



Raccomandazioni per la gestione trasfusionale dei pazienti in trattamento con Daratumumab

(a cura di A Matteocci, S Coluzzi, S Manfredi, componenti del Gruppo di Lavoro SIMTI sulla Immunoematologia avanzata")

Introduzione

Il farmaco Daratumumab (Darzalex™, Janssen) è un anticorpo monoclonale umano IgG1k impiegato nel trattamento del mieloma multiplo, in quanto è un potente inibitore della crescita *in vivo* delle cellule tumorali che esprimono l'antigene CD38. Il Daratumumab (DARA) si lega all'antigene CD38 che si trova in piccole quantità sui globuli rossi dei pannelli di screening o dei donatori (concentrati eritrocitari) causando una positività del test di Coombs indiretto con conseguenti difficoltà nella compatibilità trasfusionale.

Interferenza nei test immunoematologici (Tab.I)

La determinazione degli antigeni ABO/RhD non viene influenzata ed il test di Coombs diretto può risultare debolmente positivo soltanto in alcuni casi, ma non sono stati mai riportati quadri di emolisi.

Tuttavia, **tale farmaco legato ai globuli rossi che esprimono piccole quantità di CD38, può mascherare la determinazione di eventuali anticorpi irregolari e rendere pertanto difficoltoso il cross-match donatore-ricevente.** Infatti, il siero/plasma dei pazienti in trattamento con DARA può presentare reazioni positive nelle indagini diagnostiche che utilizzano il test all'antiglobulina indiretto: screening ed identificazione anticorpale, cross-match sierologico e tipizzazione eritrocitaria estesa (Duffy, Kidd, ecc.). L'interferenza da anti-CD38 è riscontrabile con differenti score di agglutinazione, in presenza di qualsiasi mezzo (salina, LISS, PEG) e con qualsiasi tecnologia (provetta, agglutinazione su colonna, fase solida). Inoltre, l'utilizzo di tecniche di assorbimento non risulta utile per eliminare la panreattività causata da DARA, mentre l'immediata spin (IS) non risente dell'interferenza da parte dell'anti-CD38, ma non è raccomandato l'impiego di questa modalità di assegnazione degli emocomponenti eritrocitari.

L'interferenza dovuta al DARA viene osservata per un periodo che va da 2 sino a 6 mesi successivi all'ultima dose di farmaco somministrato.

Tabella I

Indagine immunoematologica	Interferenza da DARA (anti-CD38)
Tipizzazione antigeni ABO/RhD	No
Tipizzazione altri antigeni eritrocitari	Si
Test di Coombs Diretto	No/Si
Screening anticorpale	Si
Identificazione anticorpale	Si
Immediata spin (ABO/RhD)	No
Cross-match sierologico	Si
Utilizzo tecniche di assorbimento	Si

Tra le strategie per mitigare l'interferenza sierologica da DARA, il trattamento dei globuli rossi con ditiotreitolo (DTT) risulta già utilizzato e validato a livello internazionale. Va però tenuto in considerazione che tale trattamento può distruggere alcuni antigeni appartenenti ai seguenti sistemi gruppo-ematici: Kell, Dombrock, Lutheran, ecc.



Indagini pre-trasfusionali nei pazienti trattati con DARA

E' auspicabile che l'ematologo contatti il medico della ST prima che il paziente inizi il trattamento con DARA per poter inquadrare in maniera corretta la condizione sierologica di base del paziente e condurre l'eventuale terapia trasfusionale in modo più appropriato.

1. Indagini da eseguire sul paziente PRIMA dell'inizio del trattamento con DARA

- Tipizzazione ABO/RhD/Fenotipo Rh completo, Fenotipo K/k, test di Coombs diretto (TCD) e ricerca/identificazione di anticorpi irregolari (di classe IgM e IgG)
- Tipizzazione eritrocitaria estesa, in base ai protocolli locali della ST

2. Indagini da eseguire sul paziente DOPO l'inizio del trattamento con DARA

- Tipizzazione ABO/RhD con metodi convenzionali
- Eventuale genotipizzazione eritrocitaria estesa Ricerca/identificazione di anticorpi irregolari con pre-trattamento dei globuli rossi con DTT per eliminare l'interferenza da anti-CD38.

Il trattamento dei globuli rossi deve essere effettuato con DTT 0.2M secondo la procedura riportata nell'Allegato Tecnico, ed eventualmente è consigliato consultare un Servizio di Immunoematologia e Medicina Trasfusionale di Riferimento.

3. Prove di compatibilità

- Per pazienti con screening negativo dopo trattamento con DTT
 - Selezionare concentrati eritrocitari ABO/Rh/K fenotipicamente compatibili
 - Eseguire cross-match elettronico o cross-match sierologico dopo pre-trattamento degli eritrociti del donatore con DTT (secondo la procedura riportata nell'Allegato Tecnico per le emazie test dei pannelli) selezionando preferibilmente concentrati eritrocitari con match fenotipico o genotipico esteso, tenendo conto del grado di immunogenicità degli antigeni in caso di impossibilità a rispettare un match completo
- Per pazienti con alloanticorpi eritrocitari identificati dopo trattamento con DTT
 - Selezionare concentrati eritrocitari compatibili per ABO/Rh/K e negativi per gli antigeni verso i quali sono diretti gli anticorpi identificati, tenendo conto preferibilmente del match fenotipico o genotipico esteso
 - Eseguire cross-match sierologico dopo pre-trattamento degli eritrociti del donatore con DTT (secondo la procedura riportata nell'Allegato Tecnico per le emazie test dei pannelli)
- Richiesta trasfusionale in emergenza
 - Assegnare concentrati eritrocitari ABO/RhD/K compatibili secondo il protocollo in uso presso la ST

Bibliografia

1. Oostendorp M, Lammerts van Bueren JJ, Doshi P, et al. *When blood transfusion medicine becomes complicated due to interference by monoclonal antibody therapy.* Transfusion 2015;55:1555-62.
2. Hannon JL, Clarke G. *Transfusion management of patients receiving daratumumab therapy for advanced plasma cell myeloma.* Transfusion 2015;55:2770.
3. Chapuy CI, Nicholson RT, Aguad MD, et al. *Resolving the daratumumab interference with blood compatibility testing.* Transfusion 2015;55:1545-54.
4. Regan DM and Markowitz MA. AABB Bulletin n.16-02, 15 January 2016.
5. Chapuy CI, Nicholson RT, Aguad MD, et al. *International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing.* Transfusion 2016; DOI: 10.1111/trf.13789.



ALLEGATO TECNICO

Procedura per il trattamento delle emazie con DTT e relativi test immunoematologici

Materiali

- DTT 0.2M preparato nel modo seguente: 1 grammo di DTT in 32 ml di PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) da suddividere in aliquote (circa 5 ml) che possono essere congelate a -20°C o conservate a +4°C secondo le indicazioni del foglio illustrativo del reagente o della Farmacia Ospedaliera che prepara la concentrazione molare.
- Tampone PBS pH 7.3
- Emazie di screening 3%
- Emazie pannello 3%
- Coombs Control
- Provette
- Pipette Pasteur

Procedura

A. Trattamento delle cellule

Portare un'aliquota di DTT 0.2M a temperatura ambiente e miscelare.

- Selezionare le emazie test da utilizzare come controllo. Il controllo positivo deve essere E+ (E+e+ oppure E+e-). Il controllo negativo deve essere K+ (K+k+ oppure K+k-).
- Identificare le provette per le cellule di screening o del pannello più l'autocontrollo, il controllo positivo e il controllo negativo con la seguente dicitura:
 - numero identificativo del campione
 - DTT
 - numero di ogni cellula, autocontrollo, controllo positivo e controllo negativo
- Aggiungere 2 gocce di sospensione di emazie al 3% nella provetta corrispondente.
- Lavare le emazie di ciascuna provetta 4 volte con tampone PBS pH 7.3.
- Aggiungere 8 gocce di DTT 0.2 M a ciascuna provetta.
- Miscelare bene e incubare a 37°C per 30 minuti (max 45 minuti). Durante l'incubazione mescolare delicatamente capovolgendo le provette per 3-4 volte.
- Lavare le emazie di ciascuna provetta 4 volte con tampone PBS pH 7.3.
- Le emazie trattate con DTT possono essere conservate a +4°C per 5 giorni.



B. Cellule test di controllo

Verificare la tipizzazione delle emazie di controllo per gli antigeni E e Kell: queste cellule devono essere E positive e Kell negative affinché la procedura di trattamento sia valida. Se la tipizzazione degli antigeni non dà il risultato atteso, l'intera procedura deve essere ripetuta.

C. Testare emazie trattate con DTT e autocontrollo

- Aggiungere 2 gocce di plasma del paziente a ciascuna provetta rimasta e miscelare bene.
- Incubare tutte le provette a 37°C per 15 minuti.
- Lavare tutte le provette 3 volte
- Aggiungere 2 gocce di siero di Coombs e miscelare bene.
- Centrifugare tutte le provette a 3500 rpm per 1 minuto
- Esaminare ciascuna provetta per emolisi ed agglutinazione e registrare i risultati. Non eseguire la valutazione al microscopio.
- A tutte le provette negative aggiungere una goccia di Coombs Control.
- Mescolare e centrifugare tutte le provette a 3500 rpm per 1 minuto
- Esaminare ciascuna provetta per emolisi ed agglutinazione e registrare i risultati. L'assenza di agglutinazione in questa fase invalida il test, che deve essere ripetuto.

D Interpretazione dei risultati

Se è stata eliminata la reattività del plasma, la specificità di alcuni anticorpi non evidenziabili con le tecniche sierologiche convenzionali potrebbe essere diretta verso i seguenti antigeni distrutti dal trattamento con DTT:

Sistema	Antigeni	Rischio di Reazione Emolitica
KEL	K, k, Kp ^a , Kp ^b , Js ^a , Js ^b , altri	Immediata o ritardata, moderata o severa
DO	Do ^a , Do ^b , Hy, Jo ^a , altri	Immediata o ritardata, moderata o severa
YT	Yt ^a , Yt ^b	Ritardata (rara), moderata
KN	Kn ^a , Kn ^b	Nessuna
LU	Lu ^b in modo variabile, altri	Nessuna o moderata
LW	Lw ^a , Lw ^b	Ritardata, nessuna o moderata
IN	In ^a , In ^b , altri	Ridotta sopravvivenza eritrocitaria