AuBuchon, J. P., Cohn, C. S., Delaney, M., Fung, M. K., Unger, M., Doshi, P., Murphy, M. F., Dumont, L. J., Kaufman, R. M., & DARA-DTT Study Group* for the BEST Collaborative. (2016). International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion*, 56(12), 2964–2972. <https://doi.org/10.1111/trf.13789>
- Chapuy, C. I., Nicholson, R. T., Aguad, M. D., Chapuy, B., Laubach, J. P., Richardson, P. G., Doshi, P., & Kaufman, R. M. (2015). Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion*, 55(6 Pt 2), 1545–1554. <https://doi.org/10.1111/trf.13069>
- Cushing, M. M., DeSimone, R. A., Goel, R., Hsu, Y.-M. S., Parra, P., Racine-Brzostek, S. E., Degtyaryova, D., Lo, D. T., Morrison, M., Crowley, K. M., Rossi, A., & Vasovic, L. V. (2019). The impact of Daratumumab on transfusion service costs. *Transfusion*, 59(4), 1252–1258. <https://doi.org/10.1111/trf.15134>
- de Weers, M., Tai, Y.-T., van der Veer, M. S., Bakker, J. M., Vink, T., Jacobs, D. C. H., Oomen, L. A., Peipp, M., Valerius, T., Slootstra, J. W., Mutis, T., Bleeker, W. K., Anderson, K. C., Lokhorst, H. M., van de Winkel, J. G. J., & Parren, P. W. H. I. (2011). Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *The Journal of Immunology*, 186(3), 1840–1848. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003032>
- Deaglio, S., Mehta, K., & Malavasi, F. (2001). Human CD38: A (r)evolutionary story of enzymes and receptors. *Leukemia Research*, 25(1), 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(00\)00093-X](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(00)00093-X)
- Disbro, W. L. (2017). Stability guidelines for dithiothreitol-treated red blood cell reagents

used for antibody detection methods in patients treated with daratumumab.

Immunohematology, 33(3), 105–109.

Dizon, M. F. (2017). The Challenges of Daratumumab in Transfusion Medicine. *Laboratory Medicine*, 48(1), 6–9. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmw055>

Faramarz, Naeim. (2013). *Atlas of hematopathology: Morphology, immunophenotype, cytogenetics, and molecular approaches*. Academic Press.

Gorakshakar, A., Gogri, H., & Ghosh, K. (2017). Evolution of technology for molecular genotyping in blood group systems. *The Indian Journal of Medical Research*, 146(3), 305–315. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_914_16

Helsedirektoratet. (2017). *Transfusjon—Veileder for transfusjonstjenesten i Norge*.

Helsebiblioteket.no; Helsedirektoratet. /retningslinjer/blod/veileder-for-transfusjonstjenesten-i-norge?lenkedetaljer=vis

Hervig, T. (2017). *Klinisk transfusjonshåndbok*. 40.

Hosokawa, M., Kashiwagi, H., Nakayama, K., Sakuragi, M., Nakao, M., Morikawa, T., Kiyokawa, T., Aochi, H., Nagamine, K., Shibayama, H., & Tomiyama, Y. (2018). 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). *Transfusion*, 58(12), 3003–3013.

<https://doi.org/10.1111/trf.14900>

Institutt for kreftgenetikk og informatikk OUS. (2020a). *Benmargskreft (Myelomatose)*.

Kreftflex. <https://kreftflex.no/Myelomatose>

Institutt for kreftgenetikk og informatikk OUS. (2020b). *Diagnostisering ved benmargskreft (Myelomatose)*. <https://kreftflex.no/Myelomatose/ProsedyreFolder/DIAGNOSTIKK/New-ksProcedureChapter>

Jost, P. D. (2020). *Myelomatose*. Norsk Elektronisk Legehåndbok.

<https://legehandboka.no/handboken/kliniske-kapitler/blod/tilstander-og-sykdommer/beinmargssykdom/myelomatose/>

Kreftforeningen. (2019, mai 27). *Benmargskreft (myelomatose)—Helsenorge.no*.

<https://helsenorge.no/sykdom/kreft/benmargskreft-myelomatose>

Laubach, J. P., & Richardson, P. G. (2015). CD38-Targeted Immunochemotherapy in Refractory Multiple Myeloma: A New Horizon. *Clinical Cancer Research*, 21(12), 2660–2662. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-3190>

Lea, T. (2006). *Immunologi og immunologiske teknikker* (3. utg., s. 400). Fagbokforl.

Lorenzen, H., Lone Akhtar, N., Nielsen, M., Svendsen, L., & Andersen, P. (2018). Thirty-

three-day storage of dithiothreitol-treated red blood cells used to eliminate daratumumab interference in serological testing. *Vox Sanguinis*, *113*(7), 686–693.
<https://doi.org/10.1111/vox.12699>

Malavasi, F., Funaro, A., Roggero, S., Horenstein, A., Calosso, L., & Mehta, K. (1994). *Human CD38: A glycoprotein's search of a function*. 3.

Oostendorp, M., Lammerts van Bueren, J. J., Doshi, P., Khan, I., Ahmadi, T., Parren, P. W. H. I., van Solinge, W. W., & De Vooght, K. M. K. (2015). When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy. *Transfusion*, *55*(6 Pt 2), 1555–1562. <https://doi.org/10.1111/trf.13150>

Oslo universitetssykehus. (2017, desember 6). *Benmargskreft (myelomatose)*. Oslo universitetssykehus. <https://oslo-universitetssykehus.no/behandlinger/benmargskreft-myelomatose>

Parren, P. W., & van de Winkel, J. G. (2008). An integrated science-based approach to drug development. *Current Opinion in Immunology*, *20*(4), 426–430.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.06.006>

Saltarella, I., Desantis, V., Melaccio, A., Solimando, A. G., Lamanuzzi, A., Ria, R., Storlazzi, C. T., Marigliò, M. A., Vacca, A., & Frassanito, M. A. (2020). Mechanisms of Resistance to Anti-CD38 Daratumumab in Multiple Myeloma. *Cells*, *9*(1).
<https://doi.org/10.3390/cells9010167>

Sanchez, L., Wang, Y., Siegel, D. S., & Wang, M. L. (2016). Daratumumab: A first-in-class CD38 monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma. *Journal of Hematology & Oncology*, *9*(1), 51. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0283-0>

Schjesvold, F. H. (2019, februar 25). *Myelomatose*. <http://oncolex.no/Myelomatose>

Sezer, O. (2009). Myeloma bone disease: Recent advances in biology, diagnosis, and treatment. *The Oncologist*, *14*(3), 276–283. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0003>

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. A., & Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell*, *168*(4), 707–723.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.01.017>

Sigle, J.-P., Mihm, B., Suna, R., & Bargetzi, M. (2018). Extending shelf life of dithiothreitol-treated panel RBCs to 28 days. *Vox Sanguinis*, *113*(4), 397–399.
<https://doi.org/10.1111/vox.12645>

Werle, E., Ziebart, J., Wasmund, E., & Eske-Pogodda, K. (2019). Daratumumab Interference in Pretransfusion Testing Is Overcome by Addition of Daratumumab Fab Fragments to Patients' Plasma. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, *46*(6), 423–430.

<https://doi.org/10.1159/000495773>

Yeh, S.-P., Chang, C.-W., Lien, Z.-Y., & Feng, C.-C. (2019). Manual polybrene (MP), not dithiothreitol (DTT), is the recommended method for blood banking procedure in myeloma patients treated with anti-CD38 monoclonal antibody in Asia. *Clinical Lymphoma, Myeloma and Leukemia*, 19(10), e155. <https://doi.org/10.1016/j.clml.2019.09.258>

Ziza, K. N. C., Paiva, T. A., Mota, S. R., Dezan, M. R., Schmidt, L. C., Brunetta, D. M., Ricci, G., Basques, F. V., Barroso-Duarte, F., Rocha, V., Mendrone-Junior, A., & Dinardo, C. L. (2019). A blockage monoclonal antibody protocol as an alternative strategy to avoid anti-CD38 interference in immunohematological testing. *Transfusion*, 59(5), 1827–1835.

<https://doi.org/10.1111/trf.15202>

Årsrapport for lymfoide maligniteter 2018. (2019). Kreftregisteret.

<https://www.kreftregisteret.no/Generelt/Rapporter/Arssrapport-fra-kvalitetsregistrene/Arssrapport-for-lymfom-og-KLL/arsrapport-for-lymfoide-maligniteter-2018/>

