

Esperienza a confronto nei Laboratori di Immunoematologia dell'Ospedale di Livorno e del Policlinico di Catania per la gestione dei pazienti trattati con Daratumumab

Elena Sardano ⁽¹⁾ , Fabrizio Niglio⁽¹⁾ , Cristina Tagliaferri⁽¹⁾ , Davide Michela⁽¹⁾ , Sebastiano Pergolizzi⁽²⁾

⁽¹⁾Laboratorio Immunoematologia, Ospedale di Livorno

⁽²⁾Laboratorio Immunoematologia, Policlinico di Catania

Abstract

Daratumumab (DARA) è un anticorpo monoclonale IgG1κ umano anti-CD38, utilizzato per il trattamento di pazienti adulti con mieloma multiplo. Come noto da tempo, DARA si lega all'antigene CD38 che si trova in piccole quantità sui globuli rossi e può causare positività al test di Coombs indiretto (TCI) (persistente fino a 6 mesi dall'ultima infusione del farmaco), interferendo con la rilevazione degli auto/alloanticorpi irregolari antieritrocitari. Sono da tempo noti, validati e disponibili dei protocolli di trattamento delle emazie test e da donatore omologo con ditiotreitolo (DTT) per mitigare l'interferenza causata da DARA sui test pretrasfusionali (TCI e prova di compatibilità maggiore. Presso il SIMT di Livorno e di Catania è stata validata una modifica della metodica in fase liquida (diffusa dalla Società Italiana di Medicina Trasfusionale (SIMTI) e già validata su microcolonna con gel di destrano, adattandola alla microcolonna con microbiglie di vetro "Ortho Biovue" (con caratteristiche differenti in termini di sensibilità) e all'utilizzo automatizzato su strumento "Ortho Vision", permettendo quindi maggiore standardizzazione e tracciabilità dei risultati dei test pre-trasfusionali dei pazienti trattati con DARA) Come da indicazioni SIMT, in accordo con i Colleghi dell'Ematologia, ai pazienti candidati al trattamento o già in terapia con DARA è stato eseguito il fenotipo Rh e Kell e la tipizzazione eritrocitaria estesa (sierologica e ove possibile molecolare per gli antigeni clinicamente significativi (Kidd, Duffy, MNSs, Lewis, Lutheran, Kp, Scianna, Cartwright, ecc.) e il test di Coombs diretto: sono state, ove possibile, selezionate unità, full-match per prevenire eventuali alloimmunizzazioni verso antigeni clinicamente significativi.

Materiali

- DTT 0.2M in PBS 7,2 (aliquote da 20 ml per metodica automatizzata, conservate a -30°C)
- aliquota di plasma o siero del paziente
- Tampone PBS pH 7.2
- Soluzione fisiologica (se PBS non disponibile)
- Red Cell Diluent Ortho (RCD)
- Flaconi di RCD vuoti e puliti
- Emazie test Surgyscreen al 3%
- Schedina da fenotipo RhCE/K
- Schedina Coombs polispecifica IgG-C3d
- Provette da 5 e 10 mL inerti
- Pipette calibrate
- Pipette Pasteur monouso
- Tappi per provette da 5 mL
- Termostato a 37°C

Metodica:

1. Scongellare un'aliquota di DTT 0,2M nel termostato a 37°C e mescolarla bene per inversione;
2. Selezionare emazie da donatore EE o Ee (antigeni resistenti al trattamento con DTT) che costituiranno il controllo positivo ed emazie KK o Kk (antigeni sensibili al trattamento con DTT) che costituiranno il controllo negativo e produrre con esse una sospensione al 4% in RCD (100µL emazie paccate in 2400 µL di PBS)
3. Produrre una sospensione al 4% in Red Cell delle emazie del paziente che serviranno da autocontrollo, delle unità di emazie concentrate leucodeplete prestorage selezionate per l'esecuzione delle prove di compatibilità (100µL emazie paccate in 2400 µL di PBS)
4. lavare tutte le emazie 4 volte con tampone PBS pH 7.2, decantarle bene dopo l'ultimo lavaggio e riportare la sospensione al 4% (100 µL emazie paccate in 2400 µL di PBS)
5. prelevare 600 µL di sospensione di emazie al 4% da ciascuna provetta
6. aggiungere 3000 µL di DTT 0,2M a ciascuna provetta
7. miscelare bene, tappare ed incubare a 37°C per 10'-15' e mescolare le provette 3-4 volte per inversione ed interrompendo tempestivamente l'incubazione in caso di iscurimento delle emazie
8. lavare le emazie 4 volte con abbondante tampone PBS pH 7.2 e decantare bene dopo l'ultimo lavaggio
9. risospedire al 4% le emazie di controllo E+ e K+ in soluzione fisiologica (volume finale circa 500-600µL), associare un bar-code identificativo, eseguire sullo strumento Ortho Vision un test fenotipo RhCE/K attribuendo al campione la tipologia "3 CELLS": se la metodica è andata a buon fine lo score dell'antigene E dovrebbe presentarsi fortemente positivo mentre quello dell'antigene K dovrebbe presentarsi negativo o visibilmente ridotto rispetto a quello pretrattamento (Fig.5)
1. N.B: in caso di antigene K non denaturato la metodica non può essere considerata attendibile, ripetere quindi il trattamento (dal punto 4) su ulteriori aliquote di emazie aumentando i tempi d'incubazione.
10. preparare le sospensioni delle emazie test al 4% in RCD e metterle nei flaconi di RDC vuoti e puliti e barcodati nel seguente modo: DARACELL 1-DARACELL2-DARACELL3
11. selezionare il profilo, appositamente creato, chiamato TCI DARA ed eseguire il TCI (Fig.3)
12. Eseguire la prova di compatibilità maggiore tra le emazie dei donatori selezionate e trattate con DTT e siero paziente. Preparare le sospensioni al 4% delle suddette emazie opportunamente barcodeate su Vision, associare ad ciascuna sospensione di emazie test la tipologia campione "3 CELLS" e selezionare il profilo "x-match" (Fig. 4)

Risultati

Dal Gennaio 2021 sono stati processati i seguenti campioni: SIMT di Livorno n° 12 di 9 pazienti, SIMT del Policlinico Universitario di Catania 25 campioni di 10 pazienti.

Presso entrambi i SIMT nessuno dei pazienti presentava una positività del TCI prima dell'inizio del trattamento con DARA. Presso il SIMT di Livorno non si sono registrate reazioni trasfusionali e alloimmunizzazioni, mentre il SIMT del Policlinico di Catania ha registrato un solo caso di positività del TCI da autoanticorpi di classe IgG a specificità anti-C ed anti-D la cui reattività si presentava incrementata dal trattamento delle emazie test con DTT ed associate ad autocontrollo positivo omoscore rispetto alla positività del TCI.

Conclusioni

Partendo dal presupposto che la metodica standardizzata proposta dalla SIMT, per quanto valida, non è applicabile presso i SIMT che non dispongano di strumentazioni idonee alla standardizzazione delle metodiche in fase liquida a ciò si aggiunge che essa non consente una tracciabilità informatica dei

risultati. Il bisogno di trasfondere nel minor tempo possibile i pazienti in terapia con DARA presso i SIMT che utilizzano la microcolonna Ortho che presenta una sensibilità differente rispetto alla microcolonna con gel di destrano (per la quale era già stata proposta una metodica) ha spinto i nostri due SIMT a collaborare. L'applicazione di un protocollo condiviso ci ha consentito di valutarne l'applicabilità, la possibilità di standardizzazione e la tempistica di esecuzione: unico limite, a nostro parere, è l'indisponibilità al momento di aliquote commerciali di DTT standardizzate in grado di ridurre al minimo la variabilità legata alla preparazione home-made del reagente a fronte di una metodica proposta che si è dimostrata standardizzabile, tracciabile e less time-consuming.

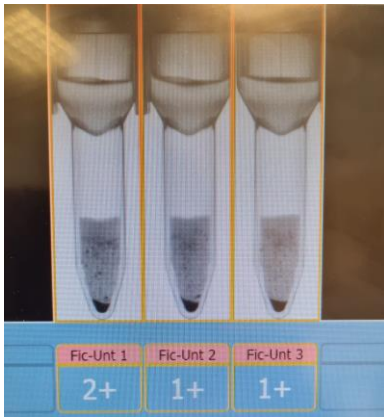


Fig.1 Test di coombs indiretto pre trattamento delle emazie con DTT

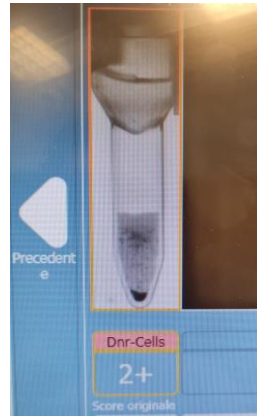


Fig.2 Cross match pre trattamento delle emazie con DTT

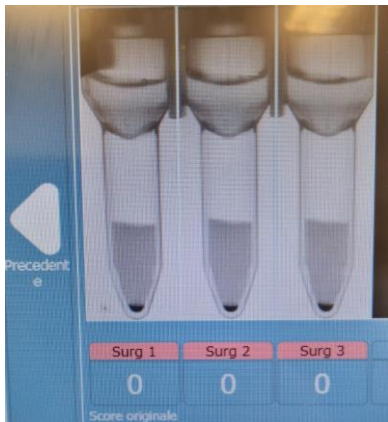


Fig.3 Test di coombs indiretto dopo trattamento delle emazie con DTT

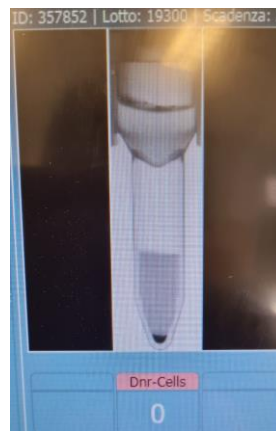


Fig.4 Cross match dopo trattamento delle emazie con DTT



Fig 5. Emazie di controllo E+ K+