



Prijetransfuzijsko ispitivanje i transfuzijsko liječenje pri primjeni monoklonskog protutijela anti-CD38

Compatibility testing and blood transfusion in the treatment with anti-CD38 monoclonal antibody

Mirela Raos^{1,2} , Ines Bojanić^{1,2,3}, Sandra Bašić Kinda⁴, Josip Batinić⁴, Branka Golubić Čepulić^{1,2,3,5}

¹ Klinički zavod za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju, Klinički bolnički centar Zagreb

² Zdravstveno veleučilište Zagreb

³ Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu

⁴ Zavod za hematologiju, Klinika za unutarnje bolesti, Medicinski fakultet, Klinički bolnički centar Zagreb

⁵ Medicinski fakultet Sveučilišta u Splitu

Deskriptori

MONOKLONSKA PROTUTIJELA – imunologija, terapijska uporaba; MULTIPLI MIJELOM – imunologija, farmakoterapija; ERITROCITI – djelovanje lijeka, imunologija; TRANSFUZIJA KRVI – metode; DITIOTREITOL-farmakologija; ALOPROTUTIJELA – u krvi; ANTIGLOBULINSKI TEST; ODREĐIVANJE KRVNE GRUPE; SEROLOŠKI TESTOVI – metode; TRANSFUZIJSKA MEDICINA – metode

Descriptors

ANTIBODIES, MONOCLONAL – immunology, therapeutic use; MULTIPLE MYELOMA – drug therapy, immunology; ADP-RIBOSYL CYCLASE 1 – immunology; ERYTHROCYTES – drug effects, immunology; BLOOD TRANSFUSION – methods; DITHIOTHREITOL – pharmacology; ISOANTIBODIES – blood; COOMBS TEST; BLOOD GROUPING AND CROSSMATCHING; SEROLOGIC TESTS – methods; TRANSFUSION MEDICINE – methods

Adresa za dopisivanje:

Dr. sc. Mirela Raos, dr. med.,
<https://orcid.org/0000-0001-6588-7886>
Klinički zavod za transfuzijsku medicinu
i transplantacijsku biologiju,
KBC Zagreb, Kišpatičeva 12, 10000 Zagreb;
e-pošta: mraos@kbc-zagreb.hr

Primljeno 17. veljače 2020.,
prihvaćeno 15. svibnja 2020.

SAŽETAK. Daratumumab je prvo monoklonsko protutijelo anti-CD38 koje se primjenjuje u liječenju multiplog mijeloma. Njegova primjena uzrokuje panreaktivnost u testovima prijetransfuzijskog ispitivanja. Panreaktivnost je posljedica vezanja monoklonskog protutijela anti-CD38 na protein CD38 na površini eritrocita, što u standardnom testiranju onemogućuje otkrivanje antieritrocitnih aloprotutijela i osiguranje podudarne krvi za transfuzijsko liječenje. Cilj rada bila je retrospektivna analiza vlastitih iskustava u rješavanju smetnja prijetransfuzijskog ispitivanja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38 i u transfuzijskom liječenju tih bolesnika. Prikazani su postupci za prijetransfuzijsko ispitivanje i transfuzijsko liječenje bolesnika liječenih monoklonskim protutijelom anti-CD38 koji su provedeni u Kliničkome bolničkom centru Zagreb. U istraživanju je analizirano 10-ero bolesnika liječenih daratumumabom. Prije i poslije primjene daratumumaba pretražena su antieritrocitna protutijela i određen je direktan antiglobulinski test. Pri transfuzijskom liječenju napravljeni su test pretraživanja antieritrocitnih protutijela i križne reakcije standardnim testiranjem i specifičnim postupcima imunohematoloških ispitivanja za uklanjanje smetnja monoklonskog protutijela anti-CD38. Postupci su uključivali obradu eritrocita ditiotreitolum koncentracije 0,2 M i neutralizacijski test uz primjenu reagensa DaraEx. Kod svih bolesnika testovi pretraživanja antieritrocitnih protutijela i križne reakcije bili su nakon primjene daratumumaba pozitivni, dok je direktan antiglobulinski test zbog primjene daratumumaba bio pozitivan u gotovo polovine bolesnika. Nakon obrade eritrocita ditiotreitolum 0,2 M učestalost lažno pozitivnih rezultata testova pretraživanja antieritrocitnih protutijela i križnih reakcija iznosila je oko 40%, a poslije primjene reagensa DaraEx oko 20%. Oba specifična postupka, obrada eritrocita ditiotreitolum 0,2 M i neutralizacijski test primjenom reagensa DaraEx, nisu se pokazala dovoljno pouzdanima u rješavanju smetnja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38. Zato je za transfuzijsko liječenje tih bolesnika nužno osigurati eritrocitne pripravke podudarne prema klinički najvažnijim antigenima u sustavima krvnih grupa Rh, Kell, Kidd, Duffy i MNS. Dobra suradnja između odjela i transfuzijske službe te postojanje protokola za prijetransfuzijsko ispitivanje i transfuzijsko liječenje ostaju preduvjet za pravodobno i sigurno transfuzijsko liječenje te skupine bolesnika.

SUMMARY. Daratumumab is the first anti-CD38 monoclonal antibody used for the treatment of multiple myeloma. Its application causes pan-reactivity in the pre-transfusion testing. The pan-reactivity is a result of anti-CD38 monoclonal antibody binding to CD38 protein on the red blood cell surface, which in standard testing makes it impossible to detect red blood cell alloantibodies and to provide compatible blood for transfusion. The aim of the study was to retrospectively analyze our experience in solving anti-CD38 monoclonal antibody interference with the pre-transfusion testing of these patients. The procedures for pre-transfusion testing and blood transfusion of patients treated with anti-CD38 monoclonal antibody carried out in the Clinical Hospital Center Zagreb are presented. The study analysed ten patients treated with daratumumab. Before and after daratumumab treatment, red blood cell antibody screening test and direct antiglobulin test were done. In the case of blood transfusion, red blood cell antibody screening test and cross-matches were performed by standard testing and specific immunohematological procedures to eliminate anti-CD38 monoclonal antibody interference. Procedures included red blood cell treatment with 0.2 M dithiothreitol and neutralization test using DaraEx reagent. In all patients red blood cell antibody screening tests and cross-matches were positive after daratumumab treatment, whereas a direct antiglobulin test, for daratumumab treatment, was positive in almost half of the patients. After treatment of red blood cells with 0.2 M dithiothreitol, the incidence of false positive results in the antibody screening test and the cross-matches was approximately 40%, and after DaraEx reagent approximately 20%. Both specific procedures, red blood cell treatment with 0.2 M dithiothreitol and neutralization test using DaraEx reagent have not been shown to be sufficiently reliable in addressing the interference caused by the anti-CD38 monoclo-

nal antibody. Therefore, for blood transfusion of these patients it is necessary to provide red blood cell units matched with the most significant Rh, Kell, Kidd, Duff and MNS blood group systems. Good collaboration between the ward and the transfusion service, with protocols in place for pre-transfusion testing and blood transfusion, remains a precondition for timely and safe blood transfusion for this group of patients.

Multipli mijelom (skr. MM) zloćudna je novotvorina koja nastaje klonskom proliferacijom plazmatskih stanica. Iako je to i dalje neizlječiva bolest, u posljednjih 10-ak godina bilježi se znatan napredak u liječenju. Liječenje se temelji na inhibitorima proteasoma (bortezomib) i/ili imunomodulatornim lijekovima (talidomid), a u bolesnika mlađih od 70 godina i na transplantaciji autolognih krvotvornih matičnih stanica. Kod relapsa ili refraktorne bolesti primjenjuju se monoklonska protutijela i/ili inhibitori proteasoma nove generacije (karfilzomib, iksazomib) i imunomodulatori nove generacije (lenalid, pomalidomid).¹ Monoklonska protutijela trenutačno su najispitivaniji oblik liječenja u onkologiji i prominentna su skupina novih agensa s jedinstvenim mehanizmom djelovanja. U liječenju MM-a monoklonsko protutijelo anti-CD38 usmjereno je na protein mijelomskih stanica CD38, s posljedičnom inhibicijom rasta i smrti stanice višestrukim mehanizmima djelovanja uključujući i Fc-efektorske mehanizme.²

Daratumumab (skr. DARA) prvo je monoklonsko protutijelo za liječenje MM-a koje je nakon višegodišnjih kliničkih istraživanja u studenom 2015. godine odobrila američka Agencija za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration* – FDA), a u svibnju 2016. godine i Europska agencija za lijekove (engl. *European Medicines Agency* – EMA).^{3–6} U Hrvatskoj se primjenjuje od lipnja 2019. godine, i to u kombinaciji s lenalidomidom i deksametazonom ili bortezomibom i deksametazonom, za liječenje odraslih bolesnika s MM-om koji su primili barem jednu prethodnu terapiju. Inicijalno se odobravaju 4 ciklusa liječenja, a nastavak liječenja moguć je samo kod pozitivnoga tumorskog odgovora na provedeno liječenje (potpuni odgovor, vrlo dobar djelomičan odgovor, djelomičan odgovor ili stabilna bolest). Daratumumab se najčešće primjenjuje jedanput na tjedan u prva dva mjeseca, a ako bolesnik dobro odgovara na terapiju, svaka dva tjedna iduća četiri mjeseca i zatim jedanput na mjesec do progresije bolesti.⁷

Budući da je anti-CD38 humano monoklonsko IgG1κ-protutijelo koje se specifično veže za protein CD38 izražen na eritrocitima, uzrokuje smetnje pri testovima prijetransfuzijskog ispitivanja koji se izvode u indirektnom antiglobulinskom testu (skr. IAT): pretraživanju, odnosno identifikaciji antieritrocitnih protutijela i križnoj reakciji. Vežanjem za protein CD38 monoklonsko protutijelo anti-CD38 uzrokuje panreaktivnost s testnim eritrocitima čime se teže otkriva prisutna antieritrocitna aloprotutijela. Katkad uzro-

kuje pozitivan direktni antiglobulinski test (skr. DAT), ali ne uzrokuje smetnje u određivanju krvne grupe (ABO/D).^{8,9}

Radi rješavanja smetnja prijetransfuzijskog ispitivanja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38 potrebno je primijeniti specifične postupke imunohematološkog ispitivanja kojima se često odgađa transfuzijsko liječenje. Specifični postupci primijenjeni samostalno ili u kombinaciji uključuju: obradu testnih eritrocita tiolima ili tripsinom, pretraživanje antieritrocitnih protutijela eritrocitima iz pupkovine, neutralizaciju anti-CD38 topljivim rekombinantnim CD38 (sCD38) ili primjenu antiidiotipskih protutijela anti-CD38 i transfuzijsko liječenje eritrocitnim pripravcima podudarnima u antigenu nakon određivanja fenotipa odnosno genotipa bolesnika odnosno darivatelja. S obzirom na ograničenja specifičnih postupaka imunohematološkog ispitivanja, potrebno je odabrati metodu koja najbolje odgovara mogućnostima i potrebama transfuzijskog laboratorija. Dodatna ograničenja primjene ovih metoda jesu vremenski zahtjevno i složeno testiranje te nedostupnost reagensa u mnogim laboratorijima. Odabir postupka ovisi o dostupnosti i cijeni reagensa te o znanju i iskustvu djelatnika u laboratoriju.^{10,11}

U ovom su radu prikazani postupci prijetransfuzijskog ispitivanja i transfuzijskog liječenja bolesnika liječenih DARA-om koji su uspostavljeni u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju KBC-a Zagreb. Retrospektivno su analizirana naša iskustva u rješavanju smetnja prijetransfuzijskog ispitivanja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38 i u transfuzijskom liječenju bolesnika liječenih DARA-om.

Ispitanici i metode

U istraživanju su analizirani bolesnici s MM-om koji su od lipnja do listopada 2019. godine liječeni DARA-om u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb. Prijetransfuzijsko ispitivanje prije primjene DARA-e i poslije nje provedeno je na Odjelu za transfuzijsku medicinu Kliničkog zavoda za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, KBC Zagreb.

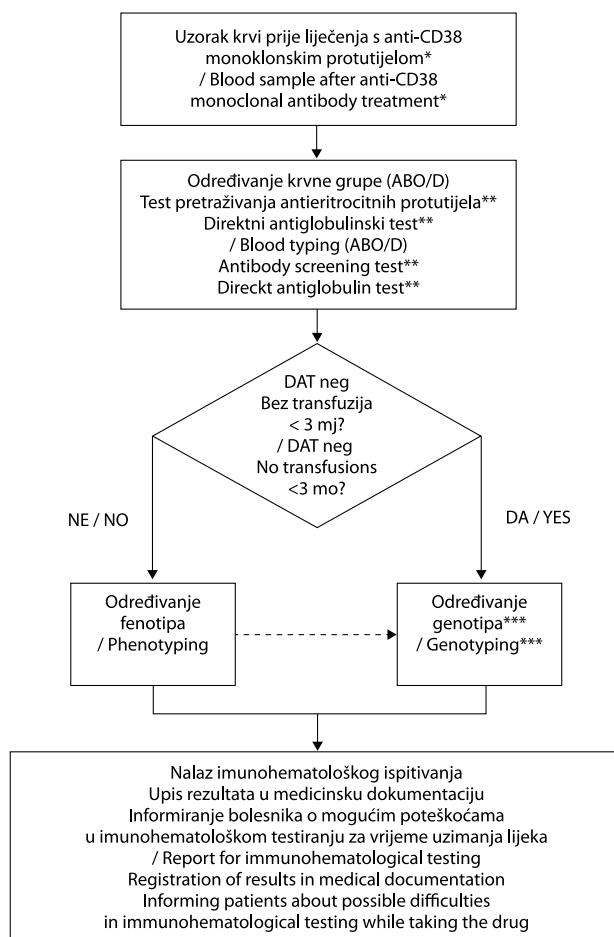
Pri planiranju liječenja DARA-om u transfuzijsku službu poslan je uzorak za prijetransfuzijsko ispitivanje uz najavu planiranog datuma početka primjene DARA-e. Iz uzorka krvi izvađenoga prije primjene

DARA-e određena je krvna grupa (ABO/D), pretražena su antieritrocitna protutijela, proveden je DAT, određeni su rezusni (Rh) fenotip i klinički najvažniji eritrocitni antigeni iz sustava krvnih grupa Kell, Kidd, Duffy i MNS. Za određivanje krvne grupe primijenjene su kartice Blood Grouping Reagents anti-A/anti-B/anti-D/Ctrl/A₁/B i 0,8%-tni testni eritrociti Affirmagen A₁/B, za DAT kartice Polyspecific, anti-IgG, -C3d, za pretraživanje antieritrocitnih protutijela kartice Polyspecific i 0,8%-tni dvostanični testni eritrociti Selectogen I i II, a eritrocitni antigeni određeni su primjenom seruma specifičnih za antigen (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ, SAD).

Za pouzdanost određivanja fenotipa morali su biti zadovoljeni ovi uvjeti: bolesnik posljednja 3 mjeseca nije transfundiran i DAT je negativan (zbog određivanja eritrocitnih antigena u IAT-u). Ako nisu bili zadovoljeni uvjeti za određivanje fenotipa, učinjena je genotipizacija. Određeni su geni iz sustava krvnih grupa Rh, Kell, Kidd, Duffy i MNS, ali i geni drugih sustava krvnih grupa kao što su Dombrock, Lutheran, Cartwright, Diego, Vel, Knops i Colton. Genotip je određen metodom PCR-a, u stvarnom vremenu, s pomoću kompleta RBC-Fluogene vERYfy eXtend (Inno-Train Diagnostik GmbH, Kronberg, Njemačka).

Nakon imunohematološke obrade u medicinsku dokumentaciju bolesnika upisana su upozorenja o planiranom liječenju DARA-om, rezultati prijetransfuzijskog ispitivanja i specifični zahtjevi za transfuzijsko liječenje eritrocitnim pripravcima podudarnima u antigenu.

Iz uzoraka krvi izvađenih nakon primjene DARA-e pretražena su antieritrocitna protutijela i određen je DAT. Pri potrebi za transfuzijskim liječenjem nakon primjene DARA-e u transfuzijsku službu poslan je uzorak za prijetransfuzijsko ispitivanje u kojem su standardnim testiranjem pretražena antieritrocitna protutijela i napravljene križne reakcije. Za transfuzijsko su liječenje, prema raspoloživosti, odabrani eritrocitni pripravci podudarni prema klinički najvažnijim antigenima iz sustava krvnih grupa Rh, Kell, Kidd, Duffy i MNS. Zatim su za test pretraživanja antieritrocitnih protutijela i za križnu reakciju primijenjeni specifični postupci imunohematološkog ispitivanja koji su uključivali: obradu eritrocita ditiotreitolom (skr. DTT) koncentracije 0,2 M, prema metodi koju su opisali Roback i suradnici,¹² i neutralizacijski test uz primjenu reagensa DaraEx u skladu s uputom proizvođača (Inno-Train Diagnostik GmbH, Kronberg, Njemačka), ako je reagens bio dostupan. Za pretraživanje antieritrocitnih protutijela obrađeni su testni eritrociti, a za križnu reakciju eritrociti doze. Predloženi postupci prijetransfuzijskog ispitivanja prije primjene monoklonskog protutijela anti-CD38 prikazani su na slici 1., a postupci tijekom njegove primjene i poslije



* Uputnica treba sadržavati podatke o prethodnom transfuzijskom liječenju bolesnika, trudnoćama i primjeni lijekova. / the referral should include information on prior transfusion treatment of patients, pregnancies and use of medication

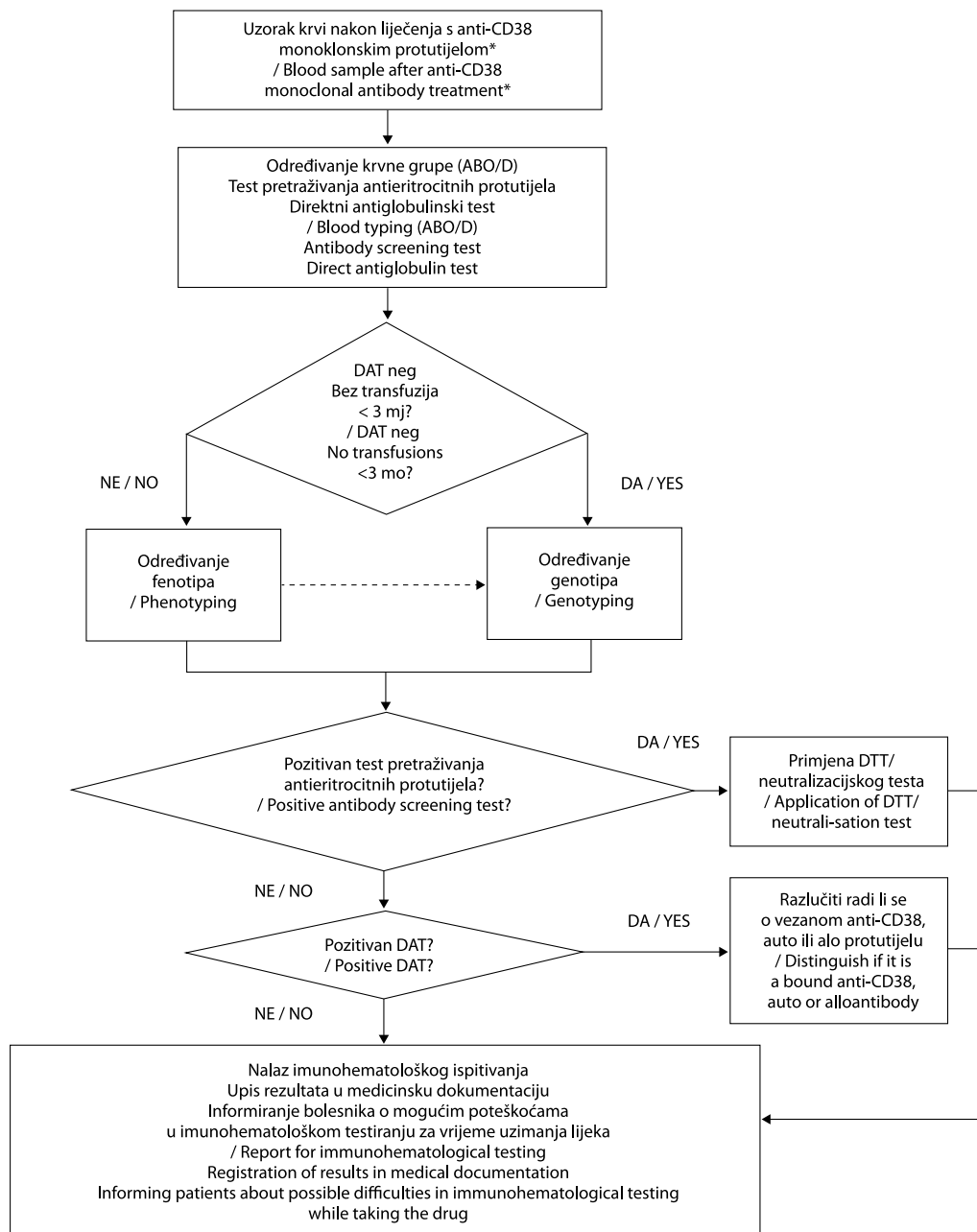
** Postupiti prema lokalnom protokolu za ispitivanje pozitivnih testova pretraživanja antieritrocitnih protutijela i/ili DAT-a. / proceed according to the local protocol for testing positive screening test and/or DAT

*** Preporučuje se učiniti genotip kad god je moguće, što može pomoći pri procjeni rizika od primjene DTT-a, bržem pronalaženju podudarne doze u budućem transfuzijskom liječenju i interpretaciji imunohematoloških rezultata u slučaju aloimunizacije. / it is recommended to genotype whenever possible which may help to assess the risk of using DTT, to find matched unit more quickly for the future blood transfusion and to help in interpretation of immunohematological results in case of alloimmunisation

SLIKA 1. POSTUPCI PRIJETRANSFUZIJSKOG ISPITIVANJA PRIJE PRIMJENE MONOKLONSKOG PROTUTIJELA ANTI-CD38
FIGURE 1. PROCEDURES OF PRE-TRANSFUSION TESTING BEFORE ANTI-CD38 MONOCLONAL ANTIBODY TREATMENT

nje na slici 2. Postupci pri transfuzijskom liječenju tijekom primjene monoklonskog protutijela anti-CD38 i 6 mjeseci poslije nje prikazani su na slici 3.

Za sva testiranja prije i poslije primjene DARA-e primijenjeni su svježi uzorci krvi izvađeni na antikoagulans etilendiamintetraoctenu kiselinu. Pretraživanje antieritrocitnih protutijela obavljeno je naknadno standardnim testiranjem i primjenom specifičnih postupaka imunohematoloških ispitivanja za uklanjanje



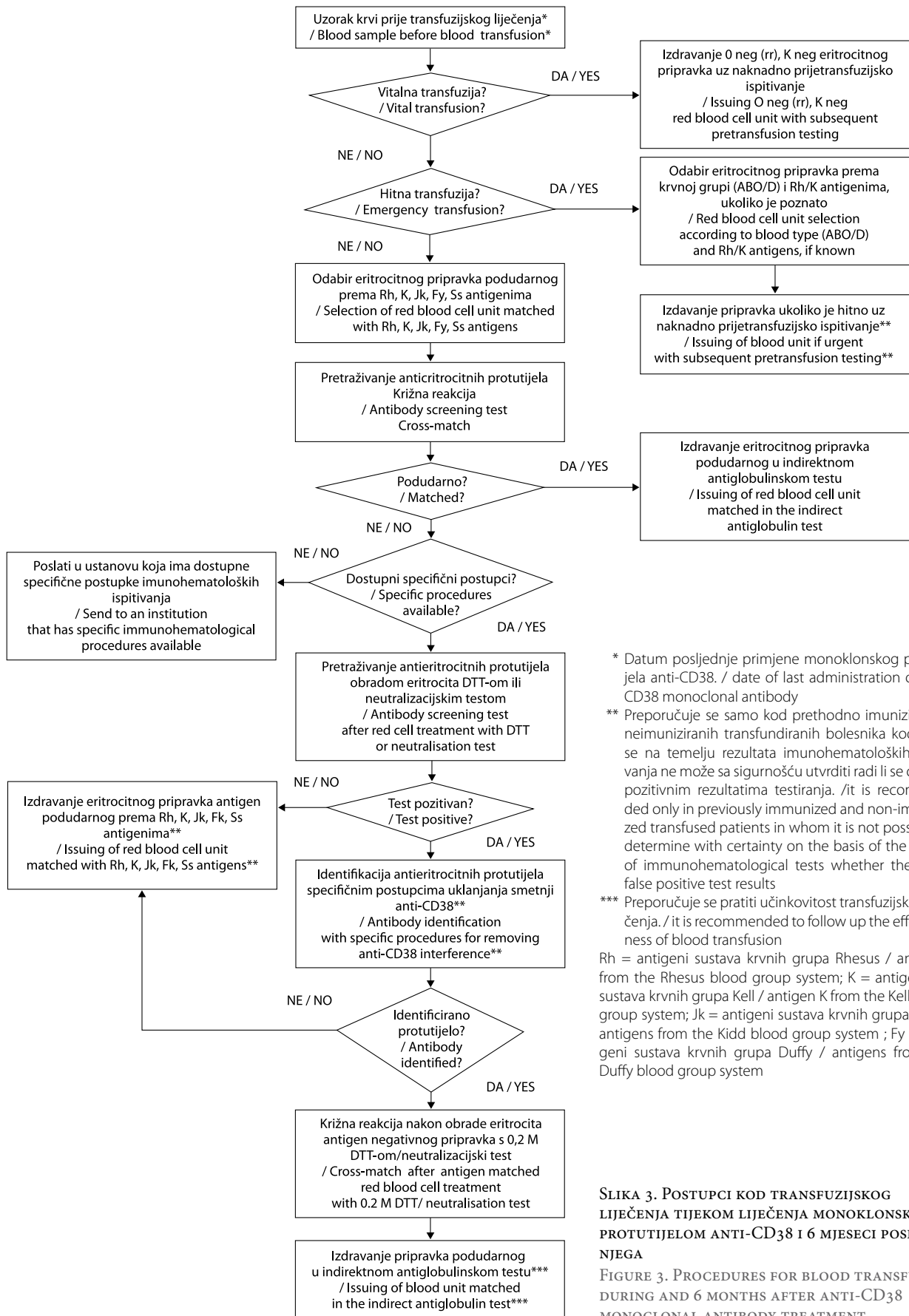
* Uputnica treba sadržavati podatke o datumu posljednje primjene monoklonskog protutijela anti-CD38, podatke o prethodnom transfuzijskom liječenju bolesnika, trudnoćama i primjeni lijekova. / the referral should include information on prior transfusion treatment of patients, pregnancies and use of medication

SLIKA 2. POSTUPCI PRIJETRANSFUZIJSKOG ISPITIVANJA TIJEKOM LIJEČENJA MONOKLONSKIM PROTUTIJELOM ANTI-CD38 I 6 MJESECI POSLIJE NJEGA

FIGURE 2. PROCEDURES OF PRE-TRANSFUSION TESTING DURING AND 6 MONTHS AFTER ANTI-CD38 MONOCLONAL ANTIBODY TREATMENT

smetnja monoklonskih protutijela anti-CD38: obradom eritrocita DTT-om 0,2 M i reagensom DaraEx. Da bi se usporedila učinkovitost specifičnih postupaka za uklanjanje smetnja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38, testiranja su naknadno provedena paralelno na 10 uzoraka plazme istih bolesnika, pohranjenih na -30 °C, koji su prethodno otopljeni i centrifugirani na 3000 okretaja/min.

Za statističku obradu podataka primijenjene su deskriptivne statističke metode. Podatci o transfuzijskom liječenju dobiveni su iz transfuzijskog informatičkog sustava. Vrijeme potrebno za transfuzijsko liječenje bolesnika liječenih DARA-om izračunano je razlikom vremena između primanja zahtjeva za transfuzijsko liječenje i izdavanja eritrocitnog pripravka. Transfuzijske reakcije bolesnika liječenih DARA-om provjerene



* Datum posljednje primjene monoklonskog protutijela anti-CD38. / date of last administration of anti-CD38 monoclonal antibody

** Preporučuje se samo kod prethodno imuniziranih i neimuniziranih transfundiranih bolesnika kod kojih se na temelju rezultata imunohematoloških ispitivanja ne može sa sigurnošću utvrditi radi li se o lažno pozitivnim rezultatima testiranja. / it is recommended only in previously immunized and non-immunized transfused patients in whom it is not possible to determine with certainty on the basis of the results of immunohematological tests whether these are false positive test results

*** Preporučuje se pratiti učinkovitost transfuzijskog liječenja. / it is recommended to follow up the effectiveness of blood transfusion

Rh = antigeni sustava krvnih grupa Rhesus / antigens from the Rhesus blood group system; K = antigen K iz sustava krvnih grupa Kell / antigen K from the Kell blood group system; Jk = antigeni sustava krvnih grupa Kidd / antigens from the Kidd blood group system; Fy = antigeni sustava krvnih grupa Duffy / antigens from the Duffy blood group system

SLIKA 3. POSTUPCI KOD TRANSFUZIJSKOG LIJEČENJA TIJEKOM LIJEČENJA MONOKLONSKIM PROTUTIJELOM ANTI-CD38 I 6 MJESECI POSLIJE NJEGA

FIGURE 3. PROCEDURES FOR BLOOD TRANSFUSION DURING AND 6 MONTHS AFTER ANTI-CD38 MONOCLONAL ANTIBODY TREATMENT

su pregledom prijave transfuzijskih reakcija u medicinskoj dokumentaciji.

Rezultati

U istraživanju je analizirano 10-ero bolesnika liječenih DARA-om, 6 muškaraca i 4 žene u dobi od 43 do 78 godina. Prosječna doza primljenog lijeka po bolesniku iznosila je 14,8 mg/kg. U jednog bolesnika liječenje je bilo prekinuto zbog neželjenih reakcija na DARA-u unatoč primljenoj premedikaciji.

U transfuzijsku službu upućeno je 5 od 10 (50%) uzoraka prije primjene DARA-e. DAT je bio negativan u 4 (80%) uzoraka, a testovi pretraživanja antieritrocitnih protutijela bili su negativni u svim uzorcima prije primjene DARA-e. Fenotip je bio određen u 7 (70%) bolesnika, a u 3 (30%) bolesnika bio je određen genotip jer nisu bili zadovoljeni uvjeti za određivanje fenotipa.

U svim uzorcima upućenima u transfuzijsku službu nakon primjene DARA-e testovi pretraživanja antieritrocitnih protutijela bili su pozitivni. DAT je bio pozitivan u petero (50%) bolesnika nakon primjene DARA-e, od kojih je u njih četvero prije primjene lijeka bio negativan, u jednog bolesnika pozitivan, a kod ostalih nije određen.

Transfuzijsko liječenje eritrocitnim pripravcima kod bolesnika liječenih DARA-om prikazano je na tablici 1. U transfuzijsku je službu za 9-ero bolesnika upućeno 30 zahtjeva za transfuzijsko liječenje eritrocitnim pripravcima nakon primjene DARA-e. Od ukupno traženih 58 doza koncentrata eritrocita transfundirane su 43 (74,1%) doze. Od toga je prema najvažnijim antigenima u sustavima krvnih grupa Rh, Kell, Kidd, Duffy i MNS podudarno bilo 38 (88,4%) doza, u sustavima krvnih grupa Rh, Kell i Kidd podudarale su se 3 (7,0%) doze, dok su dvije (4,7%) doze koncentrata eritrocita bile podudarne samo prema sustavima Rh i Kell. Medijan vremena od primanja zahtjeva do izdavanja krvi za transfuzijsko liječenje iznosio je 8 sati i 21 minutu (raspon 1 sat i 32 min do 171 sat i 15 min), a u 8 (26,6%) zahtjeva transfuzijsko liječenje bilo je odgođeno za više od 24 sata zbog traženja eritrocitnih pripravaka podudarnih u antigenu. Samo je jedan zahtjev bio hitan, ali je nakon razgovora s liječnikom zaduženim za bolesnika transfuzijsko liječenje bilo odgođeno i taj je bolesnik bio transfundiran za 10 sati i 45 minuta, dok su ostali zahtjevi bili upućeni redovitim postupkom. Nije zabilježena nijedna transfuzijska reakcija.

Ukupno je napravljeno 30 testova pretraživanja antieritrocitnih protutijela i 53 križne reakcije. Rezultati svih testova pretraživanja antieritrocitnih protutijela i križnih reakcija standardnim su testiranjem kod bolesnika liječenih DARA-om bili pozitivni. Jačina reakcija najčešće je bila 2+ (od 1+ do 2+). Testni eritrociti

TABLICA 1. TRANSFUZIJSKO LIJEČENJE ERITROCITNIM PRIPRAVCIMA BOLESNIKA LIJEČENIH DARATUMUMABOM
TABLE 1. BLOOD TRANSFUSION WITH RED BLOOD CELL UNITS IN PATIENTS TREATED WITH DARATUMUMAB

Transfuzijsko liječenje (N = 9) / Blood transfusion (N=9)	N	Medijan (raspon) / Median (raspon)
Broj zahtjeva za transfuzijsko liječenje / Number of requests for blood transfusion	30	3 (1 – 7)
Broj traženih doza koncentrata eritrocita / Number of requested red blood cell units	58	6 (2 – 14)
Broj transfundiranih doza / Number of transfused blood units	43	3 (1 – 12)
Broj transfundiranih doza podudarnih u sustavima krvnih grupa Rhesus, Kell, Kidd, Duffy, MNS / Number of transfused blood units matched in Rhesus, Kell, Kidd, Duffy, MNS blood group systems	38	3 (1 – 12)
Broj transfundiranih doza podudarnih u sustavima krvnih grupa Rhesus, Kell i Kidd / Number of transfused blood units matched in Rhesus, Kell and Kidd blood group systems	3	1 (1)
Broj transfundiranih doza podudarnih samo u sustavima krvnih grupa Rhesus i Kell / Number of transfused blood units matched only in Rhesus and Kell blood group systems	2	2 (2)
Vrijeme od primanja zahtjeva do izdavanja krvi za transfuzijsko liječenje (sati:min) / Time from receiving the request until issuing the blood for blood transfusion (hours:min)	30	8:21 (1:32 – 171:15)

obrađeni su DTT-om 0,2 M nakon čega je 12 (40,0%) testova pretraživanja bilo pozitivno. Od 13 testova pretraživanja antieritrocitnih protutijela u kojima su testni eritrociti obrađeni reagensom DaraEx, tri (23,1%) su bila pozitivna (tablica 2.). Eritrociti svih doza također su obrađeni DTT-om 0,2 M nakon čega je 21 (39,6%) križna reakcija bila pozitivna. Od 23 doze čiji su eritrociti obrađeni reagensom DaraEx, pet (21,7%) ih je bilo pozitivno (tablica 3.). Jačina reakcija kod pozitivnih testova pretraživanja antieritrocitnih protutijela i križnih reakcija poslije primjene specifičnih postupaka imunohematoloških ispitivanja bila je smanjena i najčešće je bila slabo pozitivna.

Bolesnicima koji su nakon primjene obaju postupaka ili, zbog nedostatka reagensa, samo jednoga specifičnog postupka imali pozitivne testove pretraživanja antieritrocitnih protutijela (0% poslije primjene obaju postupaka odnosno 26,7% nakon primjene samo postupka DTT-om) ili križnu reakciju (1,9% poslije primjene obaju postupaka odnosno 28,3% nakon primjene samo postupka DTT-om) nije obavljena identifikacija antieritrocitnih protutijela s obzirom na to da je, prema transfuzijskoj anamnezi (bolesnici nisu transfundirani), rezultatima prije primjene DARA-e (negativni testovi prijetransfuzijskog ispitivanja) i rezulta-

TABLICA 2. REZULTATI TESTOVA PRETRAŽIVANJA ANTIERITROCITNIH PROTUTIJELA BOLESNIKA LIJEČENIH DARATUMUMABOM PRIJE I POSLIJE PRIMJENE SPECIFIČNIH POSTUPAKA IMUNOHEMATOLOŠKOG ISPITIVANJA

TABLE 2. RESULTS OF RED BLOOD CELL SCREENING TESTS IN PATIENTS TREATED WITH DARATUMUMAB BEFORE AND AFTER APPLICATION OF SPECIFIC IMMUNOHEMATOLOGICAL PROCEDURES

Pretraživanje antieritrocitnih protutijela (N = 30) / Antibody screening test (N=30)			N (%)
Prije primjene specifičnih postupaka imunohepatološkog ispitivanja / Before application of specific immunohematological procedures	Poslije primjene specifičnih postupaka imunohepatološkog ispitivanja / After application of specific immunohematological procedures		
	Obrada eritrocita doze DTT-om 0,2 M / Red blood cell treatment with 0.2 M DTT (N = 30)	Obrada eritrocita doze reagensom DaraEx / Red blood cell treatment with DaraEx reagent (N = 13)	
POZ / POS	NEG	NEG	6 (20,0)
POZ / POS	POZ / POS	NEG	4 (13,3)
POZ / POS	NEG	POZ / POS	3 (10,0)
POZ / POS	POZ / POS	POZ / POS	0 (0,0)
POZ / POS	NEG	NT	9 (30,0)
POZ / POS	POZ / POS	NT	8 (26,7)

NT = nije testirano / not tested; POZ/POS = pozitivno / positive; NEG = negativno / negative, DTT = ditiotreitol / dithiothreitol

TABLICA 3. REZULTATI KRIŽNIH REAKCIJA ISPITIVANJA BOLESNIKA LIJEČENIH DARATUMUMABOM PRIJE I POSLIJE PRIMJENE SPECIFIČNIH POSTUPAKA IMUNOHEMATOLOŠKOG ISPITIVANJA

TABLE 3. RESULTS OF CROSS-MATCH TESTS IN PATIENTS TREATED WITH DARATUMUMAB BEFORE AND AFTER APPLICATION OF SPECIFIC IMMUNOHEMATOLOGICAL PROCEDURES

Križne reakcije (N = 53) / Cross-match test (N=53)			N (%)
Prije primjene specifičnih postupaka imunohepatološkog ispitivanja / Before application of specific immunohematological procedures	Poslije primjene specifičnih postupaka imunohepatološkog ispitivanja / After application of specific immunohematological procedures		
	Obrada eritrocita doze DTT-om 0,2 M / Red blood cell treatment with 0.2 M DTT (N = 53)	Obrada eritrocita doze reagensom DaraEx / Red blood cell treatment with DaraEx reagent (N = 33)	
POZ / POS	NEG	NEG	13 (24,5)
POZ / POS	POZ / POS	NEG	5 (9,4)
POZ / POS	NEG	POZ / POS	4 (7,6)
POZ / POS	POZ / POS	POZ / POS	1 (1,9)
POZ / POS	NEG	NT	15 (28,3)
POZ / POS	POZ / POS	NT	15 (28,3)

NT = nije testirano / not tested; POZ/POS = pozitivno / positive; NEG = negativno / negative, DTT = ditiotreitol / dithiothreitol

tima imunohepatološkog ispitivanja poslije primjene DARA-e (doza podudarna u svim važnim antigenima, nepodudarna križna reakcija, a negativni testovi pretraživanja antieritrocitnih protutijela i isključen pozitivan DAT doze), zaključeno da se radi o lažno pozitivnim rezultatima testiranja zbog primjene DARA-e u kojima su specifični postupci rješavanja smetnja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38 bili neučinkoviti. Testovi pretraživanja antieritrocitnih protutijela i križne reakcije nakon obrade eritrocita DTT-om i reagensom DaraEx nisu bili pozitivni kod tih bolesnika.

Naknadnim pretraživanjem antieritrocitnih protutijela iz pohranjenih plazmatskih uzoraka, svi su testovi standardnim testiranjem bili pozitivni. Nakon obrade testnih eritrocita DTT-om 0,2 M četiri su testa (40%)

bila pozitivna, a poslije obrade testnih eritrocita reagensom DaraEx dva su (20%) testa pretraživanja antieritrocitnih protutijela bila pozitivna (tablica 4.).

Rasprava

U ovom su istraživanju utvrđene smetnje prijetransfuzijskog ispitivanja u testovima pretraživanja antieritrocitnih protutijela i u križnim reakcijama na svim testiranim uzorcima bolesnika s MM-om nakon primjene DARA-e, što je u skladu s drugim istraživanjima o prijetransfuzijskom ispitivanju poslije primjene DARA-e.^{8,9} Zbog liječenja monoklonskim protutijelom anti-CD38 dolazi do vezanja tog protutijela za protein CD38 na površini eritrocita, što uzrokuje panreaktivnost u testovima prijetransfuzijskog ispitivanja u IAT-u: pretraživanju, odnosno identifikaciji antierit-

TABLICA 4. REZULTATI PRETRAŽIVANJA ANTIERITROCITNIH PROTUTIJELA IZ POHRANJENIH UZORAKA BOLESNIKA LIJEČENIH DARATUMUMABOM PRIJE I POSLIJE PRIMJENE SPECIFIČNIH POSTUPAKA IMUNOHEMATOLOŠKOG ISPITIVANJA
 TABLE 4. RESULTS OF RED BLOOD CELL ANTIBODY SCREENING FROM STORED SAMPLES IN PATIENTS TREATED WITH DARATUMUMAB BEFORE AND AFTER APPLICATION OF SPECIFIC IMMUNOHEMATOLOGICAL PROCEDURES

Pretraživanje antieritrocitnih protutijela (N = 10) / Antibody screening test (N=10)			N (%)
Prije primjene specifičnih postupaka imunohepatoloških ispitivanja / Before application of specific immunohematological procedures	Poslije primjene specifičnih postupaka imunohepatoloških ispitivanja / After application of specific immunohematological procedures		
	Obrada testnih eritrocita DTT-om 0,2 M / Red blood cell treatment with 0.2 M DTT	Obrada testnih eritrocita reagensom DaraEx / Red blood cell treatment with DaraEx reagent	
POZ / POS	NEG	NEG	5 (50,0)
POZ / POS	POZ / POS	NEG	3 (30,0)
POZ / POS	NEG	POZ / POS	1 (10,0)
POZ / POS	POZ / POS	POZ / POS	1 (10,0)

POZ/POS = pozitivno / positive; NEG = negativno / negative, DTT = ditiotreitol / dithiothreitol

trocitnih protutijela i križnoj reakciji. Osim na eritrocitima, protein CD38 izražen je i na drugim limfoidnim i mijeloidnim stanicama, kao i na nekim nehematopoetskim stanicama. Rezultati analize proteina CD38 metodom *Western blot* pokazuju povećan izražaj CD38 na membrani eritrocita bolesnika s tumorom, a slabiji izražaj na eritrocitima zdravih osoba.¹³ Iako su reakcije s monoklonskim protutijelom anti-CD38 slične onima koje uzrokuju autoprotutijela, ostali testovi kao što su autokontrola, DAT i eluat često su negativni, što može dovesti do pogrešnog zaključka da se radi o aloprotutijelu na antigen velike učestalosti.

Monoklonsko protutijelo anti-CD38 uzrokuje panreaktivnost s testnim eritrocitima jačine od 1+ do 3+ u svim metodama koje se izvode u IAT-u (s fiziološkom otopinom, otopinom slabe ionske jakosti i polietilen glikolom), kao i u svim tehnikama (u epruveti, mikrostupcu ili čvrstoj fazi). Jačina reakcije ovisi o tome koliko je vremena prošlo od datuma primjene posljednje doze DARA-e, a smetnje u testiranju mogu trajati do 6 mjeseci nakon posljednje primjene lijeka.¹⁴ U ovom su istraživanju smetnje prijetransfuzijskog ispitivanja u mikrostupcu, uz primjenu otopine slabe ionske jakosti u IAT-u, najčešće iznosile 2+ (od 1+ do 2+), a prijetransfuzijsko ispitivanje provedeno je u 6 mjeseci nakon primjene lijeka.

Zbog lažno pozitivnih rezultata pretraživanja antieritrocitnih protutijela teže se otkrivaju antieritrocitna aloprotutijela, a ako se ona prevede, ugrožena je sigurnost transfuzijskog liječenja bolesnika. Iako je rizik od imunizacije u općoj populaciji svega 2 do 3%,¹⁵ u hematološko-onkoloških bolesnika on iznosi oko 9% unatoč imunosupresivnim učincima kemoterapije koju primaju.¹⁶ Jednom kada dođe do aloimunizacije, vjerojatnost stvaranja dodatnih aloprotutijela velika je. U dvadesetčetverogodišnjem retrospektivnom istraživanju koje je provedeno u Nizozemskoj 25 (21,7%) od 115 imuniziranih bolesnika stvorilo je dodatna alo-

protutijela nakon transfuzije eritrocitnih pripravaka. Medijan intervala između otkrivanja prvog i dodatno stvorenog protutijela iznosio je 4 mjeseca. Dijagnoza i intenzitet liječenja nisu znatno utjecali na stvaranje dodatnih antieritrocitnih aloprotutijela.¹⁷

Nadalje, ovim je ispitivanjem utvrđen pozitivan DAT u gotovo polovine testiranih uzoraka nakon primjene DARA-e (u jednog bolesnika DAT je bio pozitivan prije primjene DARA-e). DAT može u početku primjene DARA-e biti pozitivan budući da u bolesnika s velikim izražajem CD38 dolazi do vezanja monoklonskog protutijela anti-CD38 na vlastite eritrocite. Njegovo uklanjanje djelovanjem makrofaga u slezeni praćeno je vrlo blagim padom hemoglobina (otprilike za 1,6 g/dL) i porastom broja retikulocita.⁹ Osim što nakon primjene DARA-e dolazi do uklanjanja eritrocita s velikim izražajem CD38, smanjeni izražaj proteina CD38 kod bolesnika može se tumačiti supresijom koju uzrokuje monoklonsko protutijelo anti-CD38 usmjereno na antigen.¹⁸ Smetnje u prijetransfuzijskom ispitivanju nisu specifične za DARA-u, nego su opažene i kod novih monoklonskih protutijela anti-CD38 koja su još u fazi istraživanja kao što su izatuk-simab i MOR202.^{19,20} S obzirom na to da se monoklonska protutijela anti-CD38 primjenjuju i za liječenje solidnih tumora i autoimunskih bolesti, smetnje prijetransfuzijskog ispitivanja mogu se očekivati i kod te skupine bolesnika, a ne samo u bolesnika koji se liječe zbog MM-a.²¹

Obrada eritrocita ditiotreitolom pokazala se najprihvaćenijom metodom za rješavanje smetnja prijetransfuzijskog ispitivanja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38, a budući da je DTT 0,2 M lako dostupan i primjenjuje se u mnogim laboratorijima.²² Njegovim djelovanjem cijepa se protein CD38 na membrani testnih eritrocita pa se monoklonsko protutijelo anti-CD38 ne može vezati za eritrocite i uzrokovati smetnje testiranja. Može se također primijeniti

6%-tni 2-aminoetilzotiuoronij bromid (AET).²³ Neželjeni učinci primjene tih reagensa jesu uništavanje eritrocitnih antigena pojedinih sustava krvnih grupa (Kell, Dombrock, Indian, John Milton Hagen, Knops, Landsteiner-Wiener) i različito djelovanje na antigene iz sustava krvnih grupa Yt, Lutheran, Raph i Cromer.²⁴ Stoga postoji rizik da će primjenom tako obrađenih eritrocita biti propušteno otkrivanje protutijela iz navedenih sustava krvnih grupa. Budući da je u praksi od navedenih antigena najčešća aloimunizacija na K-antigen, transfuzijska reakcija zbog propuštenog protutijela anti-K može se spriječiti tako da se u transfuzijskom liječenju svih bolesnika negativnih na K-antigen, kao i onih nepoznatog antigenskog statusa, primijene K-negativni eritrocitni pripravci. Primjenom DTT-a 0,01 M, prema metodi iz Osake, uspješno se uklanjaju smetnje uzrokovane monoklonskim protutijelom anti-CD38 uz očuvanje K-antigena.²⁵ Višestrukim postupcima adsorpcije s neobrađenim eritrocitima, ali i s eritrocitima obrađenima reagensom ZZAP u čijem je sastavu DTT (DTT 0,2 M i 0,1%-tni papain), nisu se uspjele ukloniti smetnje testiranja uzrokovane monoklonskim protutijelom anti-CD38, najvjerojatnije zbog premalog izražaja antigena CD38 na eritrocitima za adsorpciju.⁸ Tripsin nije u rutinskoj primjeni u laboratorijima, a i manje je učinkovit od DTT-a pri cijepanju proteina CD38 pa se vrlo rijetko primjenjuje za rješavanje smetnja prijetransfuzijskog ispitivanja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38. Tripsin također uništava ili oslabljuje reaktivnost s antigenima nekih sustava krvnih grupa (npr., MN, Lutheran, Chido/Rogers, Dombrock, Indian, JMh, Knops, Raph, Gerbich), ali ne djeluje na antigene sustava krvnih grupa Kell. Ostali proteolitički enzimi (npr., papain, bromelin ili ficin) u imunohematološkom su testiranju za primjenu kao dio postupka identifikacije antieritrocitnih protutijela.

Iako je obrada eritrocita DTT-om općeprihvaćena kao robustna i reproducibilna validirana metoda za uklanjanje smetnja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38,²² u ovom je istraživanju obradom testnih eritrocita i eritrocita doze DTT-om 0,2 M lažno pozitivno bilo oko 40% križnih reakcija i testova pretraživanja antieritrocitnih protutijela. Tijekom međunarodnog foruma Međunarodnog društva za transfuziju krvi (engl. *International Society of Blood Transfusion* – ISBT) o strategijama testiranja kod bolesnika liječenih monoklonskim protutijelom anti-CD38 prijavljena je 25 – 40%-tna neuspješnost ove metode s preostalim nespecifičnim reakcijama nakon obrade eritrocita DTT-om, uključujući i nesukladne rezultate kontrolnih testiranja,²⁶ što odgovara rezultatima našeg istraživanja.

Ako je pretraživanje antieritrocitnih protutijela DTT-om pozitivno, valja provesti identifikaciju protutijela panel-testom eritrocita obrađenih DTT-om, a pri transfuzijskom liječenju izdati specifične eritrocitne pripravke negativne na antigen, obrađene DTT-om

i podudarne u IAT-u. Do danas nisu dostupni komercijalni testni eritrociti obrađeni DTT-om, a laboratoriji nemaju dostupne dovoljne količine eritrocita za pretraživanje ili identifikaciju specifičnosti antieritrocitnih aloprotutijela koje bi obradili DTT-om. Za tu se primjenu mogu skupljati i zamrzavati eritrociti darivatelja iz kojih se priprema jedanaestostanični panel-test eritrocita za određivanje specifičnosti antieritrocitnih protutijela, a eritrociti se mogu obraditi DTT-om ili AET-om, što je vrlo zahtjevno. U našem istraživanju, imunohematološkim ispitivanjem nakon primjene DARA-e, ni u jednog bolesnika nisu otkrivena antieritrocitna aloprotutijela u plazmi. U bolesnika kojima su poslije primjene specifičnih postupaka imunohematoloških ispitivanja testovi pretraživanja antieritrocitnih protutijela i križne reakcije bili pozitivni, a na temelju negativne transfuzijske anamneze, negativnih testova pretraživanja antieritrocitnih protutijela prije primjene DARA-e i rezultata nakon primjene tog lijeka u sklopu križne reakcije (doza podudarna u svim važnim antigenima, nepodudarna križna reakcija, a negativni testovi pretraživanja antieritrocitnih protutijela i isključen pozitivan DAT doze), zaključeno je da se radi o lažno pozitivnim rezultatima testiranja zbog neučinkovitosti specifičnih postupaka pa identifikacija protutijela nije provedena.

Neutralizacija monoklonskog protutijela anti-CD38 drugi je pristup blokiranju vezanja tog protutijela u plazmi bolesnika s pomoću testnih eritrocita, dodatka rekombinantnoga topljivog CD38 (sCD38) i protutijela anti-CD38. Iako su obje neutralizacijske metode vrlo učinkovite u sprječavanju vezanja monoklonskog protutijela anti-CD38, njihovi su nedostaci visoka cijena i nedostupnost. Primjenom rekombinantnog sCD38 neutralizira se monoklonsko protutijelo anti-CD38 u plazmi bolesnika. sCD38 komercijalno je dostupan, jednostavan, brz i učinkovit, ali njegov je nedostatak visoka cijena. Za blokiranje monoklonskog protutijela anti-CD38 mogu se primijeniti antiidiotipska protutijela koja se vežu specifično za anti-CD38, čime je blokirana reaktivnost tog protutijela s testnim eritrocitima. Antiidiotipska protutijela dostupna su samo za potrebe istraživanja. U ovom istraživanju za neutralizaciju monoklonskog protutijela anti-CD38 primijenjen je reagens DaraEx koji sadržava protutijelo anti-CD38 bez humane Fc-regije. Kad su eritrociti obrađeni reagensom DaraEx, protutijelo se veže na CD38 i blokira epitope na koje bi se vezao lijek DARA. Učestalost lažno pozitivnih rezultata ispitivanja iznosila je oko 20% za testove pretraživanja antieritrocitnih protutijela i križne reakcije. Druga iskustva s primjenom reagensa DaraEx nisu dostupna u literaturi.

Primjenom eritrocita krvi iz pupkovine i eritrocita DARA-e koji su negativni na DAT i krvne grupe O omogućeno je prijetransfuzijsko ispitivanje bez smetnja testiranja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38, a izbjegnute su potreba obrade eritro-

cita tiolima ili primjena neutralizacijskih protutijela. Eritrociti iz pupkovine slabo izražavaju CD38, stoga se anti-CD38 neće vezati na njih, što se može iskoristiti za pretraživanje antieritrocitnih protutijela. Međutim, eritrociti krvi iz pupkovine nisu lako dostupni. Njihova je primjena praktički nemoguća u identifikaciji antieritrocitnih protutijela jer se komercijalni identifikacijski paneli teško mogu kontinuirano proizvoditi. Uz navedeno, ne izražavaju ili slabo izražavaju eritrocitne antigene P₁ te one sustava krvnih grupa Lewis i Lutheran, čime ograničavaju njihovu učinkovitost pri isključivanju aloprotutijela.¹⁰ Eritrociti bolesnika liječenih DARA-om, odnosno eritrociti DARA-e mogu se rabiti za prijetransfuzijsko ispitivanje jer su negativni na CD38- i DAT, a s obzirom na to da nakon primjene monoklonskog protutijela anti-CD38 može doći do vezanja na eritrocite s većim sadržajem proteina CD38 i hemolize.

Transfuzijsko liječenje bolesnika monoklonskim protutijelom anti-CD38 i prijetransfuzijsko ispitivanje

Potrebe za transfuzijom eritrocitnih pripravaka bolesnika liječenih monoklonskim protutijelom anti-CD38 kreću se u rasponu od 30 do 80%.²⁷ Pri transfuzijskom liječenju potrebno je odabrati eritrocitne pripravke podudarne u antigenu da bi se spriječila aloimunizacija i snizio rizik od budućih transfuzijskih reakcija. Iako je ovim pristupom spriječena imunizacija na klinički najvažnije eritrocitne antigene, postoji nekoliko nedostataka: 1. pripravci podudarni u antigenu nisu uvijek dostupni, 2. traženje eritrocitnih pripravaka podudarnih u antigenu može odgoditi transfuzijsko liječenje, 3. nije isključena mogućnost imunizacije na ostale antigene. U transfuzijskom liječenju preporučuje se primjena eritrocitnih pripravaka podudarnih prema klinički najvažnijim antigenima u sustavima krvnih grupa Rh, Kell, Kidd, Duffy i MNS, čime je rizik od hemolitičke transfuzijske reakcije snižen za otprilike 90%.¹⁷ Dostupnost eritrocitnih pripravaka podudarnih u antigenu ovisi o zahtjevu za antigenima negativnima na antigen za pojedinog bolesnika, a prema broju negativnih eritrocitnih antigena u bolesnika, kao i o udjelu darivatelja krvi kojima su određeni eritrocitni antigeni, uz opseg određivanja tih antigena. Genotipizacija osigurava veću točnost od fenotipizacije, a njezinom primjenom u automatiziranom testiranju darivatelja očekuje se kraće odgađanje transfuzijskog liječenja, kao i sniženje njegovih troškova. Za razliku od pretraživanja antieritrocitnih protutijela i križne reakcije koji imaju rok valjanosti, genotipizacijom će se omogućiti trajno izdavanje eritrocitnih pripravaka podudarnih u antigenu.²⁸ Međutim, određivanje genotipa eritrocitnih sustava krvnih grupa znatno je skuplja pretraga koja se izvodi samo u specijaliziranim laboratorijima, što ju čini nedostupnijom. Genotipizacijom moraju biti obu-

hvaćeni najmanje geni iz sustava krvnih grupa Rh, Kell, Kidd, Duffy i MNS, ali mogu se odrediti i geni drugih sustava krvnih grupa, što može pomoći u interpretaciji rezultata pri imunizaciji na druge eritrocitne antigene. Valja naglasiti da pri hitnom transfuzijskom liječenju koje je potrebno u roku od dva sata, redovito nema dovoljno vremena za specifične postupke prijetransfuzijskih ispitivanja. Podatci o prethodnim aloimunizacijama, rezultati fenotipiziranja ili genotipizacije u tim su slučajevima neprocjenjivo važni i tada treba primijeniti eritrocitne pripravke podudarne s prethodno određenim antigenima bolesnika. Naposljetku, klinička odluka o odabiru eritrocitnog pripravka podudarnog u antigenu ovisi o hitnosti zahtjeva za transfuzijsko liječenje i mogućnosti odabira takvog pripravka.²⁹ Pri hitnom transfuzijskom liječenju treba izdati eritrocitne pripravke podudarne s ABO/D, po mogućnosti prema najvažnijim eritrocitnim antigenima sustava krvnih grupa Rh i Kell.

Transfuzijsko liječenje bolesnika monoklonskim protutijelom anti-CD38 treba biti unaprijed najavljeno, a prije njegove primjene potrebno je poslati uzorke bolesnika u transfuzijsku službu na pretraživanje antieritrocitnih protutijela i određivanje eritrocitnih antigena. Liječnik koji skrbi za bolesnika treba biti upoznat s utjecajem monoklonskog protutijela anti-CD38 na prijetransfuzijsko ispitivanje. Pri transfuzijskom liječenju treba uzeti u obzir vrijeme potrebno za testiranje i osiguranje eritrocitnih pripravaka podudarnih u antigenu. Na zahtjevu za transfuzijsko liječenje potrebno je naznačiti datum posljednje primjene monoklonskog protutijela anti-CD38. Međutim, ako transfuzijsko liječenje nije unaprijed najavljeno, a uzorci bolesnika prije i poslije primjene monoklonskog protutijela anti-CD38 nisu poslani u transfuzijsku službu, produljuje se vrijeme od primanja zahtjeva do izdavanja podudarnog pripravka. Stoga pri panreaktivnom protutijelu treba uvijek posumnjati na primjenu monoklonskog protutijela anti-CD38. Da bi se skratilo odgađanje transfuzijskog liječenja, laboratoriji trebaju imati uspostavljene protokole prijetransfuzijskog ispitivanja i sustav upozorenja za bolesnike liječene monoklonskim protutijelom anti-CD38.

Testiranja koja obuhvaćaju primjenu specifičnih postupaka nisu automatizirana i pri rutinskom su radu zahtjevna zbog trajanja obrade i potrebnog iskustva djelatnika u laboratoriju pa se provode ponajprije u referentnim laboratorijima. Osim uspostavljenih protokola, a da bi komunikacija među zdravstvenim djelatnicima bila pravodobna, ISBT preporučuje automatizaciju u komunikaciji kod bolesnika liječenih monoklonskim protutijelom anti-CD38.²⁶ Američka udruga banaka krvi (engl. *American Association of Blood Banks* – AABB) preporučuje obavještanje transfuzijske službe o početku liječenja bolesnika DARA-om.³⁰ Proizvođač daratumumaba (Darzalex – Janssen Biotech Inc., Johnson & Johnson, Horsham, PA, SAD) također je svjestan

smetnja u prijetransfuzijskom ispitivanju uzrokovanih DARA-om, stoga je izdao upute za zdravstvene djelatnike.¹⁴ Iako monoklonsko protutijelo anti-CD38 otežava prijetransfuzijsko ispitivanje u transfundiranih bolesnika liječenih DARA-om, do danas nije prijavljen nijedan slučaj hemolitičke transfuzijske reakcije.³¹ U našem istraživanju također nije bilo prijavljenih transfuzijskih reakcija, a bolesnici su prije transfuzijskog liječenja primili premedikaciju.

Prema međunarodnom forumu ISBT-a o strategijama testiranja kod bolesnika liječenih monoklonskim protutijelom anti-CD38, većina laboratorija (osam od 14) prijavljuje primjenu DTT-metode uz primjenu eritrocitnih pripravaka podudarnih u antigenu, što je omogućeno fenotipiziranjem odnosno genotipiziranjem bolesnika (šest od osam). Pri negativnim testovima pretraživanja antieritrocitnih protutijela eritrocitni se preparaci izdaju prema protokolu T&S (engl. *Type and Screen*) bez križne reakcije. Neki se laboratoriji (tri od 14) oslanjaju samo na odabir eritrocitnih pripravaka podudarnih u antigenu.²⁶ U ovom istraživanju za prije-transfuzijsko ispitivanje prvo su odabrani klinički najvažniji eritrocitni preparaci podudarni s antigenom u sustavima krvnih grupa Rh, Kell, Kidd, Duffy i MNS (88,4%), a u nedostatku tih antigena s onima u sustavima krvnih grupa Rh, Kell i Kidd ili samo u sustavima Rh i Kell (11,6%). Zatim su eritrociti obrađeni DTT-om i reagensom DaraEx. S obzirom na to da smo ovim ispitivanjem utvrdili znatan udio lažno pozitivnih rezultata ispitivanja nakon primjene obaju specifičnih postupaka (oko 40% nakon obrade eritrocita DTT-om 0,2 M i oko 20% nakon primjene reagensa DaraEx), preporučujemo da se identifikacija antieritrocitnih protutijela bolesnika nakon primjene DARA-e, zbog velike zahtjevnosti procesa, provodi samo u prethodno imuniziranih i neimuniziranih transfundiranih bolesnika, kod kojih se ne može sa sigurnošću utvrditi radi li se o lažno pozitivnim rezultatima testiranja (npr., pozitivni testovi pretraživanja antieritrocitnih protutijela uz nepodudarnu križnu reakciju, pri odabiru doze koja nije podudarna u svim važnim antigenima, ako nije isključen pozitivan DAT doze).

Medijan vremena od primanja eritrocitnih pripravaka do njihova izdavanja iznosio je oko 8 sati. Chapuy i suradnici prikazali su da uz primjenu DTT-a medijan odgode transfuzijskog liječenja neimuniziranih bolesnika iznosi 2 sata, a aloimuniziranih bolesnika iznosi 4 sata.²² Moguće je unaprijed obraditi eritrocite DTT-om, osobito u laboratoriju s više takvih zahtjeva, budući da se eritrociti mogu čuvati nekoliko dana nakon obrade, ovisno o primijenjenoj otopini za njihovu pohranu.³² Opažanje hemolize za vrijeme skladištenja eritrocita obrađenih DTT-om može biti ozbiljan problem. U ovom je istraživanju opažena hemoliza eritrocita obrađenih DTT-om 0,2 M u fiziološkoj otopini nakon 3 dana skladištenja, dok su obrađeni eri-

trociti pohranjeni u Alseverovoj otopini skladišteni bez hemolize dulje od tri tjedna. Modificiranom metodom obrade eritrocita s pomoću smanjivanja udjela DTT-a 0,2 M na omjer 30 : 25 (eritrociti : DTT) uklanjaju se smetnje uzrokovane monoklonskim protutijelom anti-CD38, a membrana obrađenih eritrocita nije oštećena obradom, što sprječava hemolizu tijekom njihova skladištenja. Time je omogućeno obrađivanje veće količine eritrocita i njihovo skladištenje do 33 dana, bez pojave hemolize.³³

Zaključak

Liječenje monoklonskim protutijelom anti-CD38 uzrokuje panreaktivnost u testovima prijetransfuzijskog ispitivanja koji se izvode u IAT-u: pretraživanju, odnosno identifikaciji antieritrocitnih protutijela i križnoj reakciji. Panreaktivnost je posljedica vezanja monoklonskog protutijela anti-CD38 na protein CD38 na površini eritrocita, što pri standardnom testiranju onemogućuje otkrivanje antieritrocitnih aloprotutijela i osiguranje podudarne krvi za transfuzijsko liječenje. Radi uklanjanja smetnja testiranja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38, potrebno je primijeniti specifične postupke imunohematoloških ispitivanja.

Uvođenjem monoklonskog protutijela anti-CD38 u široku kliničku primjenu postoji opasnost da se podcijeni njegov utjecaj na postupke u transfuzijskoj službi, čime je ugroženo pravodobno izdavanje krvi, a zbog mogućih transfuzijskih reakcija ugrožena je i sigurnost transfuzijskog liječenja bolesnika. U ovom se radu oba specifična postupka, obrada eritrocita DTT-om 0,2 M i neutralizacijski test primjenom reagensa DaraEx, nisu pokazala dovoljno pouzdanima u rješavanju smetnja uzrokovanih monoklonskim protutijelom anti-CD38. Stoga je za transfuzijsko liječenje tih bolesnika nužno osigurati eritrocitne pripravke podudarne u antigenu. Budući da odabir takvog pripravka može odgoditi transfuzijsko liječenje, ustanove u kojima se liječe ovi bolesnici trebaju imati dogovorene protokole transfuzijskog liječenja pri primjeni DARA-e, koji uključuju pravodobnu komunikaciju svih zdravstvenih djelatnika uključenih u liječenje bolesnika. Trebaju biti uspostavljeni protokoli za rješavanje smetnja prijetransfuzijskog ispitivanja i odabir eritrocitnih pripravaka, a bolesnicima se preporučuje izdavanje iskaznica o liječenju monoklonskim protutijelom anti-CD38. Preporučuje se primjena DTT-a, jer je vrlo jeftin i dostupan, iako je testiranje dugotrajno i iziskuje iskustvo djelatnika. Druga je mogućnost primjena neutralizacijskih testova koji su brzi i jednostavni, ali im je cijena visoka i često su nedostupni. Primjena eritrocita krvi iz pupkovine i eritrocita DARA-e nije praktična jer su rijetko dostupni, a njihovo je kombiniranje zahtjevno. Pretpostavlja se da bi niža cijena neutralizacijskih testova i genotipizacije u budućnosti omogućila njihovu standardnu primjenu i dostupnost većini transfuzijskih služba.

Rad je napravljen u Kliničkom zavodu za transfuzijsku medicinu i transplantacijsku biologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu KBC-a Zagreb i u Zavodu za hematologiju Klinike za unutarnje bolesti Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu KBC-a Zagreb.

LITERATURA

- Cornell RE, Kassim AA. Evolving paradigms in the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma: increased options and increased complexity. *Bone Marrow Transplant* 2016;51(4):479–91.
- Afifi S, Michael A, Lesokhin A. Immunotherapy: a new approach to treating multiple myeloma with Daratumumab and Elotuzumab. *Ann Pharmacother* 2016;50(7):555–68.
- Lokhorst HM, Plesner T, Laubach JP i sur. Targeting CD38 with Daratumumab Monotherapy in Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2015;373(13):1207–19.
- Lonial S, Weiss BM, Usmani SZ i sur. Daratumumab monotherapy in patients with treatment-refractory multiple myeloma (SIRIUS): an open-label, randomised, phase 2 trial. *Lancet* 2016;387(10027):1551–60.
- Palumbo A, Chanan-Khan A, Weisel K i sur.; CASTOR Investigators. Daratumumab, Bortezomib, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2016;375(8):754–66.
- Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H i sur.; POLLUX Investigators. Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med* 2016;375(14):1319–31.
- European Medicines Agency. Darzalex (daratumumab): An overview of Darzalex and why it is authorised in the EU. Dostupno na: http://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/darzalex-epar-medicine-overview_en.pdf. Pristupljeno: 28. 4. 2017.
- Chapuy CI, Nicholson RT, Aguad MD i sur. Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion* 2015;55:1545–54.
- Oostendorp M, Lammerts van Bueren JJ, Doshi P i sur. When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy. *Transfusion* 2015;55:1555–62.
- Anani WQ, Duffer K, Kaufman RM, Denomme GA. How do I work up pretransfusion samples containing anti-CD38? *Transfusion* 2017;57(6):1337–42.
- Anani WQ, Marchan MG, Bensing KM i sur. Practical approaches and costs for providing safe transfusions during anti-CD38 therapy. *Transfusion* 2017;57(6):1470–9.
- Roback JD, Combs MR, Grossman BJ, Hollyer CD. Technical manual. 17. izd. Bethesda Maryland: AABB; 2011, str. 912–13.
- Albeniz I, Demir-Coşkun O, Türker-Şener L, Baş A, Asoğlu O, Nurten R. CD38 expression as response of hematopoietic system to cancer. *Oncol Lett* 2011;2(4):659–64.
- Janssen. DARZALEX (daratumumab) injection. Dostupno na: <http://www.janssenlabels.com/package-insert/product-monograph/prescribing-information/Darzalex-pi.pdf>. Pristupljeno: rujan 2019.
- Heddle NM, Soutar RL, O'Hoski PL i sur. A prospective study to determine the frequency and clinical significance of alloimmunization post-transfusion. *Br J Haematol* 1995;91(4):1000–5.
- Schonewille H, Haak HL, van Zijl AM. Alloimmunization after blood transfusion in patients with hematologic and oncologic diseases. *Transfusion* 1999;39(7):763–71.
- Schonewille H, de Vries RR, Brand A. Alloimmune response after additional red blood cell antigen challenge in immunized hematocology patients. *Transfusion* 2009;49(3):453–7.
- Sullivan HC, Gerner-Smidt C, Nooka AK i sur. Daratumumab (anti-CD38) induces loss of CD38 on red blood cells. *Blood* 2017;129:3033–7.
- Martin T, Baz R, Benson DM i sur. A phase 1b study of isatuximab plus lenalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood* 2017;129(25):3294–303.
- Raab MS, Chatterjee M, Goldschmidt H i sur. MOR202 alone and in combination with pomalidomide or lenalidomide in relapsed or refractory multiple myeloma: Data from clinically relevant cohorts from a phase I/IIa study. *J Clin Oncol* 2016;34(15):8012.
- Van de Donk NW, Janmaat ML, Mutis T i sur. Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev* 2016;270(1):95–112.
- Chapuy CI, Aguad MD, Nicholson RT i sur.; DARA-DTT Study Group for the BEST Collaborative. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion* 2016;56(12):2964–72.
- Judd WJ, Johnson ST, Storry J. Judd's methods in immunohaematology. 3. izd. Bethesda: AABB Press; 2008, str. 271–3.
- Reid M, Lomas-Francis C, Ollson MI. The blood group anti-gen factsbook. 3. izd. Waltham: Academic Press; 2012, str. 297–346.
- Hosokawa M, Kashawagi H, Nakayama K i sur. Distinct effect 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* 2018;58(12):3003–13.
- De Vooght KMK, Lozano M, Bueno JL i sur. Vox Sanguinis International Forum on typing and matching strategies in patients on anti-CD38 monoclonal therapy: summary. *Vox Sang* 2018;113:492–8.
- Hannon JL, Clarke G. Transfusion management of patients receiving daratumumab therapy for advanced plasma cell myeloma. *Transfusion* 2015;55(11):2770.
- Wilkinson K, Harris S, Gaur P i sur. Molecular blood typing augments serologic testing and allows for enhanced matching of red blood cells for transfusion in patients with sickle cell disease. *Transfusion* 2002;52(2):381–8.
- Quach H, Benson S, Haysom H i sur. Considerations for pre-transfusion immunohaematology testing in patients receiving the anti-CD38 monoclonal antibody daratumumab for the treatment of multiple myeloma. *Intern Med J* 2018;38(2):210–20.
- Regan DM, Markowitz MA; AABB. Mitigating the anti-CD38 interference with serologic testing. Dostupno na: <http://www.aabb.org/programs/publications/bulletins/Documents/ab16-02.pdf>. Pristupljeno: 15. 8. 2016.
- Dimopoulos MA, Sonneveld P, Sun H. Daratumumab and blood-compatibility testing. *N Engl J Med* 2016;375(25):2497–8.
- Disbro WL. Stability guidelines for dithiothreitol-treated red blood cell reagents used for antibody detection methods in patients treated with daratumumab. *Immunohematology* 2017;33(3):105–9.
- Lorenzen H, Lone AN, Nielsen M, Svendsen L, Andersen P. Thirty-three-day storage of dithiothreitol-treated red blood cells used to eliminate daratumumab interference in serological testing. *Vox Sang* 2018;113(7):686–93.