

**Etablering av rutine for DTT-behandling av erythrocytter  
for antistoffutredning hos myelomatosepasienter  
behandlet med monoklonal anti-CD38 (DARA)**

*Establishment of routine for DTT treatment of erythrocytes for  
antibody assessment in patients with multiple myeloma  
treated with monoclonal anti-CD38 (DARA)*



Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU)  
*Norwegian University of Science and Technology*  
Fakultet for naturvitenskap (NV)  
Institutt for Bioingeniørfag (IBF)

Betty Ho, Nazila Khanali og Mathilde Pedersen

Mai 2022



## Forord

Denne oppgaven markerer avslutningen på et interessant og spennende bachelorløp gjennomført ved Fakultet for Naturvitenskap, Institutt for Bioingeniørfag ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU) i Trondheim. Oppgaven er gitt av Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin (AIT), Seksjon blodbanken ved St. Olavs hospital, der den praktiske delen ble utført.

Først og fremst ønsker vi å takke våre veiledere. Vi ønsker å takke våre faglige veiledere ved AIT på St. Olavs Hospital. Dette var fagansvarlig bioingeniør Bente Vik Sletta, overlege Barbora Jacobsen og Lege i Spesialisering (LIS) Henning Øfsteng. Vi ønsker å takke Bente for å ha vært svært hjelpsom ved spørsmål om utførelsen av det laboratoriepraktiske og diskusjoner angående faglig innhold. Takk til Barbora og Henning for gjennomlesning av bacheloroppgaven, vi er svært takknemlige for all veiledning og tilbakemeldinger vi har fått. Videre ønsker vi å takke vår prosessveileder Wenche Slettahjell Prestvik, Førsteamanuensis ved Institutt for Bioingeniørfag. Vi ønsker å takke for gode råd til oppsett, korrekturlesning og hjelp under selve skriveprosessen. Til slutt ønsker vi å gi en takk til venner og familie for støtte under bachelorperioden vår.

Trondheim, 20.05.2022

Betty Ho

Betty Ho

Nazila Khanali

Nazila Khanali

Mathilde Pedersen

Mathilde Pedersen

## Sammendrag

Pasienter med tilbakefall av myelomatose kan behandles med monoklonalt anti-CD38, også kalt daratumumab (DARA). CD38-proteinet er overuttrykt på myelomceller, og binding til DARA fører til destruksjon av cellene. CD38 er også svakt uttrykt på erytroide celler, og dermed kan DARA binde seg til screening- og panelceller benyttet ved pretransfusjonsundersøkelser. Dette interfererer med undersøkelsene og gjør det utfordrende å sikre trygg blodtransfusjon for pasienter behandlet med DARA. Den anbefalte metoden for å eliminere DARA-interferens er behandling av screening- og panelceller med dithiothreitol (DTT) for å denaturere CD38. Formålet med denne bacheloroppgaven var å validere en slik metode og undersøke om de DTT-behandlede testcellene var holdbare i fire uker.

Det ble totalt utført ett oppsett antistoffidentifisering og fire oppsett antistoffscreeninger. Det var omtrent én ukes intervall mellom hver screening, der siste screening ble utført noen få dager før utløpsdatoen av screeningscellene. Undersøkelsene ble utført på seks DARA-prøver og åtte prøver med kjente blodtypeantistoff, samt en kvalitetskontroll. Det ble benyttet både ubehandlede og DTT-behandlede screening- og panelceller.

Resultatene fra undersøkelsene viste at DTT-behandling av screeningscellene eliminerte DARA-interferensen, og at kjente blodtypeantistoff fremdeles kunne påvises med bruk av DTT-behandlede screeningsceller ved alle oppsettene. Dette gjaldt også for antistoffidentifiseringen. Det ble observert uspesifikke reaksjoner ved noen av prøvene, men dette ble antatt å være forårsaket av andre faktorer enn selve DTT-behandlingen.

Denne metoden for DTT-behandling av testceller viste seg å ha god holdbarhet, og er dermed en mindre ressurs- og tidskrevende metode sammenlignet med andre metoder for DTT-behandling av celler, genetisk typing og fenotyping. På bakgrunn av resultatene anbefales det å benytte denne metoden ved Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin (AIT), Seksjon blodbanken, St. Olavs hospital i rutinen i forbindelse med blodtransfusjon til myelomatosepasienter behandlet med DARA.

## Abstract

Patients with relapse of multiple myeloma can be treated with monoclonal anti-CD38, also called daratumumab (DARA). CD38 is overexpressed on myeloma cells, and binding to DARA leads to the destruction of these cells. CD38 is weakly expressed on erythroid cells as well, and thus DARA is able to bind to screening and panel cells used in pre-transfusion testing. This interferes with pre-transfusion tests and makes it challenging to ensure safe blood transfusion for patients treated with DARA. The recommended method to eliminate this is to treat screening and panel cells with dithiothreitol (DTT) which denatures the CD38-protein. The purpose of this bachelor thesis was to validate such a method and investigate whether the DTT-treated test cells were durable for four weeks.

A total of one set of antibody identification and four sets of antibody screenings were performed. There was approximately one week interval between each screening set-up, with the last screening being performed a few days before the expiration date of the screening cells. The tests were performed on six DARA samples and eight samples with known blood type antibodies, as well as a quality control. Both untreated and DTT-treated screening and panel cells were used in the testing.

The results of the studies showed that DTT treatment of screening cells eliminated the DARA interference, and that known antibodies could be detected using DTT-treated screening cells in all the setups. This also applied to the antibody identification. Nonspecific reactions were observed in some of the samples, but this was thought to be caused by factors other than the DTT treatment itself.

This method for DTT treatment of test cells has proven to have good durability and is therefore a less resource and time-consuming method compared to other methods for DTT treatment of cells, genetic typing and phenotyping. Based on the results, it is recommended to use this method at the Department of Immunology and Transfusion Medicine, Blood Bank Section, St. Olav's Hospital in the routine of blood transfusion to multiple myeloma patients treated with DARA.

# Innholdsfortegnelse

<b>Forord .....</b>	<b>I</b>
<b>Sammendrag.....</b>	<b>II</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>III</b>
<b>1 Innledning.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1 Myelomatose.....</i>	<i>1</i>
1.1.1 Forekomst av myelomatose .....	2
1.1.2 Symptomer ved myelomatose .....	2
1.1.3 Diagnostikk av myelomatose.....	3
1.1.4 Behandling av myelomatose.....	4
1.2 CD38+.....	4
1.3 Daratumumab.....	5
1.4 Blodtransfusjon .....	7
1.4.1 Pretransfusjonstester .....	7
1.4.2 Transfusjonsreaksjoner .....	10
1.5 Blodtyping av myelomatosepasienter behandlet med DARA .....	11
1.5.1 DARA-interferens ved pretransfusjonsundersøkelser .....	11
1.5.2 Fenotyping og genetisk blodtyping av blodtypeantigen.....	13
1.5.3 Biologisk forlik.....	13
1.6 Dithiothreitol (DTT).....	13
1.7 Problemstilling .....	14
<b>2 Materiale og metode .....</b>	<b>16</b>
2.1 Prøvematerialet.....	16
2.2 DTT-behandling av screening- og panelceller.....	16
2.3 Screening av irregulære antistoff.....	17
2.4 Identifisering av irregulære antistoff .....	19
2.5 Vurdering av resultat .....	20
<b>3 Resultater.....</b>	<b>22</b>
3.1 Antistoffscreening av DARA-prøver.....	23
3.2 Antistoffscreening av prøver med kjente blodtypeantistoffer og kontroll .....	24
3.3 Antistoffidentifisering av DARA-prøver .....	27
3.4 Antistoffidentifisering av prøver med kjente blodtypeantistoffer .....	28
<b>4 Diskusjon .....</b>	<b>30</b>

4.1 DARA-prøver.....	30
4.2 Kjente blodtypeantistoff .....	31
<b>5 Konklusjon.....</b>	<b>33</b>
<b>6 Referanser.....</b>	<b>34</b>
<b>7 Vedlegg.....</b>	<b>38</b>
<i>Vedlegg 1: Screening 1 – prøve I til VIII og QC2 med kjente antistoff.....</i>	<i>38</i>
<i>Vedlegg 2: Screening 1 - DARA-prøve 1 til 6 .....</i>	<i>40</i>
<i>Vedlegg 3: Screening 2 – prøve I til VIII og QC2 med kjente antistoff.....</i>	<i>41</i>
<i>Vedlegg 4: Screening 2 - DARA-prøve 1 til 6 .....</i>	<i>43</i>
<i>Vedlegg 5: Screening 3 – prøve I, II, III, V, VII og VIII med kjente antistoff.....</i>	<i>44</i>
<i>Vedlegg 6: Screening 3 - DARA-prøve 1 til 6 .....</i>	<i>45</i>
<i>Vedlegg 7: Screening 4 – prøve I, II, III, V, VII, VIII og QC2 med kjente antistoff .....</i>	<i>46</i>
<i>Vedlegg 8: Screening 4 - DARA-prøve 1 til 6 .....</i>	<i>48</i>
<i>Vedlegg 9: Identifisering 1 - prøve I til VIII med kjente antistoff.....</i>	<i>49</i>
<i>Vedlegg 10: Identifisering 1 - DARA-prøve 1 til 6.....</i>	<i>53</i>
<i>Vedlegg 11: Identifisering 2 - prøve V og VI med kjente antistoffer.....</i>	<i>57</i>
<i>Vedlegg 12: Antigram for 0,8% Surgiscreencelle 1, 2 og 3.....</i>	<i>58</i>
<i>Vedlegg 13: Antigram for 0,8% Resolve Panel B .....</i>	<i>59</i>

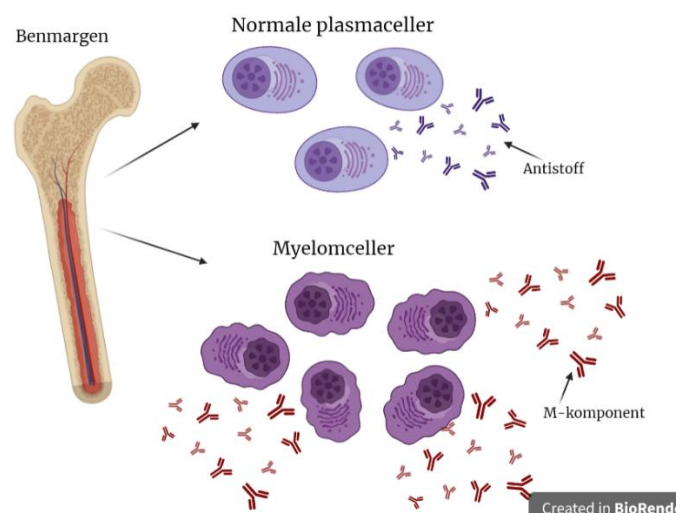
# 1 Innledning

## 1.1 Myelomatose

Myelomatose, også kalt benmargskreft, er en neoplastisk sykdom kjennetegnet av ukontrollert vekst av plasmaceller i benmargen. Plasmaceller utvikles fra B-lymfocytene, og er celler som er spesialisert til å produsere antistoffer. Antistoffer, også kjent som immunoglobuliner, er svært viktige for immunforsvaret da disse kan gjenkjenne virus og bakterier, og bidra til nedkjempelse via opsonisering og fagocytose. Plasmaceller forekommer normalt i store knokler som brystbeinet, kragebeinet, ribbein, bekkenet og de lange rørknoklene i armer og lår (1).

Myelomatose utvikler seg ved at det oppstår mutasjoner i plasmacellens DNA, noe som endrer cellens egenskaper slik at den blant annet vil begynne å dele seg ukontrollert. De muterte plasmacellene kalles for myelomceller. Myelomcellene vil gjennomsnittlig inneholde rundt 35 mutasjoner ved diagnosetidspunkt. Vanlig for myelomatose er translokasjoner som fører til et dysregulert eller økt uttrykk av cyklinene D1, D2 og D3 (2). Cykliner er viktige regulatorer av cellyklusen da de aktiverer forskjellige cyklin-avhengige proteinkinaser (CDK), som styrer de forskjellige stadiene i cellyklusen. D-cykliner regulerer overgangen fra G1-fasen til S-fasen ved å allosterisk aktivere CDK 4 og CDK 6. Disse regulerer transkripsjonen av gener som er nødvendig for celleproliferasjon. Ved myelomatose vil det økte uttrykket av disse cyklinene drive en ukontrollert celleproliferasjon som fremmer tumorvekst (3). Andre egenskaper myelomcellene har er å binde seg til de stromale cellene i benmargen, noe som inhiberer apoptose og stimulerer frigjørelsen av cytokiner (2).

Myelomcellene utgjør en klon, det vil si at de stammer fra samme celle og er dermed helt identiske. Ved myelomatose fører en opphopning av myelomceller i benmargen til at produksjonen av normale blodceller, som erytrocytter og leukocytter, fortrenses. Samtidig får man en overproduksjon av



Figur 1: Normale plasmaceller og deres tilhørende antistoff, og myelomceller og deres M-komponent. (egen illustrasjon, laget med BioRender)



monoklonale immunglobuliner eller deler av disse. Disse monoklonale immunglobulinene betegnes monoklonal komponent (M-komponent) og er ikke funksjonelle. Figur 1 viser forskjellen mellom normale plasmaceller og myelomceller som produserer store mengder M-komponent. Ved myelomatose kan det også forekomme utskillelse av deler av antistoff i form av lette kjeder, disse kalles for Bence-Jones (1).

### 1.1.1 Forekomst av myelomatose

I 2020 var det 556 mennesker i Norge som fikk diagnosen myelomatose. Av disse var 328 menn og 228 kvinner. Insidensen av myelomatose har gradvis økt de siste 15 årene, og i perioden 2002-2020 ble det gjennomsnittlig diagnostisert åtte nye tilfeller med myelomatose per 100 000 innbyggere. Sykdommen er uhelbredelig, men medikamenter er med på å bedre livskvaliteten slik at flere kan leve lengre med kreftsykdommen. Økt tilgang på medikamenter mot myelomatose er trolig årsaken til en positiv økning i overlevelsesraten på minst fem år, som har steget fra 37% i 2002 til 58.8 % i 2020 (4).

De fleste som får myelomatose er over 60 år. I 2020 var det 35 kvinner og 35 menn yngre enn 60 år som fikk diagnosen myelomatose. Yngre pasienter har markant bedre prognose sammenlignet med de eldre, der overlevelsesraten i aldersgruppen 18-64 år er på 73,3%. Fem års relativ overlevelse reduseres med økende alder (4).

### 1.1.2 Symptomer ved myelomatose

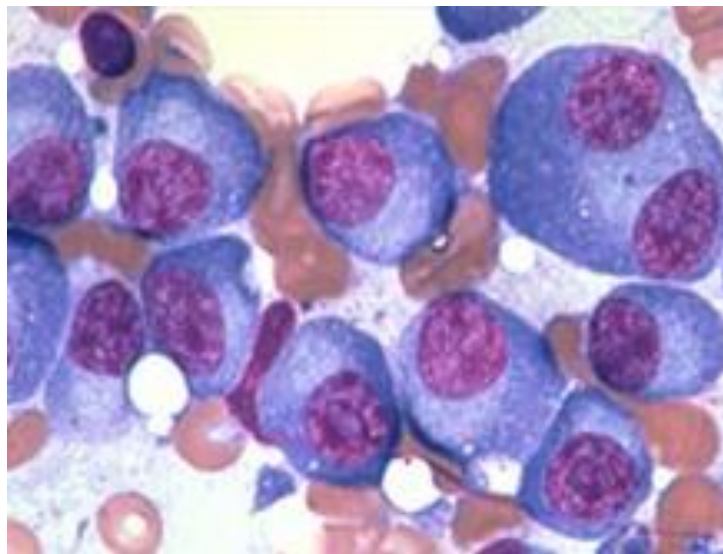
Ved myelomatose dannes det ofte svulster i benmargen og i benvev (5). Dette kan føre til økt trykk på ryggmargen, noe som kan medføre tap av følelse og kraft i bena (6). Myelomcellene kan stimulere osteoklastene til å bryte ned benvev, samtidig som de hemmer osteoblastenes evne til å produsere nytt benvev. Dette fører til at myelomatosepasienter ofte lider av benskjørhet, og risikerer smertefulle brudd (7). På grunn av nedbrytningen av benvev kan myelomatosepasientene få hyperkalsemi. Hyperkalsemi kan gi symptomer som kvalme, tørste og slapphet (6).

De store mengdene M- komponent og kalsium i blodet kan overbelaste nyrene til myelomatosepasientene, noe som kan gi nyresvikt og tap av nyrefunksjon. I tillegg kan de høye verdiene av M-komponent føre til en økt plasmaviskositet, som igjen kan påvirke koagulasjonen. Dermed er myelomatosepasienter også i risiko for å utvikle sirkulasjonsforstyrrelser som f.eks. venøs trombeembolisme (7).

Den nedsatte produksjonen av normale celler i benmargen medfører at myelomatosepasienter ofte utvikler anemi, noe som blant annet gir symptomer som slapphet, blekhet, kortpustethet, hurtig puls og svimmelhet. I tillegg kan de få blødninger på grunn av nedsatt mengde trombocytter. Risikoen for infeksjoner øker også, grunnet en nedsatt evne til å produsere antistoffer og leukocytter (7)

### 1.1.3 Diagnostikk av myelomatose

*Nasjonalt handlingsprogrammet for maligne blodsykdommer* fra 2021 anbefaler bruk av biopsi ved diagnostisering av myelomatose (8). Benmargsprøven tas fra hoftekammen, og det ses etter unormale mengder plasmaceller. I tillegg ses det etter karakteristiske trekk for myelomceller, som er et umodent utseende og en perifert plassert kjerne, se figur 2 (9). Det kan gjøres flere undersøkelser av benmargsprøven som immunhistokjemiske teknikker, flowcytometri og fluorescens in situ hybridisering (FISH), for å få ytterligere informasjon (10).



*Figur 2: Myelomceller i benmargsprøve (11)*

Bildeundersøkelser som CT og MR er også en del av utredningen. Myelomatose påvirker nedbrytningen av benvev, og ved CT undersøkelser kan det oppdages eventuelle forandringer i skjelettet. Blodprøver kan vise hyperkalsemi og anemi, samt vise indikasjon på nedsatt nyrefunksjon (5).

Produksjonen av M-komponent kan måles i blod og urin og er viktig for utredning av myelomatose, men også viktig for å undersøke behandlingseffekten. M-komponent kan brukes som et indirekte mål på mengden myelomceller i kroppen, og er dermed en nyttig undersøkelse med tanke på oppfølging og rask oppdagelse av tilbakefall (5).

#### 1.1.4 Behandling av myelomatose

Myelomatose utvikles gradvis og diagnosen stilles ved noen tilfeller før sykdommen har rukket å bli symptomatisk. Myelomatose er en uhelbredelig sykdom, og målet med behandlingen blir dermed å bremse sykdommen, lindre symptomer og forlenge overlevelsen. Selve sykdomsforløpet er veldig ulikt fra person til person, og grunnlaget for behandling foreligger ikke før pasienten opplever symptomer. Andre forhold som også vil gi grunnlag for oppstart av behandling er økt nivå eller unormalt forhold mellom frie lett kjeder, høyt antall plasmaceller eller mer enn en lesjon ved MR-undersøkelse (12).

Det er forskjell i behandling ut ifra om man er yngre eller eldre enn 65 år. For pasienter yngre enn 65 år gis høydosebehandling med autolog stamcellestøtte (HMAS). Ved HMAS høstes pasientens stamceller fra blodbanen før behandlingsstart. Deretter gjennomgår pasienten en intensiv cellegiftbehandling, eventuelt i kombinasjon med stråling for å drepe myelomcellene. Videre transfunderes stamcellene tilbake til pasienten, slik at stamcellene kan returnere til benmargen for å produsere nye blodceller. For pasienter over 65 år gis ordinær cellegiftbehandling og eventuelt stråling (13).

De siste 10-15 årene har det kommet flere nye legemidler som har gitt en stor økning i overlevelsen. Svært utbredt er immunterapi ved tilbakefall av myelomatose. Et eksempel på et slikt legemiddel er daratumumab som omtales i kapittel 1.3.

#### 1.2 CD38+

CD38 er et 46-kDa type II transmembran glykoprotein. Proteinet har tre domener, et kort intracellulært domene, et enkelt transmembran helixdomene og et stort ekstracellulært domene (14). Proteinet har seks disulfidbindinger som bidrar til å stabilisere proteinstrukturen (15). CD38 uttrykkes vanligvis hos lymfoide og myeloide celler, men selve uttrykket avhenger av cellens differensiering- og aktiveringsstatus (14). Hos normale lymfoide og myeloide celler uttrykkes antigenet i mindre grad. CD38 uttrykkes også i svak grad på

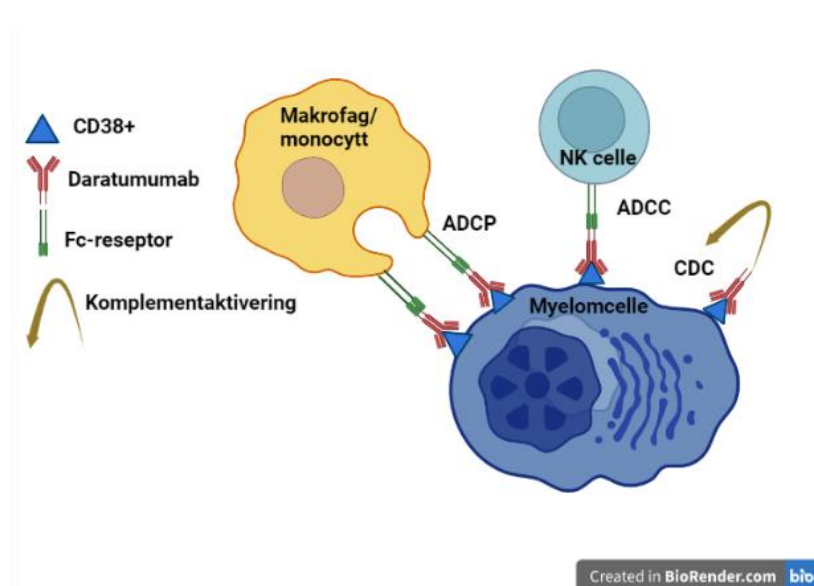
erytrocytter. Hos myelomcellene derimot, blir CD38 overuttrykt (16). Ettersom antigenet i større grad uttrykkes ved myelomatose, blir CD38 dermed et aktuelt angrepspunkt for immunterapi (15).

### 1.3 Daratumumab

Til tross for utviklingen av flere medikamenter som immunmodulerende legemidler (IMiDs) og proteasehemmere (PI) for behandling av myelomatose, så er de langsiktige resultatene ugunstige. Pasienter kan ha høy motstandsdyktighet mot disse medikamentene, og kan få manglende respons eller tilbakefall. Pasienter med myelomatose har vanligvis flere tilbakefall, og det er derfor et kontinuerlig behov for utvikling og testing av nye medikamenter som gir bedre effekt og varighet (17). I dag er det mange ulike behandlingsalternativer i Norge ved tilbakefall av myelomatose (18). Et eksempel på dette er bruk av immunterapi (17).

Daratumumab (DARA) er et IgG1 monoklonalt antistoff som binder seg til CD38 reseptorer. DARA vil binde seg og effektivt drepe celler som uttrykker CD38, særlig gjelder dette myelomceller som har

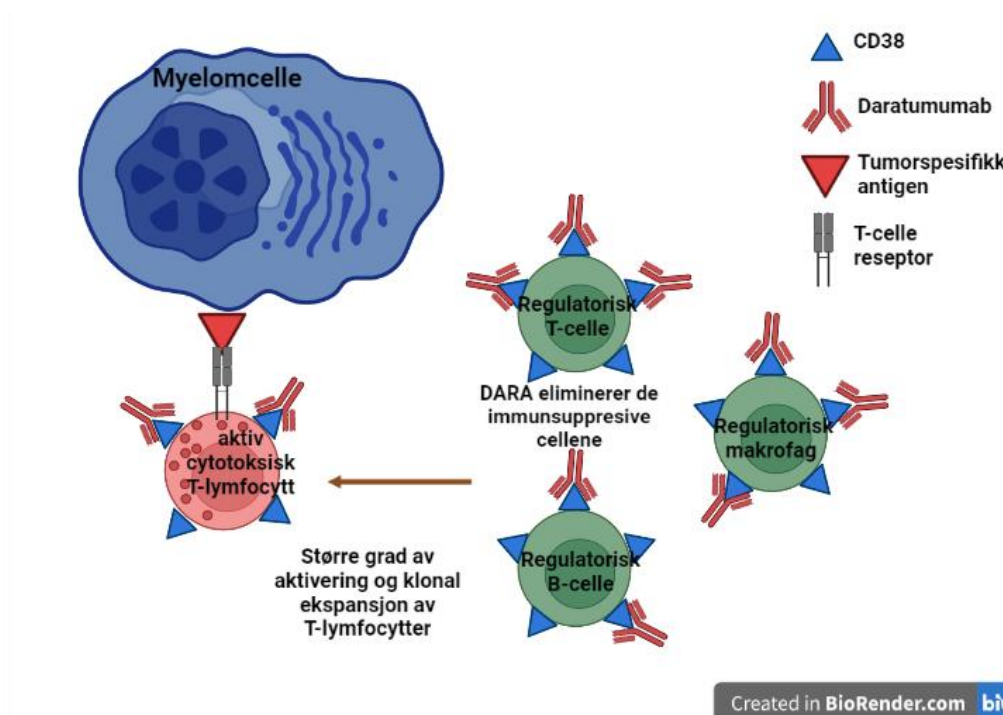
CD38 overuttrykt. DARA bruker kroppens eget immunsystem for å indusere celledød gjennom ulike mekanismer. Disse mekanismene inkluderer antistoffavhengig cellulær fagocytose (ADCP), antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC) og komplementmediert cytotoxicitet (CDC) (19–22). På figur 3 er disse mekanismene illustrert.



Figur 3: Mekanismer DARA bruker for å indusere apoptose av myelomceller. Disse mekanismene inkluderer antistoffavhengig cellulær fagocytose (ADCP), antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet (ADCC) og komplementmediert cytotoxicitet (CDC). (egen illustrasjon, laget med BioRender)

Første dosering med DARA for behandling av pasienter med tilbakefall av myelomatose ble utført i 2008. Siden CD38 også uttrykkes på andre humane celler i tillegg til myelomceller, kan behandling føre til bivirkninger hos pasientene. Derfor ble det tatt forsiktighetshensyn ved at det ble gitt ekstremt lave doser i begynnelsen. På grunn av sikkerhetsprotokoller under utprøvingen tok det 3,5 år å teste de første 23 pasientene. Etter hvert som doseringen økte til maksimum, ble de kliniske effektene tydelige ved reduksjon av pasientens M-komponentkonsentrasjon i blodet. Behandlingen viste ingen store bivirkninger og dette ga økt interesse for bruk av DARA (23).

En mulig forklaring på den gode effekten til DARA er at den virker immunmodulerende. Det er vist at immunregulerende celler som regulatoriske B- og T-celler, monocytter og makrofager uttrykker CD38 og vil elimineres av DARA. Disse immunsuppressive cellene kan hemme cytotoksiske T-celler ( $T_{cyt}$ ), og ved å eliminere disse vil det føre til en aktivering og klonal ekspansjon av  $T_{cyt}$ .  $T_{cyt}$  kan da i større grad drepe myelomceller, ettersom de ikke lenger inhiberes (22). Denne effekten er illustrert på figur 4.



Figur 4: Viser hvordan DARA effektivt dreper myelomceller ved å eliminere immunsuppressive celler. Disse immunsuppressive cellene inkluderer regulatoriske T-celler, B-celler og makrofager. Ved å gjøre dette vil aktivering og klonal ekspansjon av cytotoksiske T-celler skje i større grad. Myelomceller vil som effekt drepes av aktive cytotoksiske T-celler. (egen illustrasjon, laget med BioRender)

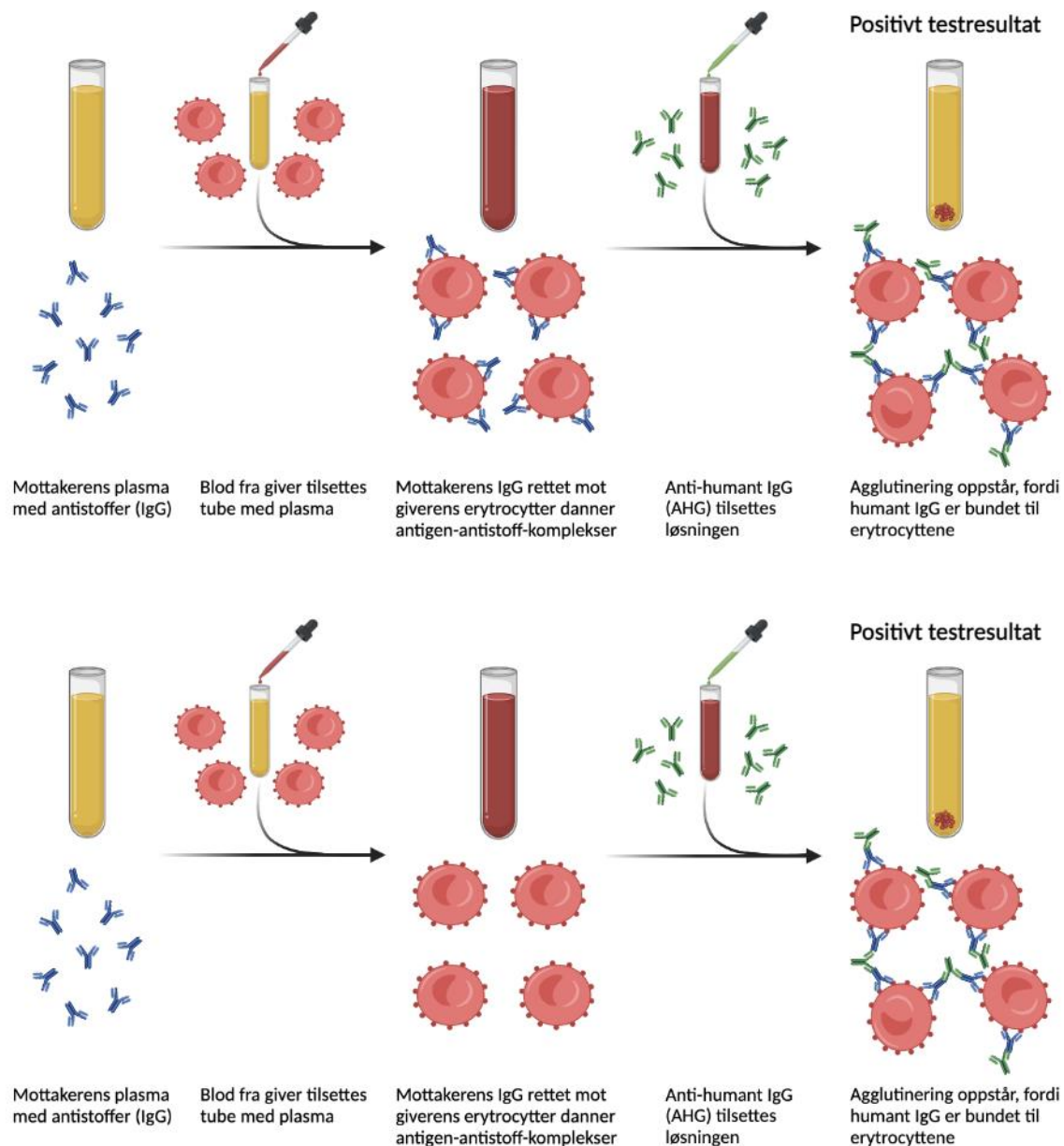
## 1.4 Blodtransfusjon

### 1.4.1 Pretransfusjonstester

Før en blodtransfusjon må pasienten være ABO- og RhD-typet og antistoffscreenet, samt at en forlikelighetstest må utføres (24). Blodtypesystemene med størst betydning er ABO- og Rh-systemet, og typing av deres antigener utføres dermed rutinemessig. Den vanligste metoden for dette er serologisk typing med hemagglutinasjonsreaksjoner (25).

Antistoffscreening detekterer om pasienten har irregulære antistoffer (24). Irregulære antistoffer er primært av type IgG og dannes etter eksponering til fremmede blodtypeantigener. Slik immunisering kan oppstå av uforlikelighet ved tidligere transfusjon eller under graviditet. Noen blodtypesystemer har større klinisk betydning enn andre, dette baserer seg på deres evne til å fremkalle antistoffer som kan forårsake hemolytiske transfusjonsreaksjoner, eller hemolytisk sykdom hos foster eller nyfødt. Eksempler på blodtypesystemer med stor klinisk betydning er Rh, Kell, Duffy, Kidd og MNS (25).

Under antistoffscreening blir pasientens plasma testet mot tre kommersielle screeningceller, som er erythrocytter av blodtype O fra bloddonorer. Til sammen uttrykker screeningcellene en kombinasjon av blodtypeantigener, slik at man øker sannsynligheten for å kunne påvise de blodtypeantistoffene som har størst klinisk betydning. Antistoffscreening benytter indirekte antiglobulinteknikk (IAT), en totrinnsprosess for å påvise irregulære antistoff, som vist i figur 5. Første trinn innebærer at eventuelle irregulære antistoff i pasientens plasma binder seg til screeningsceller slik at disse sensibiliseres. Deretter benyttes anti-humant globulin (AHG), et IgG antistoff som binder Fc-delen av humane antistoff. Binding av AHG til sensibiliserte screeningsceller vil danne et stort kompleks som observeres som synlig hemagglutinasjon. Ved synlig hemagglutinasjon med en eller flere screeningceller er screeningen positiv. En positiv screening indikerer tilstedeværelse av irregulære antistoff, som betyr at det videre må utføres antistoffidentifisering (26).



Created in [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Figur 5: Indirekte antiglobulinteknikk (IAT) som detekterer antistoffer mot humane erythrocytter i pasientens plasma. (egen illustrasjon, laget med BioRender)

Antistoffidentifisering benytter tilsvarende prinsipp som antistoffscreening, men er en utvidelse med totalt elleve såkalte panelceller og en autokontroll. Autokontroll tester etter tilstedeværelse av autoantistoff hos pasienten. Panelcellene er erythrocytter av blodtype O fra bloddonorer, og disse uttrykker også en kombinasjon av blodtypeantigener slik at man kan identifisere de blodtypeantistoffene som har klinisk betydning. Eventuelle irregulære antistoff i pasientens plasma vil binde seg til panelcelle med korresponderende antigen, og dette synliggjøres ved hjelp av IAT. For å identifisere det irregulære antistoffet vurderes

reaksjonsmønsteret mellom plasmaprøven og panelcellene mot et antigram etter prosedyre. Et antigram er en oversikt over fenotypen til panelcellene, altså hvilke antigen som uttrykkes på de ulike cellene. Fenotypen til panelcellene skal være variert slik at det er mulig å skille antistoffene fra hverandre. Et spesifikt antistoff vil gi et spesifikt mønster (27). Eksempel på identifisering ved bruk av et antigram er vist i figur 6. Det er viktig å ikke bare sammenligne reaksjonsmønsteret til en prøve med antigrammet, men også ta i betraktning andre faktorer beskrevet i prosedyren for å unngå at andre antistoffer overses.

Donor	Cell number	D	C	c	E	e	C <sup>w</sup>	K	k	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	P <sub>1</sub>	M	N	S	s	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>	IS	37	AHG	CC
R <sub>1</sub> r	1	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	2+	
R <sub>1</sub> R <sub>1</sub>	2	+	+	0	0	+	+	+	0	+	0	+	0	0	+	+	0	0	0	+	+	0	+	0	0	+	+	0	0	0	3+
R <sub>2</sub> R <sub>2</sub>	3	+	0	+	+	0	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	3+	
R <sub>0</sub> r	4	+	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0	0	3+	
r <sup>+</sup> r	5	0	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	0	0	+	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	0	0	0	3+
r <sup>+</sup> r	6	0	0	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	2+	
rrK	7	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	0	0	2+	
rr	8	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	0	0	3+	
r <sup>+</sup> r <sup>+</sup>	9	0	+	+	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	+	0	+	+	0	0	0	3+
rr	10	0	0	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	0	+	+	0	0	3+	
R <sub>1</sub> r	11	+	+	+	0	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	+	+	+	+	+	+	0	+	+	0	0	2+	
	Patient Cells																											0	0	0	3+

Figur 6: Eksempel på antigram som brukes ved antistoffidentifisering med elleve panelceller. I dette eksempelet observeres det agglutinasjon (AHG) mellom en prøve med panelcelle 1, 3, 4, 6, 7, 10 og 11. Disse panelcellene uttrykker antigen Fy<sup>a</sup>, dermed er det mulig at anti-Fy<sup>a</sup> er identiteten til antistoffet. Antigen Fy<sup>a</sup> er fra blodsystemet Duffy (27).

Fenotypen til en panelcelle kan være hetero- eller homozygot. Heterozygot fenotype vil si at cellen har to ulike alleler av et gen, mens homozygot fenotype har to like alleler av et gen. En panelcelle som er homozygot for et antigen vil oftest ha høyere uttrykk av det antigenet sammenlignet med en heterozygot panelcelle. Dermed er sannsynligheten for å detektere et klinisk viktig lavtiter antistoff høyere ved bruk av homozygote panelceller sammenlignet med heterozygote (28). Panelcellene bør inkludere celler med homozygot uttrykk av blodtypeantigenene i Rh, Duffy, Kidd og MNS blodtypesystem (27).

Ved mistanke om flere eller svake antistoffer kan panelcellene enzymbehandles med proteaser. Proteaser katalyserer spalting av peptidbindinger i proteiner til mindre peptider og aminosyrer. Ved enzymbehandling vil negativt ladede molekyler på cellemembranen spaltes av, som gir tap av negativ ladning og dermed reduksjon av zeta-potensialet. Zeta-potensialet



er frastøtningskraften mellom erytrocyttene, og vil dermed påvirke avstanden mellom dem (26). I tillegg, vil proteasene denaturere enkelte antigener, slik at visse overflatestrukturer blir mer tilgjengelige for antistoffer (28). På denne måten vil noen irregulære antistoffer enten miste reaktivitet eller vise sterkere reaksjoner med enzymbehandlede panelceller.

Etter fullført blodtyping og screening, utføres utvidet forlik på de prøvene som har eller som tidligere har hatt positiv screening. Hensikten er å undersøke om pasienten har antistoffer rettet mot giverens erytrocytter som ikke ble oppdaget under identifiseringen. Ved utvidet forlik inkuberes pasientens plasma med giverens erytrocytter (26). Hemagglutinasjon etter IAT påviser at pasienten har IgG antistoffer rettet mot giverens erytrocytter, som betyr at blodet ikke kan transfunderes til pasienten. Det må da velges en ny blodpose og gjennomføre utvidet forlik på nytt. Hos pasienter med negativ screening og pasienter som ikke har fått påvist blodtypeantistoff tidligere, kan elektronisk forlik benyttes (29). Elektronisk forlik bruker et datasystem for å kontrollere at ABO-typen til erytrocyttkonsentratet er kompatibel med pasientens ABO-type (26). Her er det i tillegg viktig å ta hensyn til RhD, samt følge kravet om Kell-negativt blod til kvinner i fertil alder. Dette gjelder kvinner som selv er Kell-negative eller der statusen for Kell-antigenet er ukjent.

Dersom det ikke er mulig å finne forlikelig blod til pasienten, som for eksempel hos pasienter med autoantistoffer som forstyrrer forlikelighetstestene ved å kamuflere alloantistoffer, utleveres blod på biologisk forlik (29). Prosedyren omtales grundigere i punkt 1.5.3.

#### 1.4.2 Transfusjonsreaksjoner

Blodtransfusjon kan føre til transfusjonsreaksjoner hos mottaker. En transfusjonsreaksjon defineres som en reaksjon på blodet gitt ved blodoverføring. Graden av reaksjonen varierer fra å være mild til livstruende (30). Det finnes flere typer transfusjonsreaksjoner, av disse er den farligste hemolytisk transfusjonsreaksjon.

En hemolytisk transfusjonsreaksjon er en sjelden, men alvorlig tilstand der transfunderte erytrocytter destrueres av mottakerens immunforsvar. Dette skyldes hovedsakelig ABO-uforlikelighet, oftest ved forbytting av blodpose eller pasientprøve. Det kan også skyldes transfusjon av uforlikelig blod. Hemolytiske transfusjonsreaksjoner kan klassifiseres i akutt hemolytisk transfusjonsreaksjon (AHTR) og forsinket hemolytisk transfusjonsreaksjon (DHTR). Reaksjonen kan være immunologisk eller non-immunologisk, avhengig om den er antistoffmediert eller ikke. ATHR oppstår innen 24 timer etter blodoverføring, og

klassifiseres ut ifra hvor hemolysen oppstår. En akutt intravaskulær hemolyse skjer i blodbanen, og skyldes hovedsakelig IgM antistoffer fra ABO-systemet. ABO-antistoffer er meget potente til å aktivere komplementsystemet, og kan blant annet utløse disseminert intravaskulær koagulasjon (DIC), samt medføre sjokk og nyresvikt. En ekstravaskulær hemolyse oppstår utenfor blodbanen, og skyldes oftest IgG antistoffer. Her vil erytrocyttene destrueres ved fagocytose i både milt og lever. DHTR derimot, vil utvikle seg flere døgn eller uker etter blodoverføring (26). Reaksjonen er immunologisk betinget, men er som regel mindre alvorlig enn ATHR (31).

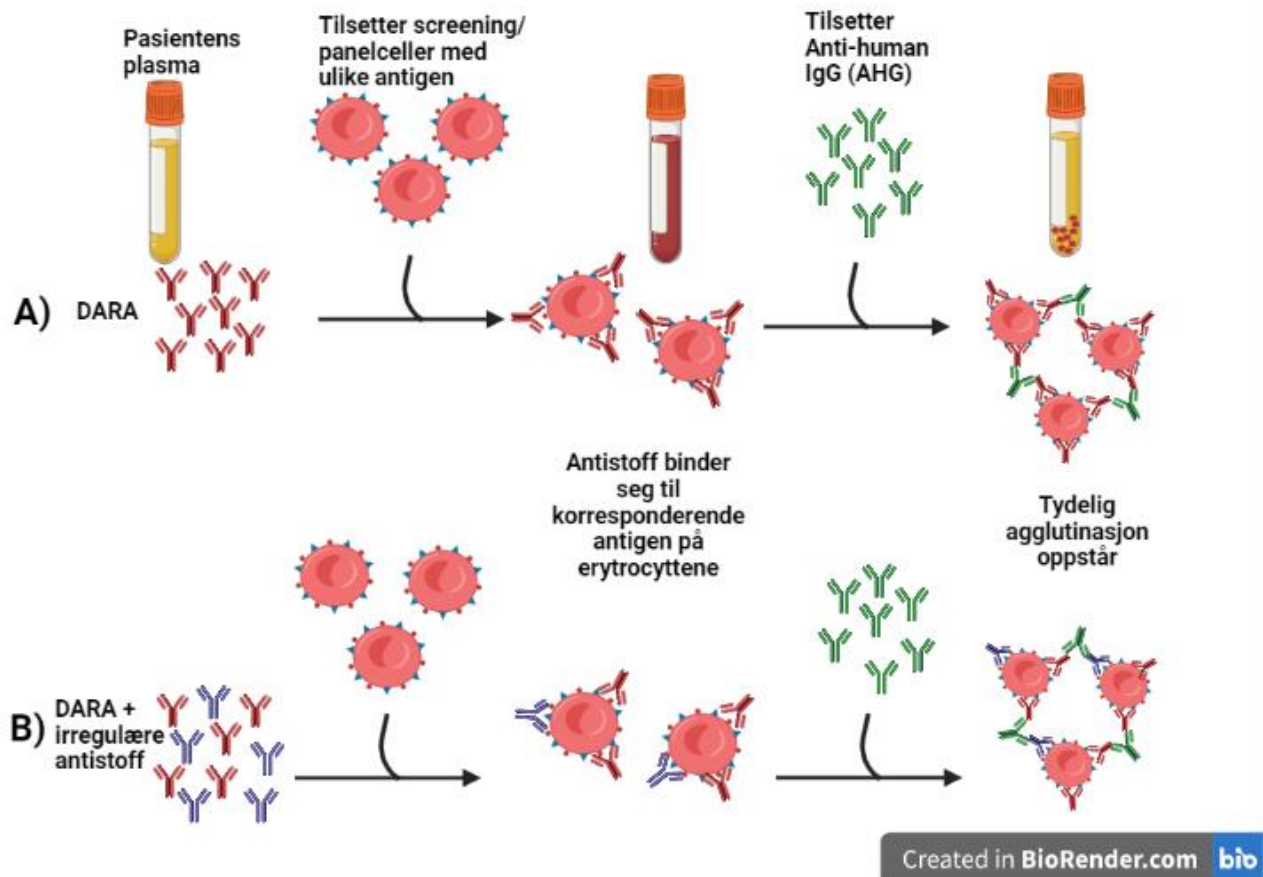
Det finnes flere andre mulige reaksjoner som kan oppstå i forbindelse med transfusjon. Den vanligste er non-hemolytisk transfusjonsreaksjon. Denne tilstanden gir feber og frysninger kort tid etter transfusjon. Reaksjonen er non-hemolytisk og er som regel en ufarlig tilstand (31). Allergiske transfusjonsreaksjoner er en annen type reaksjon som kan oppstå etter blodoverføring. Dette skyldes som regel allergener til stede i blodproduktet fra giver og antistoffer hos mottaker (30). Tilstanden er sjeldent truende, men kan oppleves ubehagelig for pasienten (31).

## 1.5 Blodtyping av myelomatosepasienter behandlet med DARA

### 1.5.1 DARA-interferens ved pretransfusjonsundersøkelser

Pasienter som behandles med DARA kan få anemi som en konsekvens av behandlingen, dermed har disse ofte et høyere behov for blodtransfusjoner. Behovet for blodtransfusjoner kan også være en direkte konsekvens av myelomatosediagnosen. Det har vist seg at det er en utfordring å finne blod til disse pasientene siden DARA interfererer med flere pretransfusjonstester. Dette gjelder antistoffscreening og identifisering, samt utvidet forlik. Interferensen skyldes uttrykk av CD38 på erytroide celler, som brukes ved testene. DARA i pasientens plasma kan da binde seg til testcellene og føre til falske positive testresultater ved å gi hemagglutinasjon. DARA-interferens vil som regel gi svak panagglutinasjon som graderes til 1+ (32). Panagglutinasjon innebærer at interferensen forekommer med alle testcellene. I figur 7 er denne interferensen illustrert, og man kan se at DARA i pasientens

plasma maskerer tilstedeværelsen av eventuelle irregulære antistoff. I tillegg kan falsk positiv agglutinasjon se ut som at pasienten har irregulære antistoff som de egentlig ikke har (33).



Figur 7: Viser DARA-interferens ved screening og identifisering av irregulære antistoffer i pasientens plasma. A) DARA gir falskt positivt testresultat i pasientprøve uten irregulære antistoff. B) DARA maskerer tilstedeværelsen av irregulære antistoff. (egen illustrasjon, laget med BioRender)

Falske positive resultater kan oppstå opptil 2-6 måneder etter seponering av DARA, noe som skaper stor usikkerhet rundt disse prøvene. Det er derfor viktig å informere personalet i Blodbanken dersom en pasient behandles med DARA, slik at de er forberedt på å iverksette de riktige prosedyrene. Det forhindrer også at personalet bruker unødvendig tid og ressurser på pretransfusjonstester. Det kan i tillegg være lurt å utføre en antistoffscreening i forkant av DARA-behandlingen (33).

### 1.5.2 Fenotyping og genetisk blodtyping av blodtypeantigen

For å finne mest mulig forlikelig blod til pasienter behandlet med DARA er det i noen tilfeller behov for å sette opp genetisk blodtyping istedenfor serologisk blodtyping for å avgjøre blodtypen til pasienten. Dette gjelder for pasienter som ikke har blitt blodtypet før behandlingen med DARA og som tidligere har blitt transfundert noe som kan gi grunnlag for dannelse av irregulære antistoff.

Ved genetisk blodtyping brukes multiplex PCR og microarray hybridisering, og ut ifra hvilke panel man analyserer prøven med, så finner man ut eksakt hvilke gener pasienten har og hvilke antigen deres celler uttrykker (34). Panelet identifiserer de klinisk viktigste antigenene som har størst betydning for blodtransfusjon. Fordelen med genetisk blodtyping er at man finner mer forlikelig blod til pasienten.

Ved fenotyping testes pasientens erytroide antigen mot de klinisk viktigste antistoffene. Ved hematologiske sykdommer der det forventes at pasienten vil ha langvarig transfusjonsbehov, fenotypes antigenene i blodsystem Rh, Kell, Duffy, Kidd og MnS. Deretter får pasientene blod med den mest forlikelige fenotypen (31). Selv om det testes for mange antigen, så vil ikke denne metoden være helt sikker, da det ikke er mulig finne blodgiver med fenotypisk blod som er helt identisk med mottaker. I tillegg kan det heller ikke utelukkes tilstedeværelsen av alloantistoffer.

### 1.5.3 Biologisk forlik

Siden DARA interfererer med utvidet forlik, benyttes biologisk forlik når man transfunderer blod til pasienten. Ved biologisk forlik transfunderer man raskt rundt 10-20 mL blod i begynnelsen, deretter reduseres mengden og pasienten blir observert i 15 minutter. Dersom det ikke sees tegn til transfusjonsreaksjoner, fortsetter man transfusjonen med normal dråpetakt. Pasienten følges nøye under hele transfusjonen (31).

### 1.6 Dithiothreitol (DTT)

Dithiothreitol (DTT) har molekylformel  $C_4H_{10}O_2S_2$  og er et lite molekyl som har egenskapen til å redusere disulfidbindinger til sulfhydrylgrupper. Denne reaksjonen er mer effektiv ved høyere temperaturer (35). DTT kan brukes for å denaturere CD38 fra overflaten på screening- og panelceller. Ved DTT-behandling av disse cellene vil DTT irreversibelt redusere

disulfidbindingene til frie sulfhydrylgrupper i det ekstracellulære domenet til CD38. Dette denaturerer tertiærstrukturen til CD38 slik at DARA ikke lengre kan binde seg, og dermed inhiberes også den serologiske reaktiviteten (36).

DTT vil også denaturere andre blodtypeantigener. For blodtypeantigene Knops, Lu, MER2, Cromer, RAPH, Sc og Ge2 vil DTT-behandling føre til at eventuelle antistoffer mot disse antigenene vil gi svake eller negative reaksjoner ved screeningundersøkelser. Videre vil DTT denaturere alle antigenene til Kell-systemet, JMH, Yta, Do, In og Lewis, dermed vil eventuelle antistoff mot disse antigenene gi en negativ reaksjon ved en screeningundersøkelse. Av disse er det Kell-systemet som er klinisk signifikant. Vanlig prosedyre er uansett å gi ut K-negativt blod til pasienter behandlet med DARA for å minimere risikoen for transfusjonsreaksjoner (37). DTT vil ikke påvirke den serologiske reaktiviteten til de øvrige mest klinisk relevante blodtypesystemene som er Rh, Duffy, Kidd og MNS (36).

### 1.7 Problemstilling

Myelomatosepasienter behandlet med DARA har ofte behov for flere blodtransfusjoner. Ved pretransfusjonsundersøkelser vil DARA skape interferens, noe som skaper utfordringer i å finne forlikelig blod til pasienten. AIT, seksjon Blodbanken ved St. Olavs Hospital, har tidligere testet en DTT-metode for å eliminere interferensen. Metoden baserer seg på å DTT-behandle screening- og panelceller benyttet under pretransfusjonstester for å fjerne CD38 uttrykt på cellene. Avdelingen har gjennomført to forskjellige metodevalideringer på denne metoden. Den første førte til mange uspesifikke reaksjoner og var derfor vurdert som ikke egnet. I 2020 ble det gjennomført en ny metodevalidering med gode resultater, men metoden var tidskrevende og de DTT-behandlede testcellene hadde dårlig holdbarhet. Det tok opptil tre timer å DTT-behandle cellene, og med en holdbarhet av testcellene på kun ett døgn, var det ønskelig å undersøke andre alternativer. I dag benytter Blodbanken genetisk blodtyping eller fenotyping av disse pasientene og gir ut mest fenotypisk likt blod. Grunnen er at man minimerer sannsynligheten for at disse pasientene danner et irregulært blodtypeantistoff, samt minimere muligheten for en eventuell hemolytisk transfusjonsreaksjon i de tilfellene der pasienten allerede er immunisert. Det kan ta opptil to uker å motta resultatene fra genetisk typing.

Nylig ble Blodbanken oppmerksom på en annen DTT-metode som utføres i Danmark, som utmerket seg på grunn av holdbarheten på de DTT-behandlede cellene på opptil fire uker. Denne metoden bruker materiale fra samme leverandør som Blodbanken allerede benytter, så det ble interesse for å teste ut metoden i eget laboratorium. *Hensikten med denne bacheloroppgaven var derfor å gjennomføre en metodevalidering, samt en holdbarhetsundersøkelse av DTT-behandlede testceller i en tidsperiode på ca. fire uker.*

## 2 Materiale og metode

### 2.1 Prøvematerialet

Plasmaprøver fra seks myelomatosepasienter behandlet med DARA, åtte plasmaprøver med kjente blodtypeantistoffer og en kvalitetskontroll ble analysert. Noen av prøvene ble fortynnet med PBS for å gi en lavere antistoffkonsentrasjon, og/ eller for å få nok prøvematerialet. Prøvene ble oppbevart ved -20 °C da de ikke ble brukt.

### 2.2 DTT-behandling av screening- og panelceller

DTT brukes for å fjerne CD38 fra screening- og panelceller slik at DARA ikke kan interferere med den indirekte antiglobulinteknikken under screening- og identifiseringsundersøkelser.

For tillaging av DTT-behandlede screening- og panelceller ble det benyttet henholdsvis 0,8% Surgiscreeencelle 1, 2 og 3 og 0,8% Resolve Panel B celle 12-22, begge fra Ortho Clinical Diagnostics (Figur 8). DTT (0,2 M) benyttet var tillaget på substratlaboratoriet ved Avdeling for medisinsk mikrobiologi ved St. Olavs hospital. Prosedyren for DTT-behandling av cellene var fra Danmark i samarbeid med Ortho Clinical Diagnostics, og ble tilpasset av AIT, seksjon Blodbanken ved St. Olavs Hospital.



Figur 8: Til venstre: Et sett 0,8% Surgiscreeenceller 1, 2 og 3. Til høyre: 0,8% Resolve Panel B celler 12-22. (eget foto)

Tre store plastglass ble merket med *Surgiscreen 1, 2 og 3*. To sett ble laget for å ha tilstrekkelig materiale til screeningundersøkelsene. Det ble overført Surgiscreenceller (10 mL) til sine respektive plastglass. Plastglassene ble sentrifugert i Hettich Rotina 420 sentrifuge med program 1 på 3000 RPM i fem minutter, og supernatanten ble fjernet. Tre nye små reagensrør av glass ble merket med *Surgiscreen DTT 1, 2 og 3*. Under avtrekkskap ble disse glassene tilsatt DTT (0,2 M, 32 µL) og de pakkede screeningcellene (38 µL). Glassene ble påsatt kork og blandet forsiktig. Videre ble glassene inkubert ved 37 °C i 30 minutter, og blandet hvert femte minutt. Cellene ble vasket tre ganger med PBS og sentrifugert med samme innstilling som nevnt tidligere. Etter siste vask ble alt av supernatanten fjernet med glasspipette for å få vekk så mye væske som mulig. For å lage 0,8 % DTT Surgiscreencelle ble det pipettert Red Cell Diluent (RCD) (1,5 mL) i tre nye glass og tilsatt de pakkede screeningcellene (16 µL). Suspensjonsstyrken ble vurdert visuelt i forhold til de ubehandlede Surgiscreencellene, og det ble tilsatt mer av de pakkede screeningcellene ved behov. Cellene ble oppbevart i kjøleskapet i minimum fire dager før den første screeningundersøkelsen. Dette var etter anbefaling fra Danmark da cellene kunne gi uspesifikke reaksjoner ved undersøkelsene de første dagene.

Det ble gjort enkelte modifikasjoner fra den originale prosedyren. Rekkefølgen på tilsetningen av DTT og pakkede screeningcellene ble endret på, slik at DTT ble tilsatt først. Dette ble gjort for å enklere pipettere mest mulig av de pakkede screeningcellene, siden det ble mulig å skylle pipettespissen i DTT. Mengden RCD ble nedjustert fra 2 mL til 1,5 mL, grunnet for svak suspensjonsstyrke. I tillegg ble det oftest tilsatt mer av de pakkede screeningcellene for å oppnå riktig suspensjonsstyrke.

For å lage panelcellene ble det brukt 0,8% Resolve Panel B 12-22 celler. Samme prosedyre som beskrevet ovenfor gjaldt også for tillagning av DTT-behandlede panelceller.

### 2.3 Screening av irregulære antistoff

Metoden benytter indirekte antiglobulinteknikk for å påvise antistoff i blodsystemene Rh, Kell, Duffy, Kidd, Sex Linked, Lewis, MNS, P og Lutheran. Det ble benyttet plasmaprøver og en kvalitetskontroll ved denne metoden.

Ved screening av irregulære antistoff ble det brukt Ortho BioVue system polyspesifikke kassetter med anti-IgG og anti-C3d, i tillegg 0,8% Surgiscreenceller 1, 2 og 3. Kontrollen



som ble benyttet var Ortho Confidence WB flaske 2. Alle reagensene benyttet var fra Ortho Clinical Diagnostics.

For hver pasientprøve ble en kassett merket med prøvenummer, samt 1, 2 og 3 som representerte hver Surgiscreencelle. DARA-prøvene ble merket med *DARA 1-6* og prøvene med kjente blodtypeantistoffer ble merket med *Prøve I-VIII* og kjent antistoff. Kontrollen ble merket med *QC2*. Kassetten ble delt på midten, som vist på figur 9, slik at hver prøve parallelt ble testet med både ubehandlede og DTT-behandlede Surgiscreenceller. Etter å ha markert alle brønnene ble folien fjernet, og celler (50 µL) ble pipetert i sine respektive brønner. Deretter ble plasma (40 µL) og kontrollmaterialet (40 µL) pipetert i sine respektive brønner.



Figur 9: Eksempel på markering av kassetter til antistoffscreening. Til venstre; et eksempel på en markert DARA-prøve, til høyre; et eksempel på markert pasientprøve med kjent antistoff. (egen illustrasjon)

Videre ble alle kassettenes inkubert ved 37 °C i 15 minutter. Det var viktig å kontrollere at temperaturindikatoren lyste grønt før inkubasjonen startet. Etter 15 minutter ble kassettenes sentrifugert. Sentrifugehastigheten var ferdig innstilt i to ulike hastigheter på totalt fem minutter. 794 RPM ved de første to minuttene, og 1510 RPM ved de resterende tre minuttene. Dette måtte gjøres innen 30 minutter etter ferdig inkubasjon for å unngå feilkilder. Ortho



Figur 10: Ortho Workstation ved seksjon blodbank ved St. Olavs hospital (eget foto)

Workstation ble brukt til både inkubasjon og sentrifugering av kassetene, se figur 10. Etter sentrifugering var kassetene klare til vurdering, se kapittel 2.5.

## 2.4 Identifisering av irregulære antistoff

Metoden benytter indirekte antiglobulinteknikk for å identifisere irregulære antistoffer i blodsystemene Rh, Kell, Duffy, Kidd, Sex Linked, Lewis, MNS, P og Lutheran. Det ble benyttet plasmaprøver ved denne metoden.

Antistoffidentifisering ble utført for å teste ut om DTT påvirker identifisering av antistoff. I realiteten skal metoden for DTT-behandling benyttes for screening og ikke identifisering. Dette er grunnet utfordring knyttet til tillagning av DTT-behandlede panelceller på grunn av stort antall og begrenset mengde celler. DTT-behandling av panelceller kan vurderes dersom screening med DTT-behandlede celler av en DARA-pasient er positiv.

Ved identifisering av irregulære antistoff ble det brukt Ortho BioVue system polyspesifikke kassetter med anti-IgG og anti-C3d, i tillegg 0,8% Resolve Panel B celler 12-22. Alle reagensene benyttet var fra Ortho Clinical Diagnostics.

Hver pasientprøve brukte totalt to kassetter der brønnene ble merket 12 til 22 som representerte hver panelcelle, som vist på figur 11. DARA-prøvene ble merket med *DARA I-6*, og prøvene med kjent antistoff ble merket *Prøve I-VIII* og *kjent antistoff*. Etter å ha markert alle brønnene ble folien fjernet, og celler (50 µL) ble pipettert i sine respektive brønner. Deretter ble plasma fra pasienter (40 µL) pipettert i sine respektive brønner. Hver prøve ble testet med både ubehandlede og DTT-behandlede panelceller.

Etter pipettering ble alle kassetene inkubert, sentrifugert og vurdert på tilsvarende måte som screeningkassetene omtalt i kapittel 2.3.



Figur 11: Eksempel på markerte kassetter til antistoffidentifisering. (egen illustrasjon)

## 2.5 Vurdering av resultat

Kassetten av type Ortho BioVue system anvender en agglutinasjonsteknologi basert på glasskuler. Dersom det oppstår hemagglutinasjon blir agglutinatet fanget i glassperlematriksen under sentrifugeringen og observeres på toppen av brønnen. Ved ingen hemagglutinasjon vil alle cellene legge seg på bunnen av brønnen (38). Ved svake reaksjoner legger agglutinatet mellom toppen og bunnen av brønnen.

Det ble utført en visuell gradering av kassetten. Resultatet ble gradert fra 0 til 4+ avhengig av styrken på agglutinasjonsreaksjonen, se figur 12. Styrken på agglutinasjonen avhenger av mengden antistoffer i pasientens plasma. Desto sterkere reaksjon, desto høyere gradering. Et negativt resultat blir vurdert til 0, men dersom det er tegn til spor blir det vurdert til 0,5+. Antistoffscreeningen gir kun svar på om pasienten har antistoff eller ikke. Dersom screeningen er positiv, får man ikke et definitivt svar på hvilke antistoff pasienten har. Etter gradering kunne resultatet sammenlignes med et tilhørende antigram, se vedlegg 12, som kan gi en indikasjon på hvilke antistoff pasienten har i sitt plasma. Ved antistoffidentifiseringen ga kassetten et reaksjonsmønster som ble sammenlignet med et tilhørende antigram, se vedlegg 13. Slik kan det irregulære antistoffet identifiseres.



Figur 12: Gradering av hemagglutinasjon i kassetene fra Ortho Clinical Diagnostics. En reaksjon på 4+ tilsvarer en sterk og solid reaksjon, mens en 0-reaksjon tilsvarer en negativ reaksjon. (egen illustrasjon)

### 3 Resultater

Behandling av myelomatosepasienter med DARA forstyrrer ulike pretransfusjonsundersøkelser. Testceller som benyttes i disse undersøkelsene kan behandles med DTT for å redusere DARA-interferens. Det ble gjort en metodeutprøvelse og validering på om de DTT-behandlede testcellene var holdbare i fire uker. Ønsket er altså å sikre trygg transfusjon, samt utvikle en mindre tids- og ressurskrevende metode sammenlignet med genetisk blodtypering for pretransfusjonsundersøkelser av DARA-pasienter. Ettersom den modifiserte metoden fra Danmark brukte samme leverandør som AIT, seksjon Blodbanken ved St. Olavs Hospital, ble det ønskelig å teste ut holdbarheten.

Det ble utført totalt fire oppsett antistoffscreening og ett oppsett antistoffidentifisering, med omtrent én ukes intervall mellom hver screening. Siste screeningsoppsett ble satt opp fire dager før utløpsdatoen av screeningscellene, som var det nærmeste tidspunktet før utløpsdatoen det var mulig å utføre screeningen. Ved screeningen og identifiseringen ble både ubehandlede og DTT-behandlede screeningsceller og panelceller benyttet parallelt. Metoden ble ikke testet på utvidet forlik da holdbarheten på forliket er på fire døgn, som er det minste antall dager man må vente etter tillagning av DTT-behandlede celler før bruk, og er dermed ikke forenlig med bruk i vanlig rutine.

### 3.1 Antistoffscreening av DARA-prøver

DARA-prøvene hadde ingen kjente antistoff fra tidligere screeningundersøkelser, men det kunne likevel ikke utelukkes at pasientene hadde blitt immunisert ved senere anledning.

Tabell 1 og vedlegg 2, 4, 6 og 8 viser screeningsresultatene av DARA-prøvene.

*Tabell 1: Resultat for DARA-prøver 1-6 ved fire utførte screeningsundersøkelse med ca. én ukes intervall. Prøvene testes både med ubehandlede og DTT-behandlede screeningceller. Agglutinasjonen ble gradert fra 0 til 4+, der en 0-reaksjon tilsvarer ingen agglutinasjon og en 4+-reaksjon tilsvarer en sterk agglutinasjon.*

DARA prøve	Screening uke	Ubehandlede screeningceller			DTT-behandlede screeningceller		
		1	2	3	1	2	3
1	1	1+	1+	1+	0	0	0,5+
	2	1+	1+	1+	0	0	0
	3	1+	1+	1+	0	0	0
	4	1+	1+	1+	0	0	0
2	1	1+	1+	1+	0	0	0,5+
	2	1+	1+	1+	0	0	0
	3	1+	1+	1+	0	0	0
	4	1+	1+	1+	0	0	0
3	1	1+	1+	1+	0	0	0
	2	1+	1+	1+	0	0	0
	3	1+	1+	1+	0	0	0
	4	1+	1+	1+	0	0	0
4	1	1+	1+	1+	0	0	0
	2	1+	1+	1+	0	0	0,5+
	3	1+	1+	1+	0	0	0
	4	1+	1+	1+	0	0	0
5	1	1+	1+	1+	0	0	0,5+
	2	1+	1+	1+	0	0	0,5+
	3	1+	1+	1+	0	0	0
	4	1+	1+	1+	0	0	0
6	1	1+	1+	1+	0	0	0
	2	1+	1+	1+	0	0	0
	3	1+	1+	1+	0	0	0
	4	1+	1+	1+	0	0	0

Resultatene viste som forventet at DARA trolig hadde interferert med screeningundersøkelsen. På alle prøvene observeres det kun positive reaksjoner med de ubehandlede screeningscellene ved samtlige screeninger. Med bruk av DTT-behandlede screeningsceller ble resultatene hovedsakelig negative. Unntaksvis oppstod noen sporreaksjoner hos prøve 1, 2, 4 og 5 med screeningscelle 3.

### 3.2 Antistoffscreening av prøver med kjente blodtypeantistoffer og kontroll

Prøver med kjente antistoff ble inkludert i screeningsundersøkelsene sammen med DARA-prøvene. Hensikten var å undersøke om at klinisk viktige antistoff fremdeles kunne påvises med bruk av DTT-behandlede screeningsceller. I tillegg observere at anti-K ble svekket eller ikke påvisbar. Screeningresultatene til prøvene med kjente antistoff er vist i tabell 2 og vedlegg 1, 3, 5 og 7.

Tabell 2: Resultat for prøver I-VIII med kjente antistoff og kontroll (QC2) ved fire utførte screeningsundersøkelse med ca. én ukes intervall. Prøvene testes både med ubehandlede og DTT-behandlede screeningceller. Prøve IV og VI ble valgt bort etter screening 2. "-" viser til ikke gjennomført screening grunnet mangel på materiale. Agglutinasjonen ble gradert fra 0 til 4+, der en 0-reaksjon tilsvarer ingen agglutinasjon og en 4+-reaksjon tilsvarer en sterk agglutinasjon.

Prøve	Kjente antistoff	Screening uke	Ubehandlede screeningceller			DTT-behandlede screeningceller		
			1	2	3	1	2	3
I	Anti-D + Anti-K	1	3+	3+	0	3+	3+	0
		2	3+	3+	0	3+	3+	0
		3	3+	3+	0	3+	3+	0
		4	3+	3+	0	-	-	-
II	Anti-E + Anti-K	1	3+	4+	0	0,5+	4+	0
		2	2+	4+	0	0,5+	4+	0
		3	3+	4+	0	0,5+	3+	0
		4	3+	4+	0	0	4+	0
III	Anti-K	1	2+	0	0	0	0	0
		2	2+	0	0	0	0	0
		3	2+	0	0	0	0	0
		4	1+	0	0	0	0	-
IV	Anti- $\bar{c}$ (Sterk)	1	0	3+	3+	0,5+	3+	3+
		2	0	3+	3+	0,5+	3+	3+
		3						
		4						
V	Anti-D (1:512)	1	2+	2+	0	3+	3+	0
		2	1+	1+	0	1+	1+	0
		3	2+	2+	0	2+	2+	0
		4	0,5+	0,5+	0	-	-	-
VI	Anti-D (Sterk)	1	3+	3+	0	3+	3+	0
		2	3+	3+	0	3+	3+	0
		3						
		4						
VII	Anti-D (Svak)	1	1+	1+	0	2+	2+	0
		2	0	0	0	0,5+	0,5+	0
		3	0	0	0	1+	1+	0
		4	0	0	0	0	1+	0
VIII	Anti- $\bar{c}$ (Svak)	1	0	1+	1+	0	2+	2+
		2	0	1+	1+	0	1+	1+
		3	0	1+	1+	0	1+	1+
		4	0	1+	1+	0	2+	2+
QC2	Anti- $\bar{c}$	1	0	3+	3+	0	3+	3+
		2	0	3+	3+	0	3+	3+
		3	0	3+	3+	0	3+	3+
		4	0	3+	3+	-	-	-



Kontrollen ble godkjent ved alle screeningoppsettene. Ved siste screeningoppsett med DTT-behandlede celler ble ikke kontrollen testet. Dette skyldtes at det ikke ble laget tilstrekkelig mengde av cellene. Av samme grunn ble heller ikke siste screening av prøve II, III og V utført med DTT-behandlede celler, dette er markert med "-" i tabell 2.

Ved de to første screeningoppsettene ble det undersøkt prøver med ulik konsentrasjon av anti-D og anti- $\bar{c}$ . Prøve IV hadde sterk konsentrasjon av anti- $\bar{c}$ , mens prøve VIII hadde svak konsentrasjon. Prøve VI hadde sterk konsentrasjon av anti-D, mens prøve V og VII var fortynnet med PBS for å ha en svakere konsentrasjon. Prøve IV og VI ble seponert ved de to siste screeningoppsettene, ettersom prøvene med svakere konsentrasjon var mer interessante å studere videre. Formålet var å undersøke om svake antistoffkonsentrasjoner var påvisbare med DTT-behandlede screeningsceller også etter nærmere fire uker.

Hovedsakelig var det god overensstemmelse mellom resultatene til ubehandlede og DTT-behandlede screeningsceller. Avvik på dette sees ved prøve II, IV og VII. Prøve II og VII fikk en falsk negativ reaksjon med DTT-behandlet screeningscelle 1. Prøve VII fikk falske negative reaksjoner ved de tre siste oppsettene med ubehandlede screeningsceller. Ved prøve IV ble det observert sporreaksjon med DTT-behandlet screeningcelle 1, noe som ikke var forventet da cellen er negativ for antigen  $\bar{c}$ .

Det observeres sterkere reaksjoner med bruk av DTT-behandlede screeningceller sammenlignet med de ubehandlede cellene ved prøvene IV, V, VII og VIII. Videre påvises ikke anti-K i prøve III med bruk av de DTT-behandlede cellene. I løpet av de fire screeningoppsettene har resultatene holdt seg noenlunde stabile, bortsett fra noen prøver der graderingen har økt eller minket med 1+. Prøve V og VII ga ustabile resultater over tid.

### 3.3 Antistoffidentifisering av DARA-prøver

Hensikten med å gjennomføre antistoffidentifisering av DARA-prøvene var å undersøke om DTT-behandling av panelceller eliminerte DARA-interferensen. Dette er fordi det er viktig å ha muligheten til å gjennomføre en antistoffidentifisering med bruk av DTT-behandlede panelceller, etter en positiv antistoffscreening av DARA-prøver med bruk av DTT-behandlede screeningsceller. Identifiseringsresultatene av DARA-prøvene er vist i tabell 3 og vedlegg 10.

*Tabell 3: Resultat for DARA-prøve 1-6 ved antistoffidentifisering. Prøvene testes både med ubehandlede og DTT-behandlede panelceller. Agglutinasjonen ble gradert fra 0 til 4+, der en 0-reaksjon tilsvarende ingen agglutinasjon og en 4+-reaksjon tilsvarende en sterk agglutinasjon.*

DARA prøve	Ubehandlede panelceller										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	0,5+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
2	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
3	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
4	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
5	1+	0,5+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
6	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+	1+
DARA prøve	DTT-behandlede panelceller										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Det observeres DARA-interferens i alle prøvene testet med de ubehandlede panelcellene.

Denne interferensen forsvant med bruk av de DTT-behandlede panelcellene.

### 3.4 Antistoffidentifisering av prøver med kjente blodtypeantistoffer

Hensikten med antistoffidentifisering av prøver med kjente antistoff var å undersøke om antistoffene fremdeles var identifiserbare med bruk av DTT-behandlede panelceller, samt vise at DTT-behandling av panelceller førte til at anti-K ikke kunne identifiseres. Resultatene fra antistoffidentifisering av prøver med kjente antistoff er vist i tabell 4 og vedlegg 9 og 11.

*Tabell 4: Resultat for prøver I, II, III, V, VI, VII og VIII med kjente antistoff ved antistoffidentifisering. Prøvene testes både med ubehandlede og DTT-behandlede panelceller, med unntak av prøve VI som kun ble identifisert med DTT-behandlede screeningceller. Agglutinasjonen ble gradert fra 0 til 4+, der en 0-reaksjon tilsvarer ingen agglutinasjon og en 4+-reaksjon tilsvarer en sterk agglutinasjon.*

Prøve	Kjente antistoff	Ubehandlede panelceller										
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
I	Anti-D + K	0	0	0,5+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	0	3+
II	Anti-E + K	0	0	3+	4+	4+	4+	0	0	4+	0	4+
III	Anti-K	0	0	1+	0	0	0	0	0	0	0	2+
V	Anti-D (1:512)	0	0	0	1+	0	0	0	0	2+	0	2+
VII	Anti-D (svak)	0	0	0	0	0	0	0,5+	0,5+	0	0	0,5+
VIII	Anti-lille c (svak)	1+	1+	1+	1+	1+	1+	0	0	0	0,5+	0,5+
Prøve	Kjente antistoff	DTT-behandlede panelceller										
		12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
I	Anti-D + K	0	0	0	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	4+
II	Anti-E + K	0	0	0	4+	4+	4+	0	0	4+	0	4+
III	Anti-K	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
V	Anti-D (1:512)	0	0,5+	0	1+	1+	1+	0,5+	0	0,5+	0,5+	0,5+
VI	Anti-D (sterk)	0	0	0	4+	4+	4+	4+	4+	4+	0	4+
VII	Anti-D (svak)	0	0,5+	0	0	0	0,5+	0,5+	0,5+	0,5+	0,5+	0,5+
VIII	Anti-lille c (svak)	2+	2+	2+	2+	2+	2+	0	0	0	1+	1+

Det ble ikke utført antistoffidentifisering av kontroll QC2 grunnet begrenset mengde ubehandlede og DTT-behandlede panelceller. Det er hovedsakelig godt samsvar mellom resultatene til prøvene med ubehandlede og DTT-behandlede panelceller, da det er mulig å identifisere det kjente antistoffet med begge cellene. Avvik observeres ved prøve V og VII, begge med svak konsentrasjon av anti-D. Reaksjonsmønsteret til disse to prøvene stemmer ikke overens med tilhørende antigram. Antigen D er uttrykt på panelcelle 15-20 og 22, dermed er det forventet positiv reaksjon med disse cellene. Prøve V har derimot fått en negativ reaksjon med ubehandlet panelcelle 16-19, og prøve VII har reagert negativt med ubehandlet panelcelle 15-17 og 20. Med DTT-behandlede panelceller har prøve V og VII reagert positivt med celle 13 og 21. Prøve V har reagert negativt med celle 19, og prøve VII har reagert negativt med 15 og 16.

Grunnet avvikene ved prøve V og VII ble det utført en ytterlig identifisering av prøve VI med sterk anti-D konsentrasjon med DTT-behandlede panelceller. Dette var for å undersøke om den sterkere antistoffkonsentrasjon kunne identifiseres uten avvik. Resultatene var som forventet.

Det observeres at anti-K ikke kan identifiseres med panelcellene som er behandlet med DTT, dette sees ved prøve I, II og III.

## 4 Diskusjon

### 4.1 DARA-prøver

Det observeres panreaktivitet hos alle DARA-prøvene med ubehandlede screeningceller ved alle de fire screeningoppsettene. Med bruk av DTT-behandlede screeningceller forsvant interferensen i tre av seks DARA-prøver ved det første oppsettet, og fire av seks ved det andre oppsettet. Hos prøvene der DARA-interferensen ikke forsvant fullstendig var det observert sporreaksjoner. Ved de to siste oppsettene forsvant interferensen hos alle DARA-prøvene.

Det var kun med screeningscelle 3 av de DTT-behandlede cellene at det ble observert sporreaksjoner ved de to første screeningoppsettene. Dette kan tyde på at sporreaksjonene kan være forårsaket av feilkilder direkte knyttet til screeningcelle 3. Dette kan blant annet skyldes feil ved selve DTT-behandlingen av screeningcellen. En mulig feilkilde kan ha vært at det var rester av DTT i pipettespissen etter tilsetning, noe som kan ha ført til at det ikke var nok DTT til å denaturere alle CD38-proteiner på overflaten til screeningcellen.

Under tillagingen av det første settet med DTT-behandlede screeningceller, skrudde vannbadet seg av slik at temperaturen sank fra 37 °C til 34 °C i omtrent to minutter. Temperaturen i vannbadet har betydning for DTT sin evne til å denaturere CD38 effektivt, og kan ha ført til sporreaksjonene ved screeningcelle 3. Dette er lite trolig da det ikke ble observert sporreaksjoner hos screeningcelle 1 og 2.

For denne metoden ble det anbefalt at alle cellene skulle stå i kjøleskapet i minimum fire døgn før de første screeningoppsettene ble utført, siden uspesifikke reaksjoner kunne forekomme. Det kan tenkes at dette er en mulig årsak til sporreaksjonene, særlig siden de to siste oppsettene ikke hadde sporreaksjoner.

Videre kan andre ting som feil ved pipettering og gradering være mulige årsaker.

Plassmangel i sentrifugen og tidskrevende pipettering førte til at det tok lengre tid før noen av kassetene ble sentrifugert. Dette kan ha ført til uttørking av kassetene og reagensene, noe som kan ha blitt forvekslet med agglutinasjon. Det ble observert fibrintråder ved noen av prøvene, som kan ha gjort det vanskeligere å gradere kassetene. Fibrintrådene hadde trolig ikke noe med metoden å gjøre, men heller at prøvene ble oppbevart ved -20 °C mellom hvert screeningoppsett.

Resultatet av antistoffidentifiseringen viser panreaktivitet hos alle DARA-prøvene, og med bruk av DTT-behandlede panelceller fjernes interferensen hos alle prøvene. Dette viser at metoden også er mulig å utføre på panelcellene. Resultatet til identifiseringen stemte overens med resultatene til screeningoppsettene, og dette er med på å vise at ingen av pasientene hadde blitt immunisert.

## 4.2 Kjente blodtypeantistoff

Etter DTT-behandling av testcellene var det fremdeles mulig å påvise klinisk viktige blodtypeantistoff mot antigen som ikke påvirkes av DTT. Disse blodtypeantistoffene var mulig å påvise hos syv av åtte prøver under antistoffscreening og fem av syv prøver under antistoffidentifisering. Anti-K ble svekket eller ikke påvisbar med DTT-behandlede testceller hos alle prøvene. Dermed kan det antas at DTT denaturerer Kell-antigenet på overflaten av cellene. Dette viser DTT sin egenskap i å denaturere CD38-proteinet, da både Kell-antigenet og CD38 inneholder disulfidbindinger.

Av avvikene observert ved antistoffscreening- og identifisering, var det spesielt prøve V og VII med svak anti-D konsentrasjon som ga uspesifikke reaksjoner. Begge prøvene ble fortynnet med PBS for å oppnå en svakere anti-D konsentrasjon, og de ble muligens fortynnet i den grad at et synlig agglutinat ikke lenger kunne observeres. På samme måte har screening- og identifiseringstestene en sensitivitetsgrense, og titer-konsentrasjonen av anti-D har muligens havnet under denne. Dette kan ha gitt falske negative resultater.

I og med at resultatene til alle prøvene, bortsett fra V og VII, generelt ga godt samsvar med antigram og forventede resultat, antyder dette at det er fortynningseffekten som er grunnlaget for avvikene. Dette støttes ved at prøve VI, som har en sterkere anti-D konsentrasjon, ga forventede resultater. Fortynningen med PBS kan ha endret viskositeten til prøvene, noe som kan ha ført til uspesifikke reaksjoner. Muligens har PBS også direkte interferert med testene.

Andre feilkilder knyttet til falske negative reaksjoner kan være forsinkelse under utførelsen av testene. Forsinkelsen kan ha ført til at bundet IgG løsnet fra screening- og panelcellene, noe som da kan ha hindret synlig agglutinasjon. I tillegg kan gjentatt frysning og opptining av prøvene ha ført til redusert reaktivitet av antistoff i prøvene.

Ved de DTT-behandlede panelcellene ble det observert falske positive sporreaksjoner hos prøve V og VII med panelcelle 13 og 21. Disse panelcellene var negative for antigen-D, så en positiv reaksjon var svært uforventet. Slike uspesifikke reaksjonene kan antas skyldes selve DTT-behandlingen, men andre mulige feilkilder som pipetteringsfeil eller forveksling av materialet kan ikke utelukkes.

Prøve IV ga sporreaksjon med DTT-behandlet screeningcelle 1 der reaksjonen egentlig skulle bli negativ. I og med at prøven ble seponert etter andre screening, blir det vanskelig å vurdere om sporreaksjonene er et vedvarende problem, eller om det kun er tilknyttet de første screeningene. Som tidligere nevnt, kan uspesifikke reaksjoner oppstå ved de første screeningundersøkelsene.

Hos prøve II og VII ble det observert falske negative reaksjoner med DTT-behandlet screeningcelle 1 ved siste screeningoppsett. Dette var trolig grunnet for lite mengde av screeningscelle 1, slik at det ikke var mulig å pipettere den totale mengden nødvendig ved siste oppsett. Dette kan ha gitt en svakere reaksjon da det er en redusert mengde screeningsceller som antistoffene kan binde seg til.

Det observeres ved flere tilfeller at DTT-behandlede screening- og panelceller gir forsterkede agglutinasjonsreaksjoner sammenlignet med de ubehandlede cellene ved samme prøve. Det kan spekuleres om DTT har en tilsvarende effekt som enzymbehandling av panelceller. Denaturering av visse antigen kan ha ført til økt eksponering av flere epitoper, slik at disse blir mer tilgjengelige for binding med korresponderende antistoff. Dette kan ha resultert i forsterkede agglutinasjonsreaksjoner.

Graderingen av prøvene mellom de fire screeningoppsettene varierer. Denne variasjonen skyldes trolig ikke holdbarheten på de DTT-behandlede cellene, da graderingen ikke reduseres over tid, men heller svinger mellom de ulike oppsettene. Mest sannsynlig er dette grunnet visuell avlesning av kassetene gjennomført av forskjellige personer. I tillegg var det tilfeller der agglutinasjonen sto mellom to graderinger, noe som kan ha ført til feilgradering. Hvilket sett screeningsceller som ble brukt ved de ulike oppsettene varierte, så det er mulig at de to settene kunne ha hatt ulike suspensjonsstyrker, noe som da kan ha gitt variasjon i graderingen.

## 5 Konklusjon

Metoden for DTT-behandling av screeningceller fjerner DARA-interferens, samtidig som kjente antistoff fremdeles kan påvises. De DTT-behandlede screeningcellene hadde stabil holdbarhet over tid, også nær utløpsdatoen. Metoden kan også benyttes for å DTT-behandle panelceller ved antistoffidentifisering. Vi tenker at dette er hensiktsmessig å utføre dersom antistoffscreeningen med DTT-behandlede celler er positive for DARA-pasienter.

For å konkludere anbefales det å ta i bruk metoden for DTT-behandling av screeningsceller i rutine for blodutgivelse til pasienter behandlet med DARA. Metoden vil bidra til å spare tid og ressurser, og vil være til nytte for den daglige driften, ikke bare ved Avdeling for Immunologi og Transfusjonsmedisin, Seksjon blodbanken, St. Olavs hospital, men også Helse Midt-Norge.



## 6 Referanser

1. Institutt for kreftgenetikk og informatikk OUS. Benmargskreft (Myelomatose) [Internett]. [sitert 20. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://kreflex.no/Myelomatose>
2. Hoffbrand AV, Steensma DP. Hoffbrand's essential haematology. 8.utg. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons Ltd; 2020. 417 s.
3. Montalto FI, De Amicis F. Cyclin D1 in Cancer: A Molecular Connection for Cell Cycle Control, Adhesion and Invasion in Tumor and Stroma. *Cells*. 9. desember 2020;9(12):2648.
4. Kreftregisteret. Årsrapport Nasjonalt kvalitetsregister for lymfoide maligniteter 2020. 2021; Tilgjengelig på: <https://www.kvalitetsregistre.no/sites/default/files/2021-10/C3%85rsrapport%20Nasjonalt%20kvalitetsregister%20for%20lymfoide%20maligniteter%202020.pdf>
5. Kreftforeningen. Benmargskreft [Internett]. [sitert 25. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://kreftforeningen.no/om-kreft/kreftformer/benmargskreft/>
6. Institutt for kreftgenetikk og informatikk OUS. Symptomer ved benmargskreft (myelomatose) [Internett]. [sitert 25. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://kreflex.no/Myelomatose/BAKGRUNN/Symptomer?CancerType=Myelomatose>
7. Jagannath S. Pathophysiological Underpinnings of Multiple Myeloma Progression. *JMCP*. september 2008;14(7 Supp A):7–11.
8. Helsedirektoratet. Nasjonalt handlingsprogram med retningslinjer for diagnostikk, behandling og oppfølging av maligne blodsykdommer [Internett]. 2021. Tilgjengelig på: [https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/maligne-blodsykdommer-handlingsprogram/Maligne%20blodsykdommer%20E2%80%93%20Nasjonalt%20handlingsprogram%20med%20retningslinjer%20for%20diagnostikk,%20behandling%20og%20oppf%C3%B8lging.pdf/\\_/attachment/inline/0ec076b8-71ba-450e-83f3-76919e5ab024:45490c50d4c081bbb13ed61836ee548b48a02577/Nasjonalt%20handlingsprogram%20med%20retningslinjer%20for%20diagnostikk,%20behandling%20og%20oppf%C3%B8lging%20av%20maligne%20blodsykdommer.pdf](https://www.helsedirektoratet.no/retningslinjer/maligne-blodsykdommer-handlingsprogram/Maligne%20blodsykdommer%20E2%80%93%20Nasjonalt%20handlingsprogram%20med%20retningslinjer%20for%20diagnostikk,%20behandling%20og%20oppf%C3%B8lging.pdf/_/attachment/inline/0ec076b8-71ba-450e-83f3-76919e5ab024:45490c50d4c081bbb13ed61836ee548b48a02577/Nasjonalt%20handlingsprogram%20med%20retningslinjer%20for%20diagnostikk,%20behandling%20og%20oppf%C3%B8lging%20av%20maligne%20blodsykdommer.pdf)
9. Institutt for kreftgenetikk og informatikk OUS. Diagnostisering ved benmargskreft (Myelomatose) [Internett]. [sitert 25. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://kreflex.no/Myelomatose/ProsedyreFolder/DIAGNOSTIKK/New-ksProcedureChapter>
10. Brigle K, Rogers B. Pathobiology and Diagnosis of Multiple Myeloma | Elsevier Enhanced Reader. *Seminars in oncology nursing*. 2017;33(3):225–36.
11. International Myeloma Foundation [Internett]. International Myeloma Foundation. [sitert 18. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://www.myeloma.org/%3Cfront%3E>
12. Institutt for kreftgenetikk og informatikk OUS. Behandling ved benmargskreft (Myelomatose) [Internett]. [sitert 25. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://kreflex.no/Myelomatose/ProsedyreFolder/BEHANDLING/New-ksProcedureChapter>

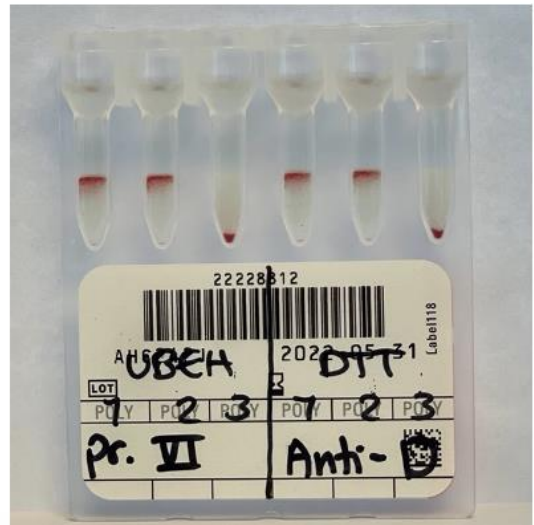
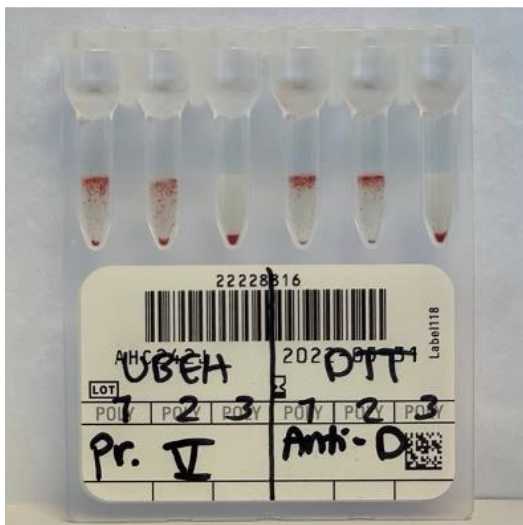
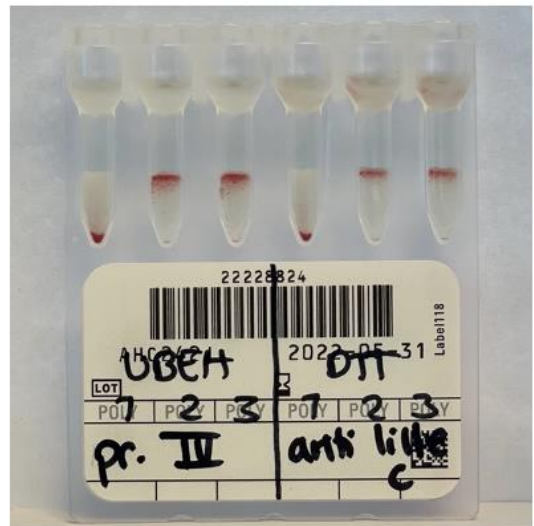
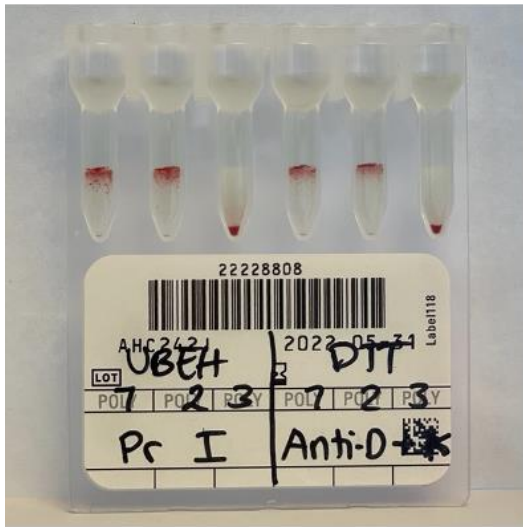
13. Oslo universitetssykehus. Benmargskreft (myelomatose) [Internett]. Oslo universitetssykehus. [sitert 20. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://oslo-universitetssykehus.no/behandlinger/benmargskreft-myelomatose>
14. Liu Q, Kriksunov IA, Graeff R, Munshi C, Lee HC, Hao Q. Crystal Structure of Human CD38 Extracellular Domain. *Structure*. 1. september 2005;13(9):1331–9.
15. van de Donk NWCJ, Janmaat ML, Mutis T, Lammerts van Bueren JJ, Ahmadi T, Sasser AK, mfl. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunological Reviews*. 2016;270(1):95–112.
16. Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP, Nahi H, Gimsing P, Hansson M, mfl. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *n engl j med*. 2015;373:1207–19.
17. Dubashi B, Gopal V. Daratumumab. *Indian J Med Paediatr Oncol*. 23. mai 2021;41(1):57–60.
18. Institutt for kreftgenetikk og informatikk OUS. Medisinsk behandling ved benmargskreft (Myelomatose) [Internett]. [sitert 26. april 2022]. Tilgjengelig på: <https://kreftlex.no/Myelomatose/ProsedyreFolder/BEHANDLING/Cellegift/New-ksProcedureChapter>
19. de Weers M, Tai YT, Jacobs DCH, Oomen LA, Peipp M, Valerius T, mfl. Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *The Journal of Immunology*. :10.
20. van der Veer MS, de Weers M, van Kessel B, Bakker JM, Wittebol S, Parren PWHI, mfl. The therapeutic human CD38 antibody daratumumab improves the anti-myeloma effect of newly emerging multi-drug therapies. *Blood Cancer Journal*. 1. oktober 2011;1(10):e41–e41.
21. Veer MS van der, Weers M de, Kessel B van, Bakker JM, Wittebol S, Parren PWHI, mfl. Towards effective immunotherapy of myeloma: enhanced elimination of myeloma cells by combination of lenalidomide with the human CD38 monoclonal antibody daratumumab. *Haematologica*. 1. februar 2011;96(2):284–90.
22. Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS, Verbist B, Bald J, Plesner T, mfl. Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*. 21. juli 2016;128(3):384–94.
23. Plesner T, Krejcik J. Daratumumab for the Treatment of Multiple Myeloma. *Front Immunol*. 2018;9:1228.
24. Garvik LJ, Braathen H. Ei kort innføring i blodbankarbeid [Internett]. Bioingeniøren. 2017 [sitert 16. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.bioingenioren.no/fag/fag-i-praksis/2014/ei-kort-innforing-i-blodbankarbeid/>
25. Quraishy N, Sapatnekar S. Advances in Blood Typing. *Adv Clin Chem*. 2016;77:221–69.
26. Howard P. Basic & applied concepts of blood banking and transfusion practices. 5. utg. Philadelphia: Elsevier; 2020. 420 s.

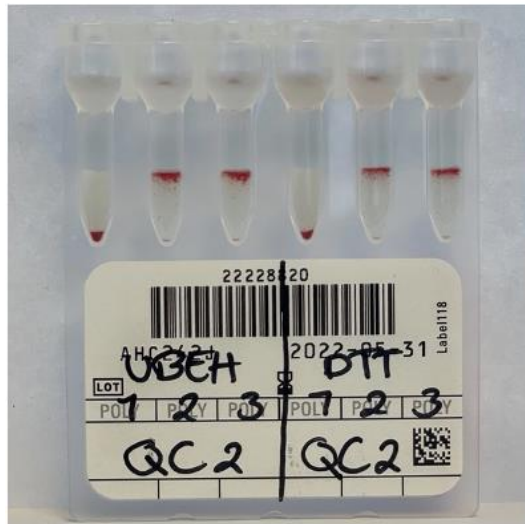
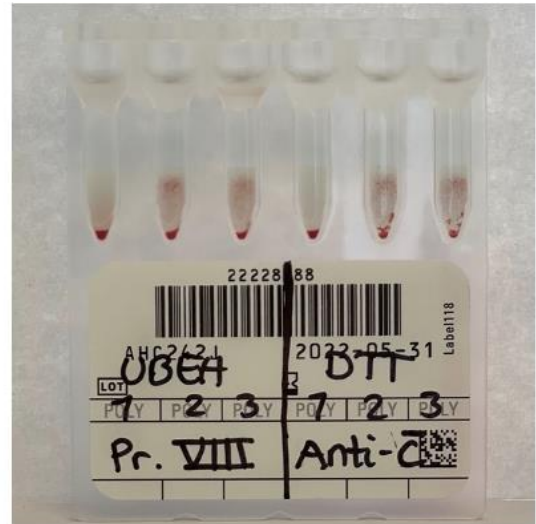
27. Harmening D. Modern blood banking & transfusion practices. 6.utg. Philadelphia: F.A. Davis; 2012. 648 s.
28. Quinley ED. Immunohematology: principles and practice. 2. utg. Philadelphia: Lippincott; 1998. 466 s.
29. Helsedirektoratet. Veileder for transfusjonstjenesten i Norge [Internett]. 7.3. Oslo; 2017. 91 s. Tilgjengelig på: [https://www.helsedirektoratet.no/veiledere/transfusjonstjenesten-i-norge-utgave-73/Transfusjonstjenesten%20i%20Norge%20utgave%207.3%20%E2%80%93%20Veileder.pdf/\\_/attachment/inline/6222d24e-ebdc-4588-a51f-735cc17f58c6:d6b6d627e05b9f68918723bf59407db19602a601/Transfusjonstjenesten%20i%20Norge%20utgave%207.3%20%E2%80%93%20Veileder.pdf](https://www.helsedirektoratet.no/veiledere/transfusjonstjenesten-i-norge-utgave-73/Transfusjonstjenesten%20i%20Norge%20utgave%207.3%20%E2%80%93%20Veileder.pdf/_/attachment/inline/6222d24e-ebdc-4588-a51f-735cc17f58c6:d6b6d627e05b9f68918723bf59407db19602a601/Transfusjonstjenesten%20i%20Norge%20utgave%207.3%20%E2%80%93%20Veileder.pdf)
30. Suddock JT, Crookston KP. Transfusion Reactions. I: StatPearls [Internett]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 [sitert 16. april 2022]. Tilgjengelig på: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482202/>
31. Helsedirektoratet. Transfusjonsreaksjoner [Internett]. 2020. Tilgjengelig på: [https://www.helsedirektoratet.no/tema/blodgivning-og-transfusjonsmedisin/meld-uonsket-hendelse-blodgivning-og-blodtransfusjon-hemovigilans/Definisjoner%20transfusjonsreaksjoner.pdf/\\_/attachment/inline/38250b72-ce92-40b9-af8d-b53865e9b97b:d7844678c828f89cdcd749cc2f6f4bba96bcafe3/Definisjoner%20transfusjonsreaksjoner.pdf](https://www.helsedirektoratet.no/tema/blodgivning-og-transfusjonsmedisin/meld-uonsket-hendelse-blodgivning-og-blodtransfusjon-hemovigilans/Definisjoner%20transfusjonsreaksjoner.pdf/_/attachment/inline/38250b72-ce92-40b9-af8d-b53865e9b97b:d7844678c828f89cdcd749cc2f6f4bba96bcafe3/Definisjoner%20transfusjonsreaksjoner.pdf)
32. Song J, Fu R. Review: Effects of anti-CD38 monoclonal antibodies on red blood cell transfusion and interventions. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2021;35(12):e23832.
33. Burnouf T, Cognasse F, Goubran H. Cell-derived microvesicles/microparticles in blood components: Consequences for transfusion recipients. *EHA*. 25. juni 2017;11(1):58–61.
34. Beiboer SHW, Wieringa-Jelsma T, Maaskant-Van Wijk PA, Van Der Schoot CE, Van Zwieten R, Roos D, mfl. Rapid genotyping of blood group antigens by multiplex polymerase chain reaction and DNA microarray hybridization. *Transfusion*. 2005;45(5):667–79.
35. AG scientific. Dithiothreitol (DTT) Applications You Must Know [Internett]. 2019 [sitert 8. mai 2022]. Tilgjengelig på: <https://agscientific.com/blog/dithiothreitol-dtt-applications.html>
36. Izaguirre EC, del Mar Luis-Hidalgo M, González LL, Castaño CA. New method for overcoming the interference produced by anti-CD38 monoclonal antibodies in compatibility testing. *Blood Transfus*. juli 2020;18(4):290–4.
37. Chapuy CI, Aguad MD, Nicholson RT, AuBuchon JP, Cohn CS, Delaney M, mfl. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion*. 2016;56(12):2964–72.

38. Reis K j., Chachowski R, Cupido A, Davies D, Jakway J, Setcavage T m. Column agglutination technology: the antiglobulin test. *Transfusion*. 1993;33(8):639–43.

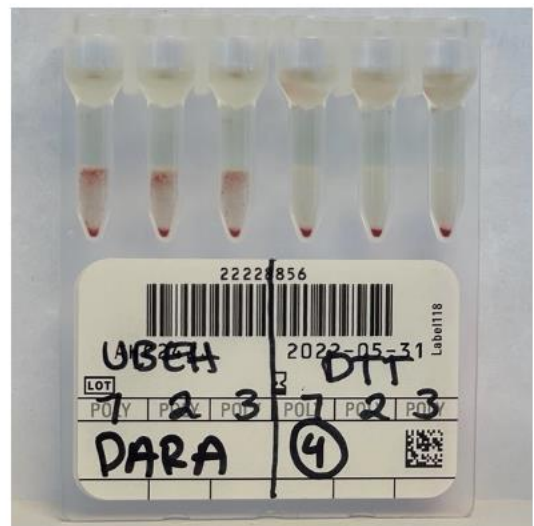
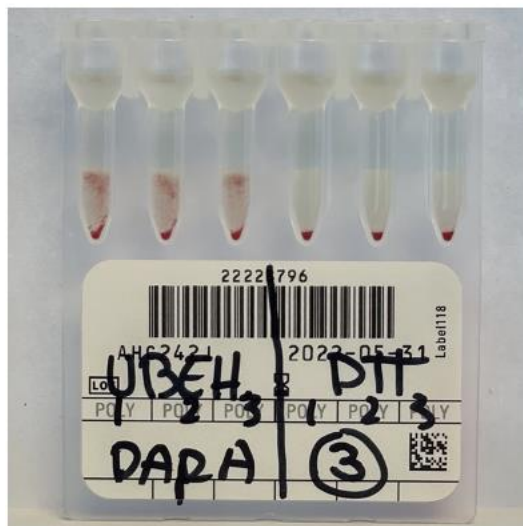
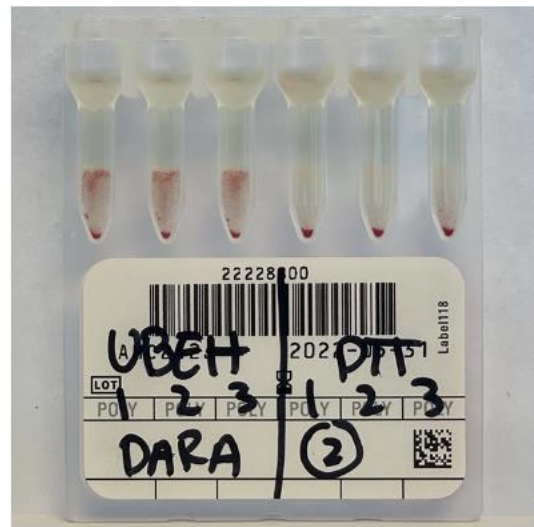
# 7 Vedlegg

## Vedlegg 1: Screening 1 – prøve I til VIII og QC2 med kjente antistoff

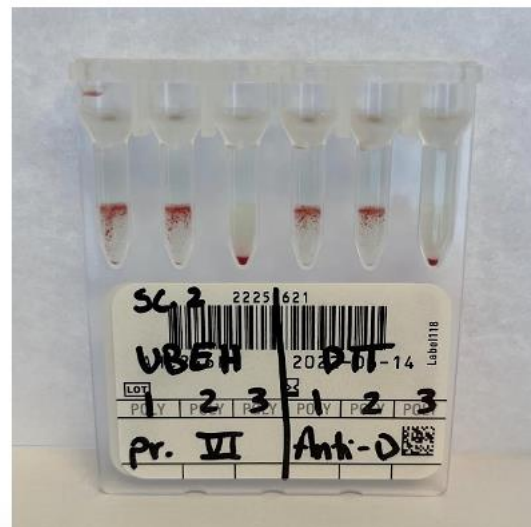
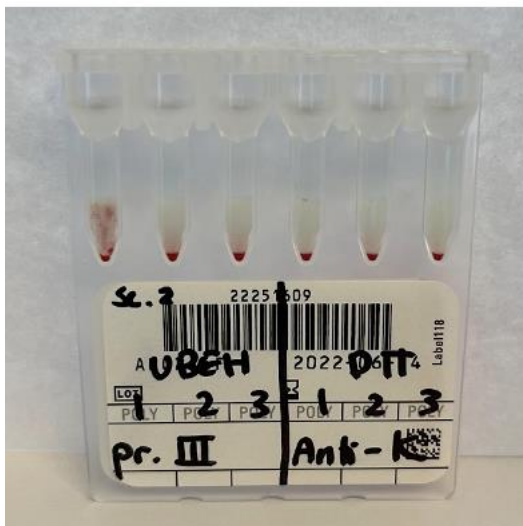
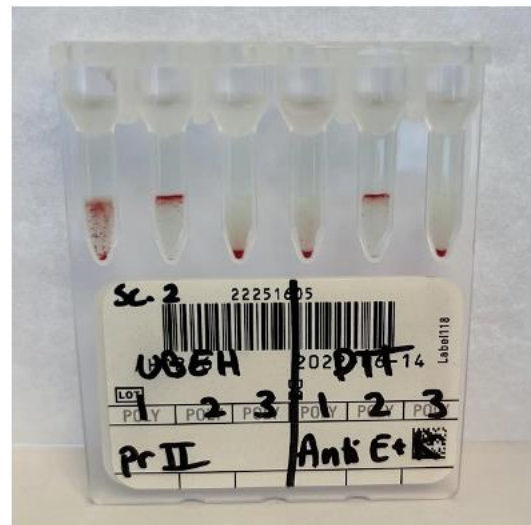




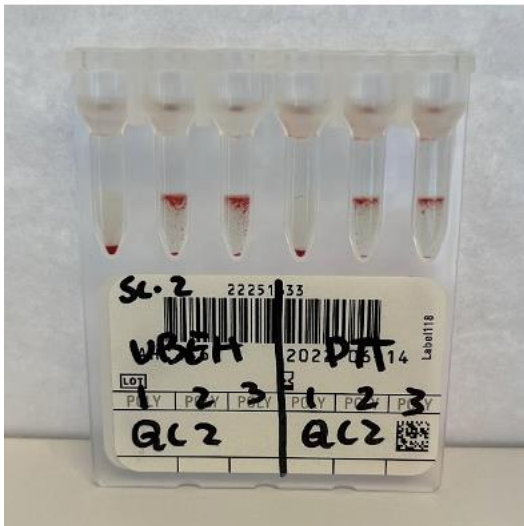
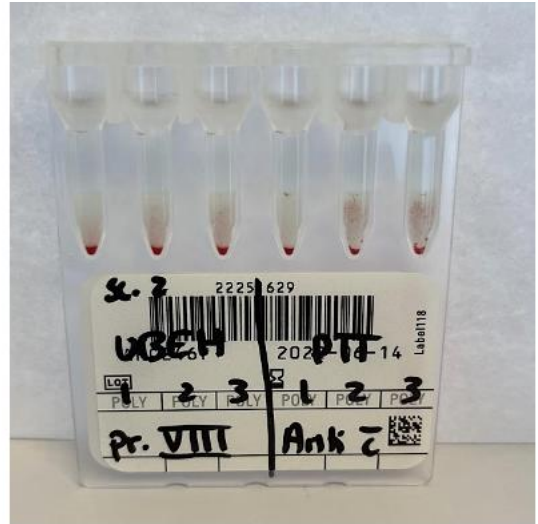
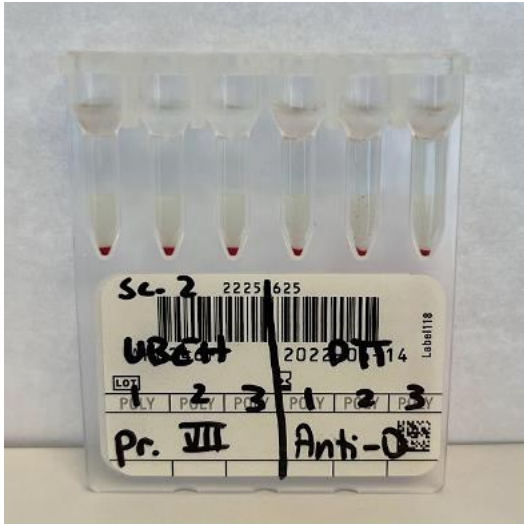
Vedlegg 2: Screening 1 - DARA-prøve 1 til 6



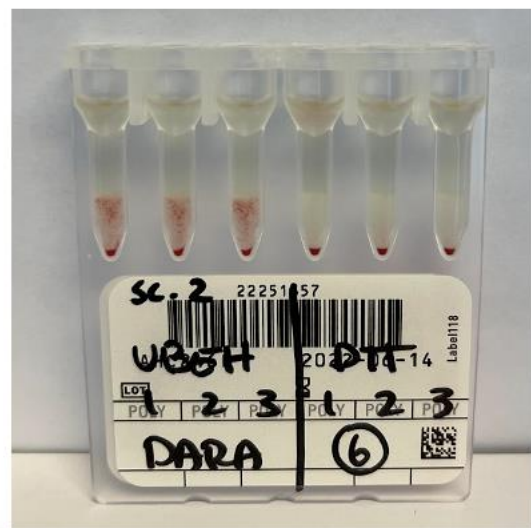
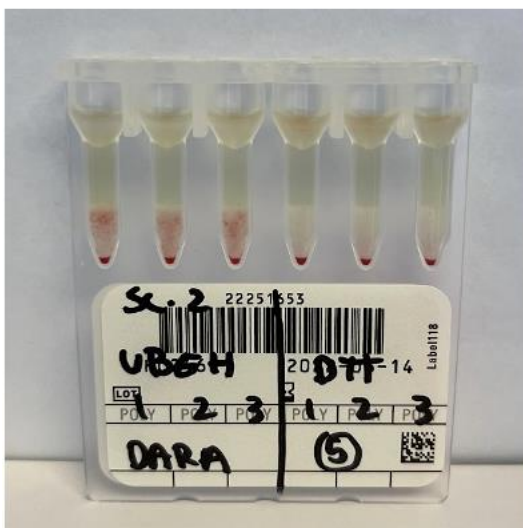
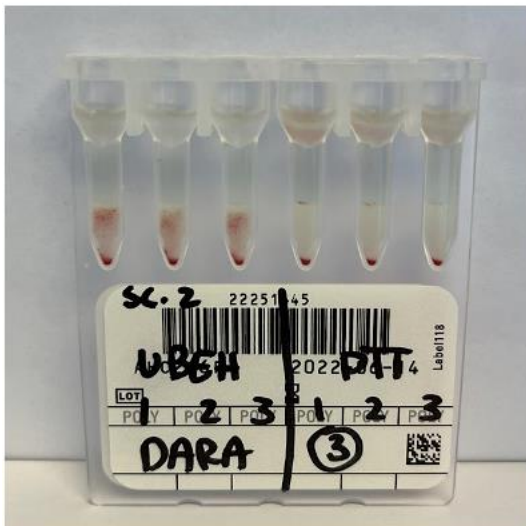
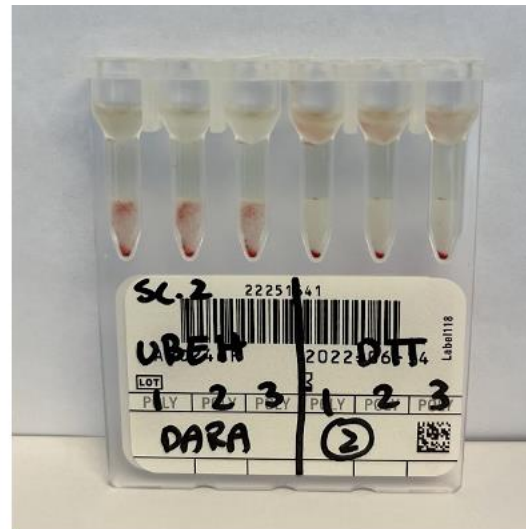
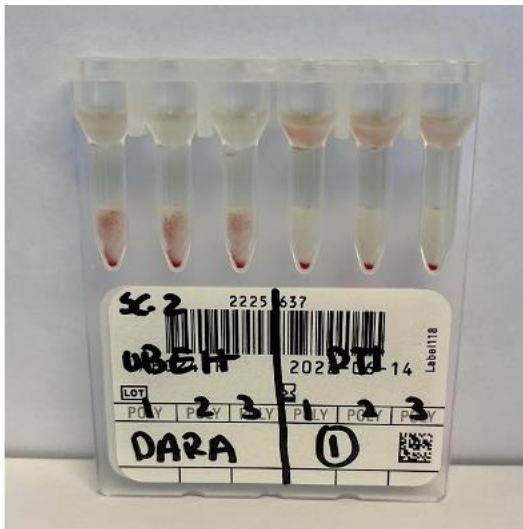
Vedlegg 3: Screening 2 – prøve I til VIII og QC2 med kjente antistoff







Vedlegg 4: Screening 2 - DARA-prøve 1 til 6

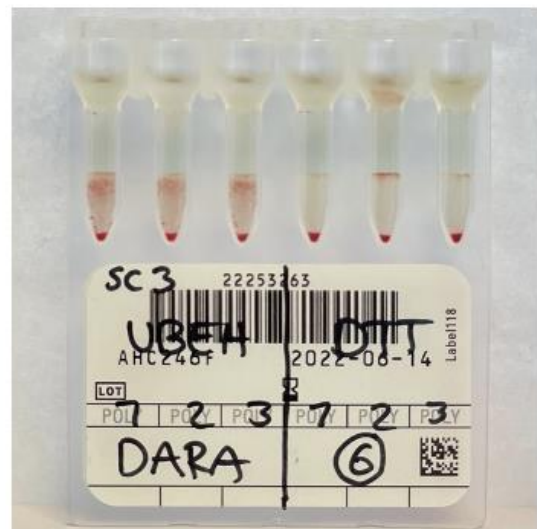
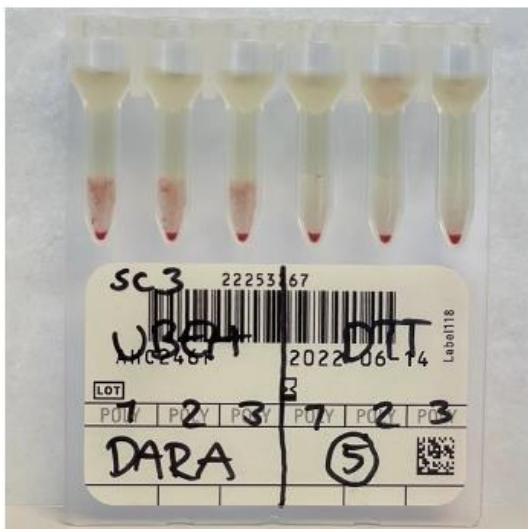
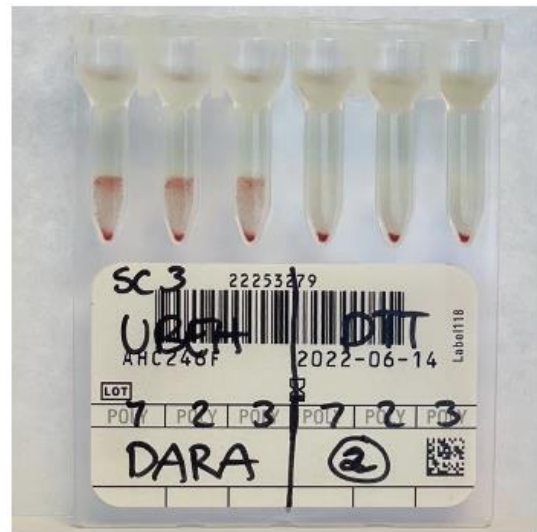
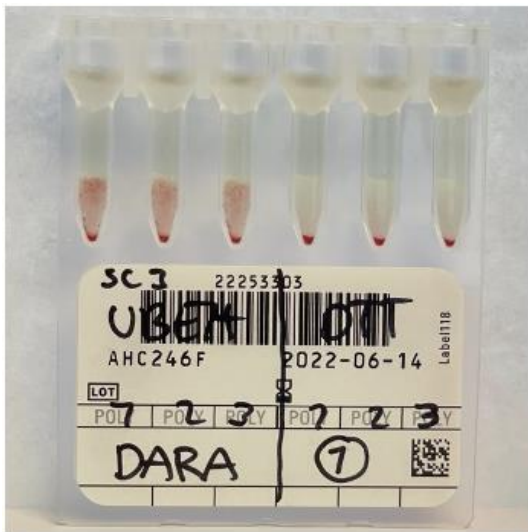


Vedlegg 5: Screening 3 – prøve I, II, III, V, VII og VIII med kjente antistoff

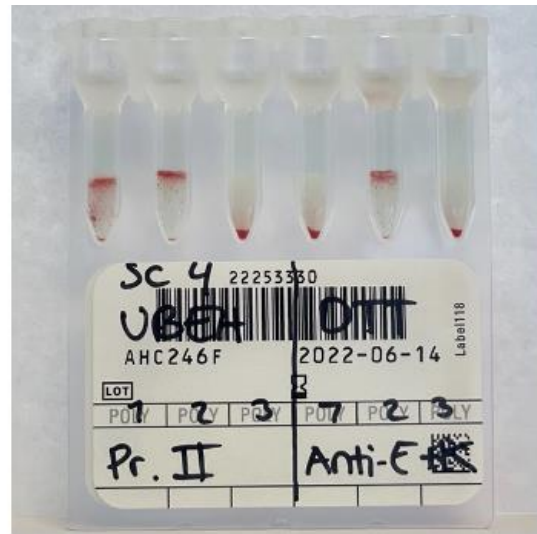
Mangler bilde av QC2 fra antistoffscreening uke 3.



Vedlegg 6: Screening 3 - DARA-prøve 1 til 6



Vedlegg 7: Screening 4 – prøve I, II, III, V, VII, VIII og QC2 med kjente antistoff



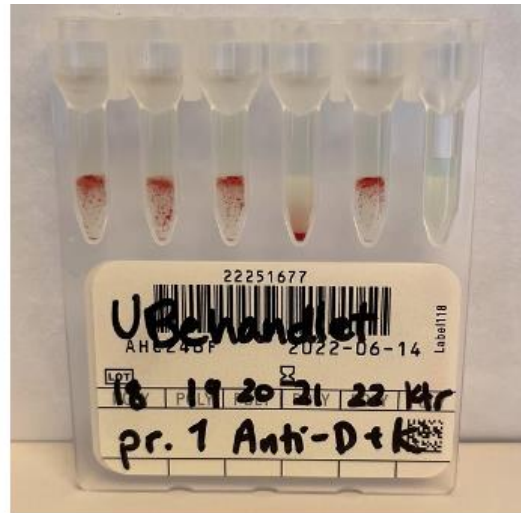


Vedlegg 8: Screening 4 - DARA-prøve 1 til 6

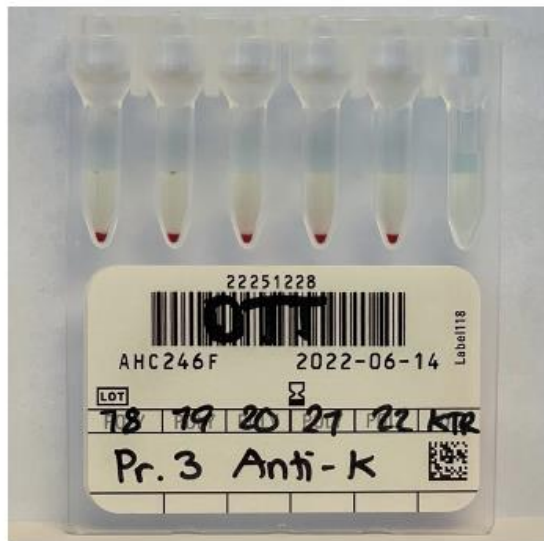
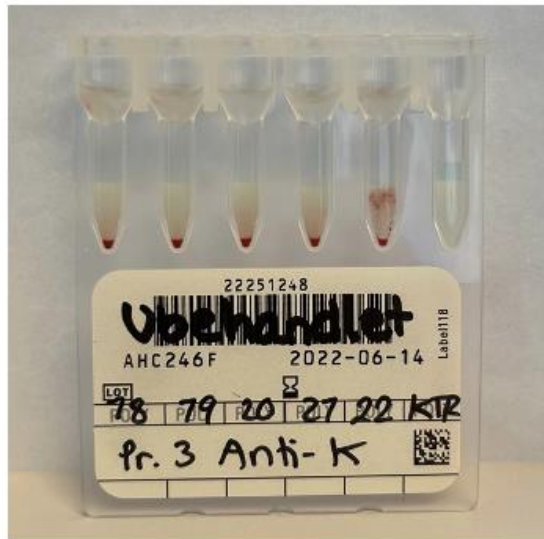
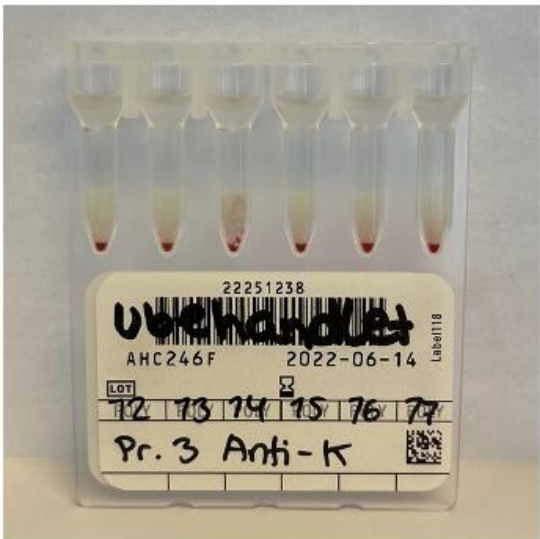
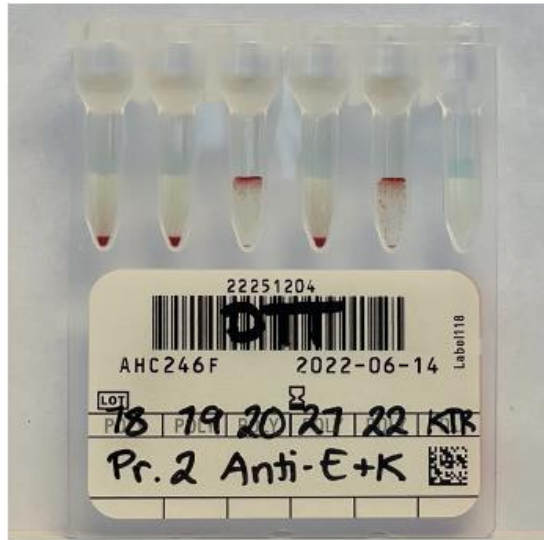
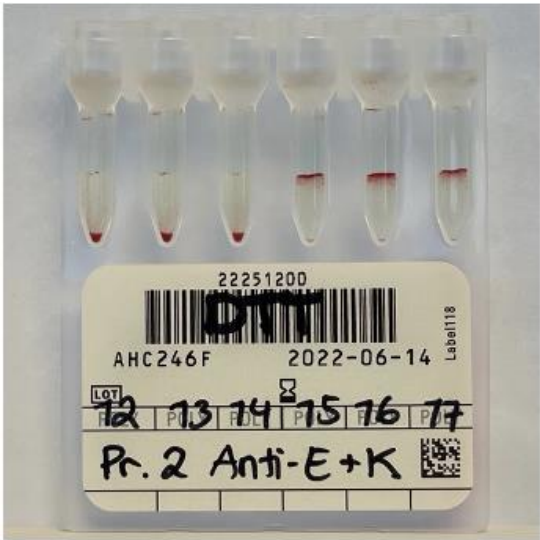


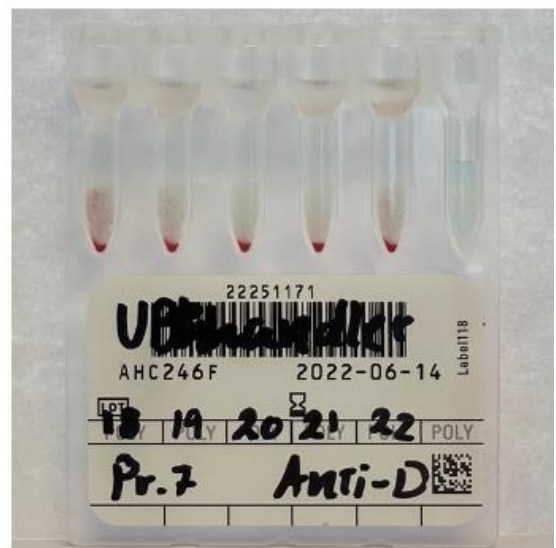
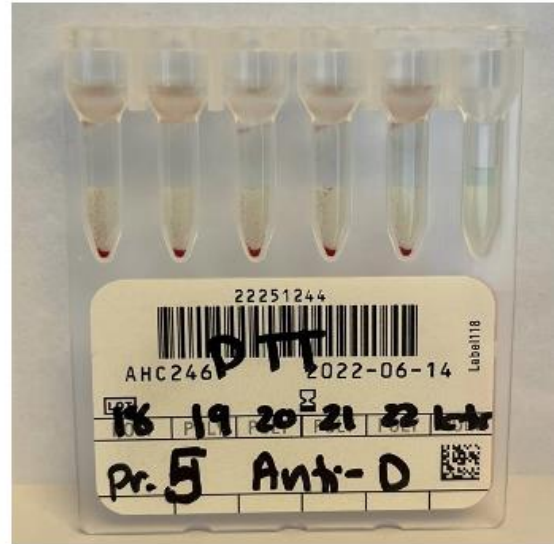
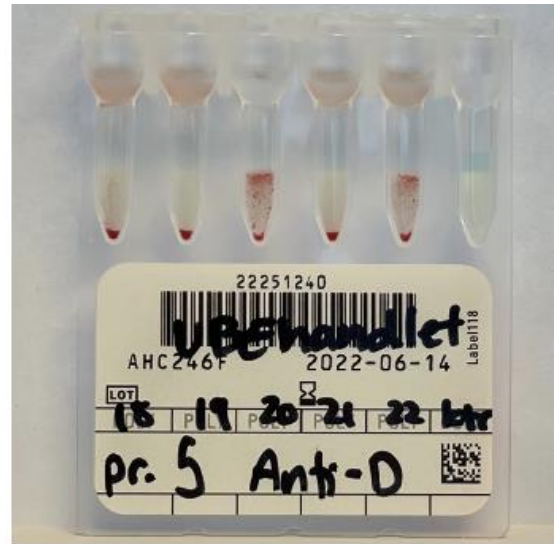
Vedlegg 9: Identifisering 1 - prøve I til VIII med kjente antistoff

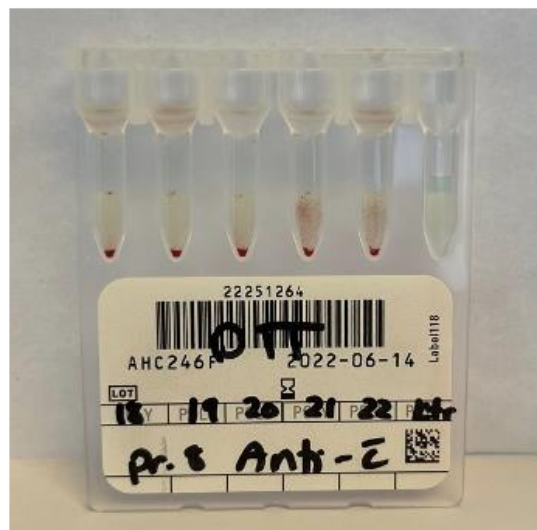
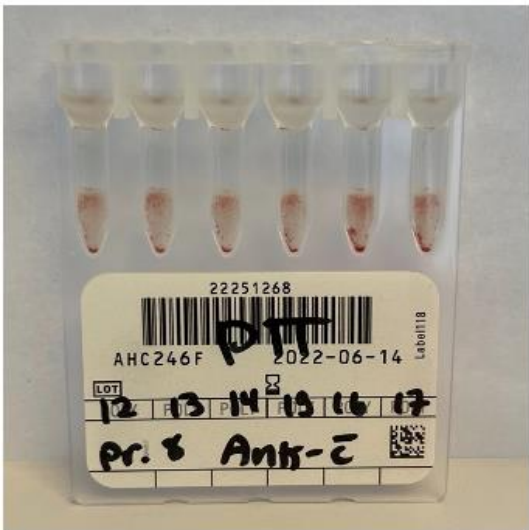
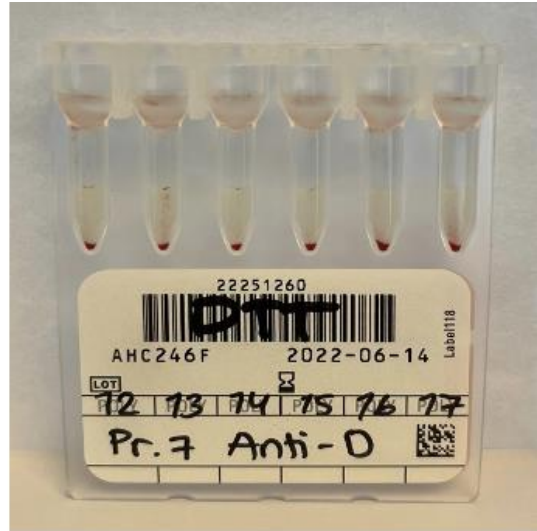
Prøvene ble feilmarkert med nummer 1 – 8 istedenfor I – VIII.



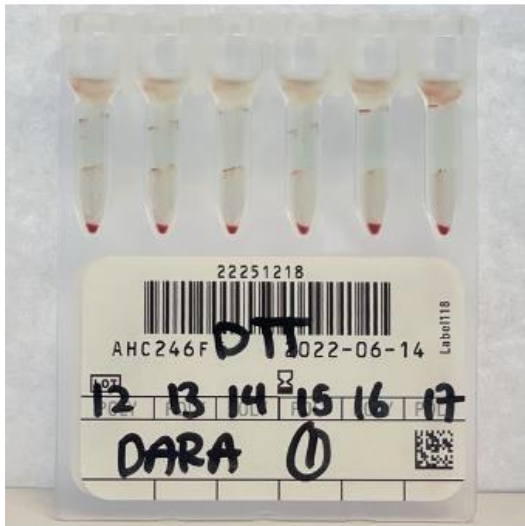
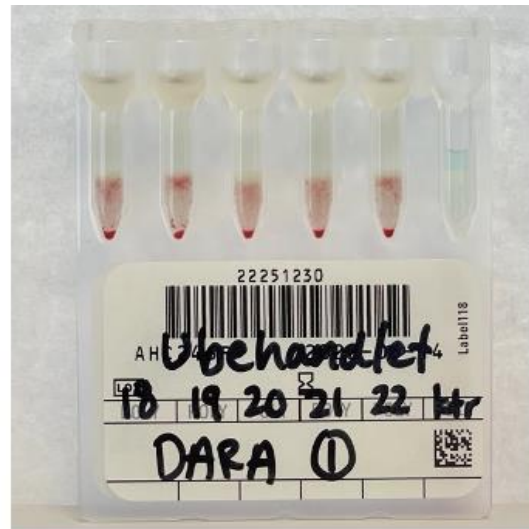
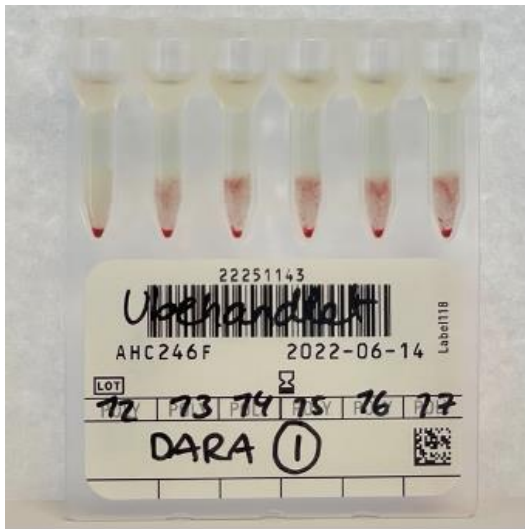


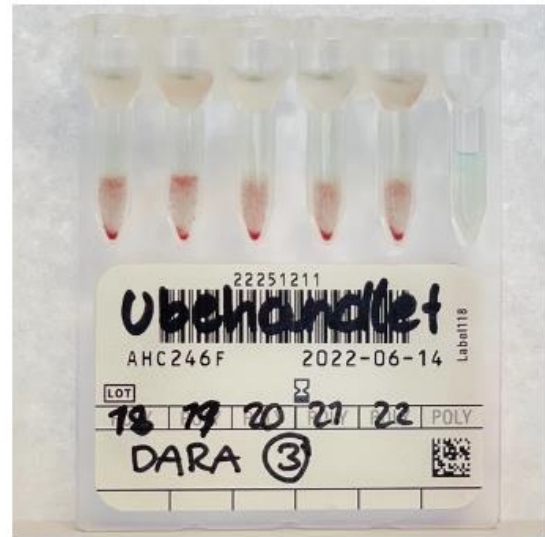
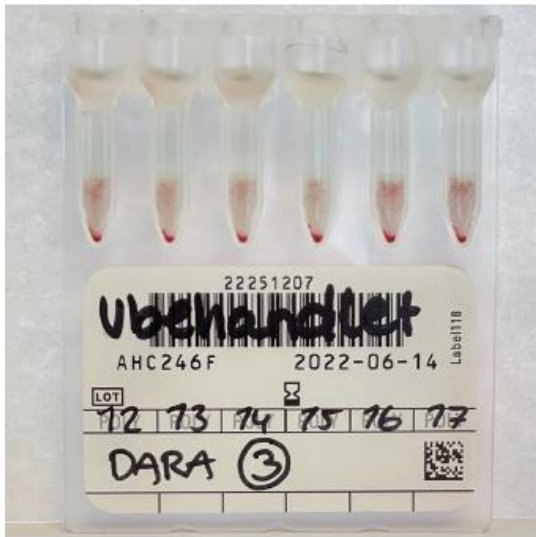
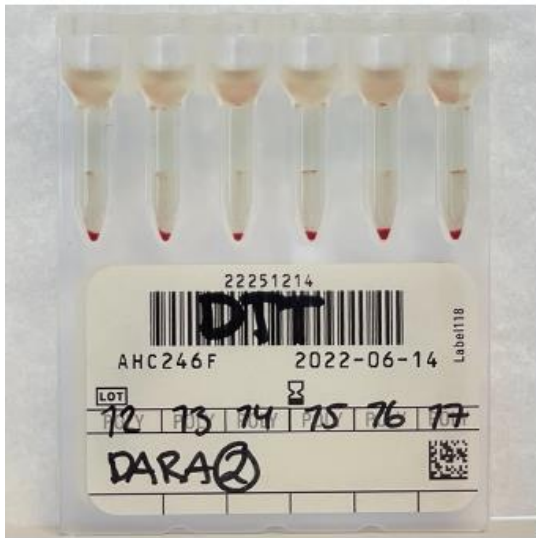


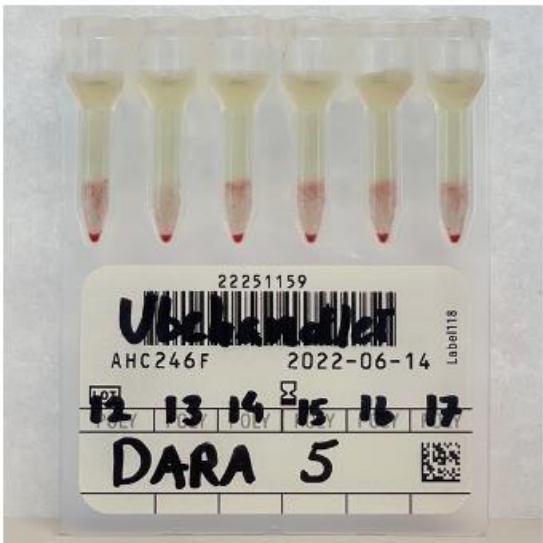
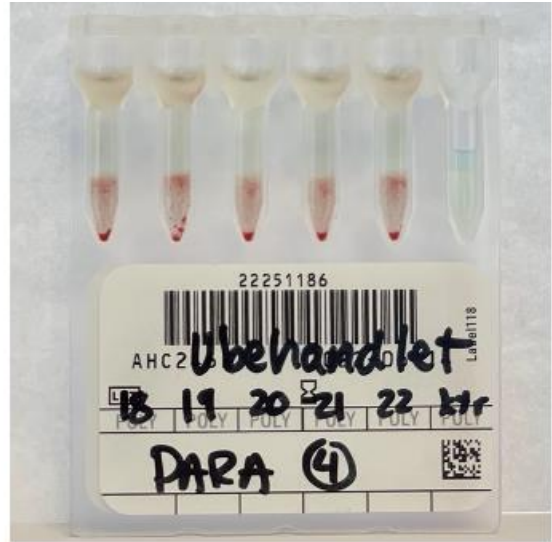


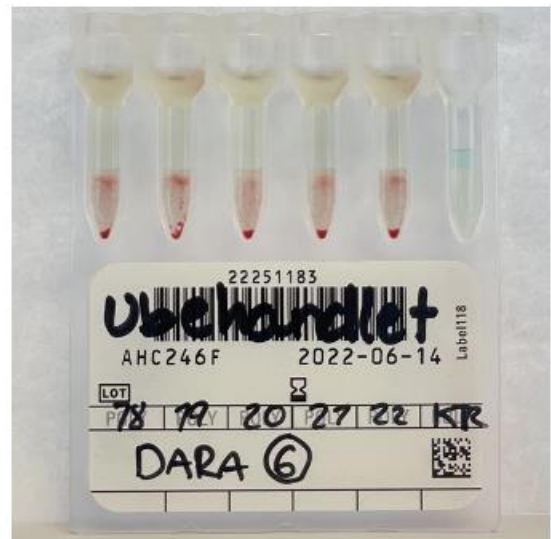
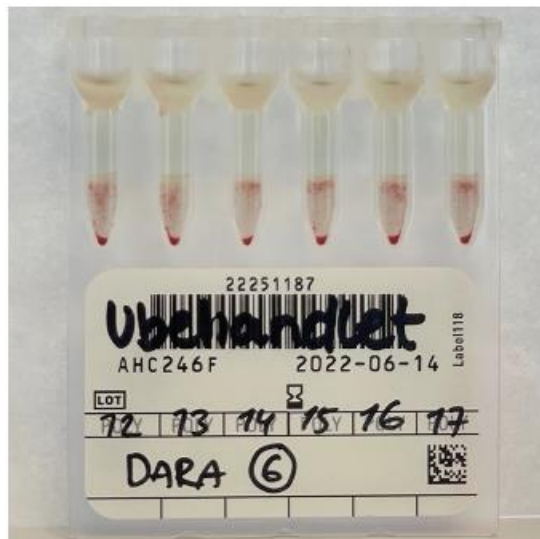


Vedlegg 10: Identifisering 1 - DARA-prøve 1 til 6



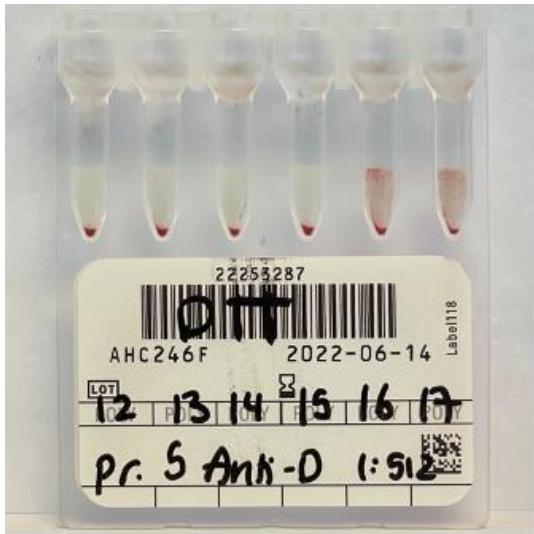






# Vedlegg 11: Identifisering 2 - prøve V og VI med kjente antistoffer

Prøvene ble feilmarkert med 5 og 6 istedenfor V og VI.





Vedlegg 12: Antigram for 0,8% Surgiscreencelle 1, 2 og 3

Cell#	Rh-ir	Donor Number	Rh-ir											KELL						DUFFY		KIDD		Lewis		MNS		P		Special Antigen typing	Test Results		
			D	C	E	c	e	f	Cw	V	K	Kp <sup>a</sup>	Kp <sup>b</sup>	Js <sup>a</sup>	Js <sup>b</sup>	Fy <sup>a</sup>	Fy <sup>b</sup>	Jk <sup>a</sup>	Jk <sup>b</sup>	Xg <sup>a</sup>	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	S	s	M	N	P <sub>1</sub>	Lu <sup>a</sup>	Lu <sup>b</sup>				
1	R1wR1	328485	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			1
2	R2R2	312419	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+	+	0	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			2
3	r	303595	0	0	0	+	+	+	+	0	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			3

Shaded columns indicate those antigens which are destroyed or depressed by enzyme treatment

\* represents "Not Tested" for new donors.

Ortho Clinical Diagnostics

Reagent Red Blood Cells  
0.8% Surgiscreen®  
©Ortho Clinical Diagnostics 2010

LOT NO  
8SS649  
EXP. DATE  
2022-04-12  
CCV-MM-DD

ANTIGRAM®  
Antigen Profile  
635201361

