



Linnéuniversitetet

Kalmar Växjö

Examensarbete, kandidatexamen

Verifiering av metod -för dithiothreitolbehandling av testerytrocyter

För att möjliggöra antikroppsscreen vid BAS-test för
daratumumab-behandlade patienter



Författare: Linus Karlsson
Handledare: Saffed Dhahad
Examinator: Michael Lindberg
Lärosäte: Linnéuniversitetet
Termin: VT-2023
Ämne: Transfusionsmedicin
Nivå: Kandidatexamen



Linnéuniversitetet

Kalmar Växjö



Titelsida

Arbetets titel: Verifiering av metod för dithiothreitolbehandling av testerythrocyter

Författare: Linus Karlsson

Examensarbete i biomedicinsk laboratorievetenskap 15 högskolepoäng
Filosofie kandidatexamen

Vetenskaplig handledare: Mohammad R. Abedi, Överläkare.
Medicinskt ansvarig för transfusionsmedicin
Södra Älvsborgs Sjukhus Borås
Västra Götalands Region
Brämhultsvägen 53
501 82 Borås

Intern handledare: Kerstin Sandholm, PhD
Fakulteten för Hälso- och livsvetenskap
Institutionen för Kemi och Biomedicin.
Linnéuniversitetet Universitetsplatsen 1
391 82 Kalmar

Examinator: Sofia Somajo, Biomedicinsk analytiker
Lektor i Biomedicinsk Laboratorievetenskap
Fakulteten för Hälso- och livsvetenskap, Institutionen
för Kemi och Biomedicin
Linnéuniversitetet Universitetsplatsen 1
391 82 Kalmar

Examensarbetet ingår i Biomedicinska analytikerprogrammet 180 högskolepoäng



Sammanfattning

Daratumumab är en antikropp som används vid behandling av multipelt myelom. Daratumumab är specifik för CD38, ytprotein som uttrycks i stor mängd på myeloma plasmaceller. Vid antikroppsscreen orsakar daratumumab panreaktivitet då erythrocyter också uttrycker CD38. Dithiothreitol (DTT) behandling av testerythrocyter har visats kunna eliminera panreaktiviteten med daratumumab-antikropparna, detta genom att DTT klyver bort epitopet på CD38 som daratumumab reagerar mot utan att förstöra andra kliniskt relevanta antigen. På Södra Älvsborgs sjukhus skickas prover från daratumumab-behandlade patienter till Sahlgrenska sjukhuset för genotypning för att hitta kompatibelt blod. Förhoppningen är att den nya metoden ska möjliggöra antikroppsscreen på daratumumab-behandlade patienter vid Södra Älvsborgs sjukhus. Syftet med examensarbetet var att verifiera metoden för användning av DTT-behandlade testerythrocyter på plasma från daratumumab-behandlade patienter för att underlätta val av erythrocyter för blodtransfusion. Provmaterialet var venöst tagen patientplasma från 16 daratumumab-behandlade patienter testades mot 0,2 M DTT-behandlade- och obehandlade-testerythrocyter. DTT-behandlade testerythrocyter testades även mot kända antikroppar på plasmaprover från patienter som ej behandlats med daratumumab. Hållbarhetsstudie utfördes med behandlade BAS-testceller. Panreaktivitet sågs hos samtliga patientprover med obehandlade testerythrocyter. Vid test med DTT-behandlade testerythrocyter blev samtliga prover negativa. Behandlade testerythrocyter som testades mot kända antikroppar gav resultat som var oförändrat jämfört med originalscreen. Behandlade testceller var brukbara 25 dagar. DTT behandling av testerythrocyter är effektivt och billigt, resultatet var pålitligt då samtliga patientprover inte uppvisade panreaktivitet efter DTT-behandling av testerythrocyter. De DTT-behandlade erythrocyterna behöll kliniskt relevanta antigen efter behandling och var hållbara 25 dagar. Metoden anses som användbar för Södra Älvsborgs sjukhus.

Nyckelord

Dithiothreitol, Daratumumab, Testerythrocyter, Multipelt myelom, CD38



Abstract

Daratumumab is an antibody used for treatment of multiple myeloma. The antibody is specific for the surface protein CD38 which is being expressed in high quantity on myeloma plasma cells. Daratumumab is causing pan-reactivity during antibody screening due to regular erythrocytes also express CD38. Dithiothreitol (DTT) treatment of test erythrocytes has shown to eliminate the pan-reactivity caused by the daratumumab antibodies by cleaving the epitope on CD38 that daratumumab is specific to. Södra Älvsborgs hospital are currently sending patient samples from patients treated with daratumumab to Sahlgrenska hospital in Gothenburg for genotyping to find compatible blood.

The purpose of the project was to verify the method for use of DTT-treated test erythrocytes on plasma from daratumumab treated patients to screen for antibodies and easier find compatible erythrocytes for blood transfusion at Södra Älvsborgs hospital.

Plasma samples from 16 patients treated with daratumumab were tested with DTT-treated and untreated test erythrocytes. DTT-treated test erythrocytes were tested against samples with known antibodies from patients not treated with daratumumab. The cells durability was also tested.

Pan-reactivity was shown with all daratumumab samples with non-treated test erythrocytes. Tests with DTT-treated test erythrocytes showed no pan-reactivity. Results from treated test erythrocytes tested against known antibodies were unchanged from original screening. The cells were durable for 25 days.

DTT-treatment of test erythrocytes is effective and cheap, test results were reliable, all patient samples had their pan-reactivity eliminated. DTT-treated erythrocytes kept clinically significant antigens. The method is useful for clinical use at Södra Älvsborgs hospital.

Keywords

Dithiothreitol, Daratumumab, RBC reagents, Multiple myeloma, CD38



Förkortningar

AHG	Anti-humant Globulin
BAS-test	Blodgrupperingskontroll och antikroppsscreening
CD38	Cluster of Differentiation 38
DO	Dombrock, blodgruppsantigen
DTT	Dithiothreitol
IAT	Indirekt antiglobulintest
IgG	Immunoglobulin G
IN	Indian, blodgruppsantigen
JMH	John Milton Hagen, blodgruppsantigen
K	Kell, blodgruppsantigen
KN	Knops, blodgruppsantigen
LISS	Low Ionic Strength Solution
LW	Lewis, blodgruppsantigen
MM	Multipelt myelom
NPA	Negative percentage agreement
NPV	Negativt prediktivt värde
PBS	Fosfatbuffrad koksaltlösning
PPA	Positive percentage agreement
PPV	Positive percentage agreement
SÄS	Södra Älvsborgs sjukhus



Tack

Jag vill tacka Saffed Dhahad, Carolina Svensson och Mohammad R. Abedi för möjligheten att få utföra examensarbetet på transfusionsmedicin vid Södra Älvsborgs sjukhus och för all hjälp inom teori och praktik med transfusionsmedicin.

Ett stort tack till Johan på Klinisk kemi för materialkunskap med teori inom kemi under hållbarhetsstudien vid materialtester.

Ett varmt tack till den trevliga personalen på labmedicin på SÄS för trevligt sällskap och gott bemötande!

Slutligen stort tack till min fru som stöttat mig genom projektet och peppat mig när det har varit svårt.



Innehållsförteckning

1	Introduktion	1
1.1	Antigen	1
1.2	Blodgruppsantikroppar	1
1.2.1	Antikroppsscreening	2
1.2.2	Gelkörtsteknik	3
1.2.3	Avläsning och agglutinationsgradering	4
1.3	Multipelt myelom	4
1.3.1	Daratumumab	5
1.3.2	DTT och CD38	6
1.4	Syfte	7
2	Material och metoder	7
2.1	Material	7
2.2	Framställning av 0,2 M DTT lösning	7
2.3	Framställning av DTT behandlade BAS-testeryrocyter	7
2.4	Kontroll av DTT behandlade BAS-testeryrocyter	7
2.5	Försök med patientprover med DTT behandlade testeryrocyter	8
2.6	Hållbarhetsstudie	8
2.7	Statistik	9
2.8	Etik	9
3	Resultat	10
3.1	Kontroll av DTT behandlade BAS-testeryrocyter	10
3.2	Försök med patientprover med DTT behandlade testeryrocyter	11
3.3	Hållbarhetsstudie	13
3.4	Statistik	14
4	Diskussion	14
4.1	Felkällor	16
5	Slutsats	17
6	Referenser	18



1 Introduktion

Daratumumab är en monoklonal antikropp som patienter med multipelt myelom kan behandlas med. Den monoklonala antikroppen angriper myelomcellerna effektivt men orsakar panreaktivitet vid den antikroppsscreen som görs när en patient behöver blodtransfusion. I dagsläget skickar Södra Älvsborgs Sjukhus i Borås patientprover från daratumumab-behandlade patienter till Sahlgrenska Universitetssjukhuset (SU) i Göteborg för genotypning i stället för traditionell antikroppsscreening med gelteknik för att upptäcka irreguljära erythrocytantikroppar. Vid behov till transfusion väljs erythrocyter som matchar genotypningen för kliniskt viktiga erythrocytantigener. Detta för att daratumumab är en antikropp som interfererar med antikroppsscreeningen. Förhoppningen är att en DTT-behandling av testerythrocyter ska möjliggöra antikroppsscreening vid BAS-test för patienter som behandlas med daratumumab och genotypning utförs som komplement endast för patienter som blir positiva vid antikroppsscreening med DTT-behandlade testerythrocyter.

1.1 Antigen

Antigen är allt som får immunförsvaret i kroppen att aktiveras. När immunförsvaret aktiveras, bildar celler i kroppen antikroppar mot antigenet som upptäckts. Antikropparna kan eliminera det främmande antigenet bland annat genom att märka in antigenet för makrofager eller aktivera komplementsystemet som bildar ett membranattackkomplex. På röda blodkroppar i blodet finns antigen som inte är främmande för individens egen kropp, men som är främmande för andra individer. Dessa antigen är ytproteiner, kolhydrater, glykolipider och glykoproteiner som varierar mellan individer. En samling av en typ av antigen kallas för blodgruppsantigen och studeras inom transfusionsmedicin (1–3). Antigen kan upptäckas med specifika antikroppar som binder till antigenet som till exempel finns på erythrocyter (röda blodkroppar). När dessa bindningar länkar samman erythrocyterna som bär på antigenet kallas det agglutination (se figur 1), som utnyttjas vid analyser inom blodgruppsserologin (2,3).

1.2 Blodgruppsantikroppar

De viktiga blodgrupperna inom ABO systemet: A, B, O och AB, bildar alltid antikroppar mot det antigen som individen inte har. Dessa antikroppar kallas reguljära antikroppar. Har individen A-antigenet på sina erythrocyter bildar individen antikroppar mot B-antigenet, har individen blodgrupp O har individen inget antigen och bildar både anti-A antikroppar och anti-B antikroppar. Dessa antikroppar utvecklas tidigt efter födseln hos alla individer och gör ABO systemet det kliniskt mest viktiga blodgruppsystemet (4). Utöver ABO systemet finns 43 blodgruppsystem med fler än 300 antigen som kan orsaka immunisering. Om individen utsätts för ett främmande blodgruppsantigen knutet till transplantation, transfusion eller graviditet, bildas antikroppar mot det främmande blodgruppsantigenet. Dessa antikroppar kallas irreguljära antikroppar och finns alltså inte från början, men kan uppstå över tid genom exponering (1,4,5). De mest kända och kliniskt relevanta blodgruppsystemen som kan orsaka immunisering och



därmed transfusionsreaktioner med antikroppar är: ABO, Rhesus, MNS, Kell, Duffy och Kidd (3,4,6).

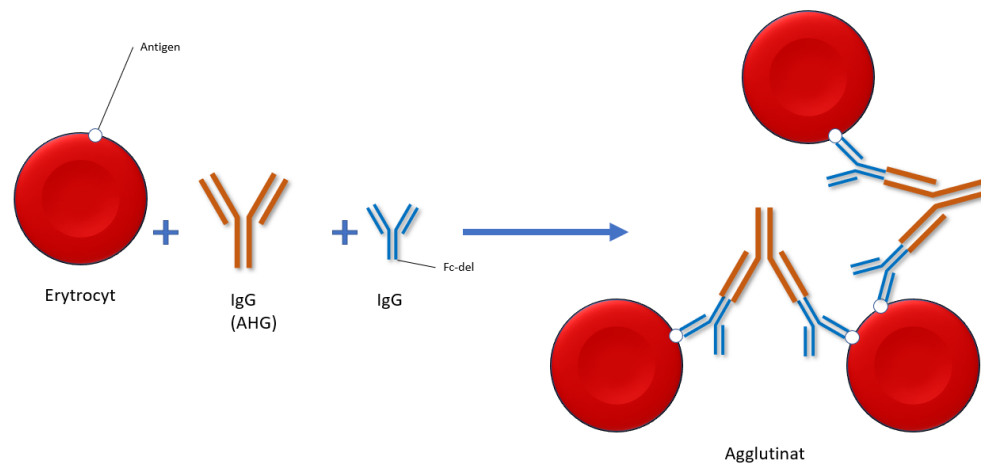
1.2.1 Antikroppsscreening

Antikroppsscreening görs vid blodgruppskontroll, antikroppsscreening och säkerhetsstest (BAS-test). Det görs innan blodtransfusion för att förhindra hemolytiska reaktioner under eller efter transfusionen (7). Vid antikroppsscreen eftersöks kliniskt relevanta antikroppar i mottagarens plasma, så kompatibelt blod som saknar de specifika antigenen som patienten har bildat antikroppar mot väljs ut för transfusionen till patienten (8).

Den vanligaste metoden för antikroppsscreen är indirekt antiglobulin test (IAT) där indirekta antikroppsbindningar till erythrocyter används för att bilda agglutinat (9). Till antikroppsscreening används testerythrocyter som bär på antigen som är specifika för alla kliniskt relevanta antikroppar. Testcellerna beställs till laboratoriet från leverantör och varje BAS-testerythrocyt har en känd uppsättning blodgruppsantigen. Mottagarens plasma med antikroppar inkuberas tillsammans med testerythrocyterna och om antikropparna finner ett antigen som de är specifika mot, binder de in och sensibiliserar BAS-testerythrocyten (10).

Vidare används polyspecifika Antihuman Globulin (AHG) antikroppar som är av Immunoglobulin G typ. IgG antikroppar är små och kan inte överbrygga erythrocyterna för att bilda agglutinat (3,9,11). Genom att använda låg jonstyrka på lösningen som reaktionen testas i, kan antikroppar och antigen få ökad laddning. Det resulterar i en ökad attraktion mellan antigen och antikropp och används för att underlätta antikroppsdetektion då agglutinatet bildas lättare. Metoden kallas Low-Ionic-strength solution (LISS) och möjliggör agglutinatbildning med IgG (10).

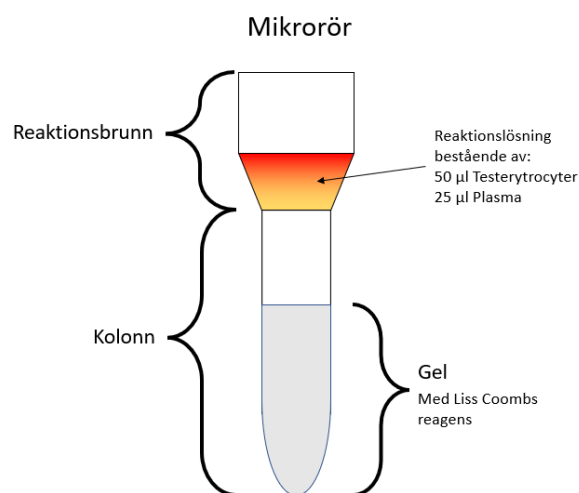
I LISS lösningen kan agglutinat bildas genom att AHG binder till humana IgG antikroppars Fc-del. Därmed kan antikropparna bilda agglutinat med hjälp av testerythrocyternas antigen (se figur 1). Antikropparna hos patientens plasma binder in till specifika antigen på testerythrocyten, därefter kommer komplexen i kontakt med AHG antikropparna som då binder ihop de märkta erythrocyternas inbundna IgG antikroppar med varandra. Detta bildar ett komplex som blir stort i storlek och kan då inte passera genom mindre porer som finns i exempelvis geler. Lösningen med AHG som används i gelkort kallas Coombs (10).



Figur 1. Schematisk bild över erythrocyten, antigen, antikroppar (IgG), Anti-Human Globulin (AHG) och agglutinatbildning.
Illustration: Linus Karlsson

1.2.2 Gelkortsteknik

Gelkort, mikrokolonner med gel används inom antikroppsscreening vid detektion av agglutinat. Gelen är porös och tillåter endast mindre partiklar att passera igenom vid centrifugering, gelerna är placerade i ett mikrorör som finns i sex uppsättningar på gelkort. När testerythrocyter och antikropparna i patientens plasma kommer i kontakt med varandra i reaktionsbrunnen kan agglutinat bildas (se figur 2). Agglutinatet kan inte tränga igenom gelens porer och stannar på gelens yta eller färdas endast en bit genom gelen vid centrifugering. Binder inga antikroppar till erythrocyternas antigen, sjunker erythrocyterna till gelrörets botten (10).



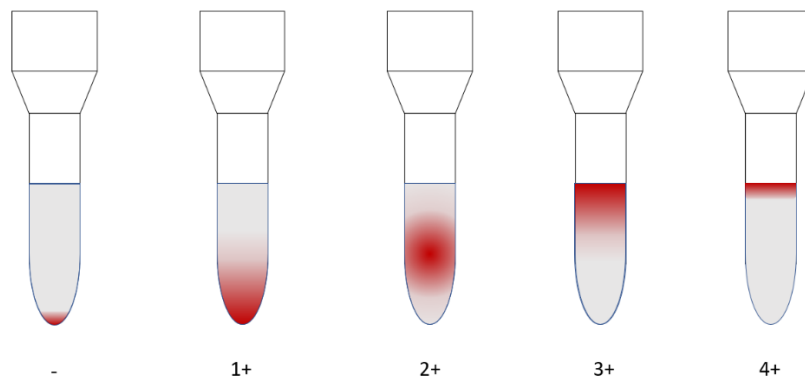
Figur 2. Mikrorör i gelkortsteknik. Schematisk bild över mikrorörets konstruktion och reaktionslösningens tillsättning.
Illustration: Linus Karlsson

1.2.3 Avläsning och agglutinationsgradering

Agglutinatstyrkan vid gelkortsteknik graderas efter en 5-gradig skala från negativ ”-” upp till ”4+” reaktion enligt SÄS Dokument nr 5944–7, figur 3.

- 4+ Alla erythrocyter ligger överst i kolonnen.
- 3+ De flesta erythrocyter (> 50%) ligger överst i kolonnen.
- 2+ Erythrocyterna ligger spridda i kolonnen.
- 1+ Huvuddelen (> 50%) av erythrocyterna ligger i kolonnens botten men en del ligger en bit upp i kolonnen.
- Alla erythrocyter ligger i kolonnens botten.

Vid unika fall graderas reaktioner som ”?” där positiv reaktion inte kan bedömas med säkerhet då erythrocyterna bildar en ramp som slutar på ett annat ställe än i mikrorörets spets. ”+/-” anger blandbild, där erythrocyter som tolkas som 3+ – 4+ reaktion förekommer tillsammans med oagglutinerade erythrocyter som ligger i botten. Detta fenomen ses vid transfunderad eller benmärgstransplanterad patient (12).



Figur 3. Schematisk bild över agglutinationsstyrkans bedömning för gelkortsteknik.

Illustration: Linus Karlsson

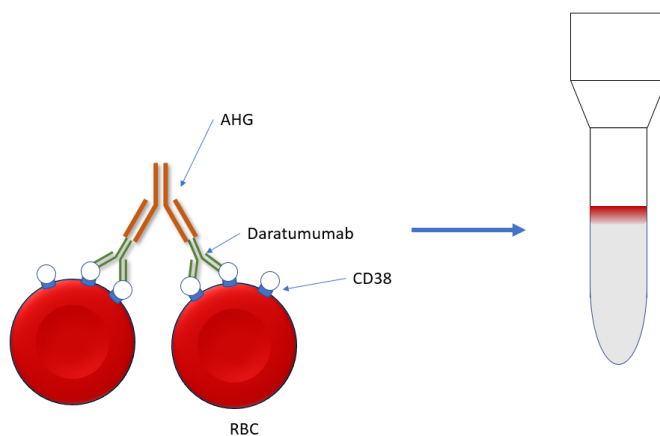
1.3 Multipelt myelom

Den näst vanligaste hematologiska maligniteten är multipelt myelom (MM) som främst drabbar äldre. MM visar sig genom diffusa symtom som skelettsmärter och trötthet. Sjukdomen orsakas av monoklonal proliferation av plasmaceller som leder till att plasmacellerna producerar en enda typ av monoklonala antikroppar. Det innebär att en klon av plasmacell delar sig obehindrat och tillverkar en enda antikropp. Antikropparnas ansamling leder till benförsvagningar, hyperkalemi (förhöjd nivå av kalium i blodet), njursvikt och anemi. Sjukdomen går inte att bota med dagens behandlingar men den kan behandlas (13).

1.3.1 Daratumumab

En behandling för MM är läkemedlet daratumumab. Daratumumab är en human IgG1 κ monoklonal antikropp som har en epitop på CD38 som sitt antigen (13,14). CD38 är ett transmembran glykoprotein som har en roll vid celladhesion och signalering. CD38 finns på flera mänskliga cellmembran som t.ex. erythrocyter, men i synnerhet på MM celler, därför är daratumumab effektiv på att söka upp och eliminera MM celler. Daratumumab eliminerar myelomcellerna genom antikroppsmedierad eller komplementmedierad destruktion i benmärgen, antikroppsmedierad fagocytos av celler och direkt apoptos med DNA korslänkning (13,15).

Daratumumab stör de laborativa testerna då antikroppen är riktad mot CD38 som även finns på friska erythrocyter (se figur 4). Detta får kliniskt relevanta antikroppar vid antikroppsscreening att maskeras, då samtliga testerythrocyter reagerar på daratumumab och ger falskt positiva resultat vid indirekt agglutinat test (IAT) som är den vanligaste tekniken vid antikroppsscreening (13). Daratumumab antikroppar kan ligga kvar i blodomloppet upp till sex månader efter avslutad behandling vilket gör det svårt att hitta antikroppar som påverkar transfusionen då patienten är under daratumumab behandling och blodtransfusion behövs (16,17). När daratumumab interfererar vid antikroppsscreening ses resultatet som positivt och tolkas som att en hög titer med antikroppar finns i patientens plasma (16).

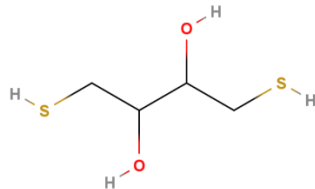


Figur 4. Schematisk bild över hur daratumumab interfererar och bildar falskt positiva reaktioner med AHG vid antikroppsscreening med gelkortsteknik.

Illustration: Linus Karlsson

1.3.2 DTT och CD38

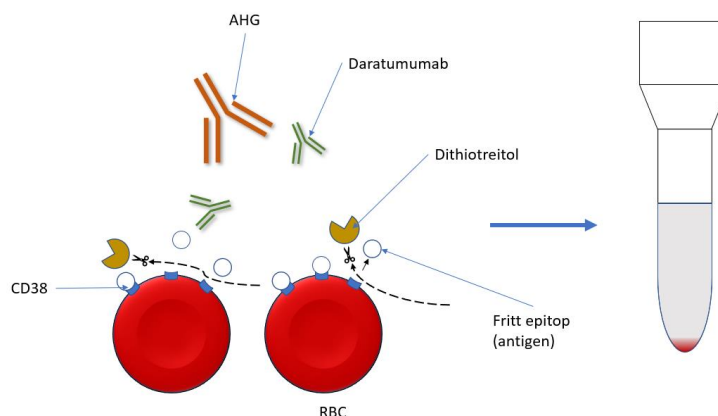
Dithiothreitol (DTT) (se figur 5) är ett reduceringsmedel som klyver disulfidbryggor som på exempelvis antigenet CD38 (18). DTT klyver bort epitopet som sitter längst ut på CD38 och som binds fast med disulfidbryggor, CD38 som förlorat sin epitop kan inte binda in antikroppar längre (19,20).



Figur 5. Dithiothreitol, molekylens struktur.

Illustration: Linus Karlsson

CD38 är ett transmembran glykoprotein som hjälper cellen med adhesion och signalerings transduktion. CD38 har en viktig roll i intracellulär mobilisering av calcium med enzymatisk aktivitet. CD38 uttrycks i lågt antal på många olika celler som myeloida celler, natural killer-cells (NK-celler), röda blodceller, blodplättar så kallade trombocyter, plasmaceller och prekursorceller men även aktiverade leukocyter som T- och B-celler. Ytproteinet CD38 uttrycks dock i allra störst utsträckning på myelomceller. Med sina sex disulfidbryggor i sin extracellulära domän blir CD38 en lämplig måltavla för DTT (se figur 6) (16).



Figur 6. Schematisk bild över DTT's verkan på CD38 som eliminerar falskt positiva reaktioner. CD38 och daratumumab orsakar inte längre någon agglutinerings vid antikroppsscreen med gelkortsteknik vid DTT behandling.

Illustration: Linus Karlsson

I sällsynta fall kan antikroppar till andra antigen som har disulfidbryggor som exempelvis Kell, Dombrock, Indian, John Milton Hagen, Knops, Lewis inte detekteras. Detta för att dessa antigen också förstörs av DTT (16).



Hållbarheten av DTT behandlade erythrocyter varierar mellan studier och kan vara så kort som 13 dagar i kyl med ospecificerad cellstabilitetslösning och upp till 28 dagar i ID-Cellstab. Högre koncentrationer av DTT har i tidigare försök visat ge hemolys av celler (18,21).

1.4 Syfte

Syftet med examensarbetet var att verifiera metoden för användning av DTT-behandlade testerythrocyter på plasma från daratumumab-behandlade patienter för att underlätta val av erythrocyter för blodtransfusion.

2 Material och metoder

2.1 Material

Prover som användes var venöst tagna blodprover i EDTA-rör som centrifugerats 1500 g i 10 minuter. En uppsättning på sexton plasmaprover från daratumumab-behandlade patienter med myelom, utan kända irreguljära antikroppar. Plasmaproverna var sparade i frys vid -20°C .

En uppsättning plasmaprover som sparats i kyl vid $6\pm 2^{\circ}\text{C}$ från friska patienter som inte behandlats med daratumumab, men med kända irreguljära antikroppar .

2.2 Framställning av 0,2 M DTT lösning

Till 32 ml 154 mM fosfatbuffrad saltlösning (PBS) (Merck, DE) tillsattes 1 g dithiothreitol (Merck, DE) och lösningen blandades väl. Den 0,2 M DTT lösningen fördelades i 2,7 mL/rör och förvarades i -20°C .

2.3 Framställning av DTT behandlade BAS-testerythrocyter

BAS-testceller 0,8% i PBS beställda från Lunds universitetssjukhus med en volym av 2000 μl av panel 11–14, centrifugerades vid 3000 rpm (1250 g), 1 minut, Universal 32 (Hettich, DE). Supernatanten kasserades och 640 μl tinad 0,2 M DTT lösning tillsattes. BAS-testcellerna inkuberades 30 minuter i värmeblock vid 37°C DRI Block DB 3A (Techne, UK) och blandades tre gånger var åttonde minut under inkubationen. BAS-testcellerna tvättades med 3 ml PBS, fyra gånger med centrifugering emellan vid 3000 rpm, (1250 g), en minut Universal 32. Supernatanten kasserades efter varje tvätt. Till de tvättade BAS-testcellerna tillsattes 1000 μl ID-Cellstab (BioRad, Schweiz) . Cellerna förvarades i kyla $4-8^{\circ}\text{C}$ och blandades före användning.

2.4 Kontroll av DTT behandlade BAS-testerythrocyter

De behandlade BAS-testerythrocyternas behandling verifierades genom att endast BAS-testcell 14 testades mot Anti-Fy(a) och Anti-Kell antikroppar för att bekräfta



att DTT behandlingen fungerade. Då BAS-testcell 14 är den enda som är positiv för både Fya och Kell.

Av fyra mikrorör på ett Coombs Anti-IgG kort (BioRad, Schweiz) (LOT: 50540 35 04) tillsattes 50 µl obehandlade BAS-testcell 14 till två mikrorör. Till de övriga två tillsattes 50 µl DTT behandlade BAS-testcell 14. Anti-Kell antikroppar IH-QC4 (BioRad, Schweiz) tillsattes 25 µl till ett mikrorör för DTT-behandlad BAS-testcell och 25 µl till ett mikrorör med obehandlad BAS-testcell. Anti-Fy(a) IH-QC2 (BioRad, Schweiz) tillsattes 25 µl vardera till kvarvarande BAS-testcell brunnar.

Kortet inkuberades i 15 minuter i kortinkubator ID-Incubator 37 SI (DiaMed-ID, Schweiz) vid $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ och därefter centrifugerades i ID-Centrifuge L (BioRad, Schweiz) vid 910 rpm i 10 minuter (85 g). Korten lästes av manuellt och resultatet bedömdes över ljusbord.

2.5 Försök med patientprover med DTT behandlade testerytrocyter

De behandlade testerytrocyterna testades mot 16 patientprover utan kända antikroppar från daratumumabbehandlade patienterna och resultatet jämfördes mot resultatet av obehandlade testerytrocyter.

Fem prover från friska patienter testades mot de DTT-behandlade BAS-testerytrocyterna för att kontrollera att övriga kliniskt relevanta antigenen fortfarande var kvar.

Coombs Anti-IgG kort användes och 50 µl av respektive testcell 11–14 tillsattes till varsitt mikrorör i två uppsättningar per patient, där en uppsättning är obehandlade BAS-testceller och den andra är DTT behandlade BAS-testceller. Till dessa mikrorör tillsattes 25 µl patientplasma från en patient till varje mikrorör för en uppsättning obehandlade BAS-testceller och 25 µl till varje rör för en uppsättning DTT behandlade BAS-testceller.

Korten inkuberades i 15 minuter i kortinkubator ID-Incubator 37 SI vid $37\pm 2^{\circ}\text{C}$, 15 minuter och därefter centrifugerades i ID-Centrifuge L vid 910 rpm, 10 minuter (85 g.) Korten lästes av manuellt efter BioRad's bedömningsmall över ljusbord.

2.6 Hållbarhetsstudie

DTT-behandlade testerytrocyter testades för hållbarhet. Studien utfördes med DTT-BAS-testerytrocyten 14 och utfördes varannan dag tre gånger i veckan (måndagar, onsdagar och fredagar). Studien utfördes på samma sätt som en vanlig kontroll men upprepades med angivna tidsspann tills cellerna inte var funktionella längre. Samtliga DTT-behandlade testerytrocyter kontrollerades visuellt efter eventuell hemolys varje morgon. Utöver tidsaspekten testades hållbarhetsskillnader hos DTT-behandlade testerytrocyter i behållare av olika material. Två uppsättningar bereddes på samma sätt som under rubrik 2.3 där en uppsättning bereddes i plaströr och en tillverkades i glaströr.



2.7 Statistik

Statistiken beräknades i Microsoft Excel 2023 (Microsoft Corp. Redmond, WA, USA). För att verifiera bedömningsförmågan vid positiva reaktioner mot standard beräknades positivt prediktivt värde (PPV) och negativt prediktivt värde (NPV) på bedömningen av agglutinationsreaktion. PPV och NPV anger vilka resultat som är sant positiva eller sant negativa. Samt beräknades positive percentage agreement (PPA) och negative percentage agreement (NPA). NPA är andelen negativa resultat i den utvärderade metoden som stämmer överens med den gamla metodens golden standard. PPA är andelen positiva samt negativa reaktioner bedömdes mot originalscreeningens resultat (22,23).

2.8 Etik

Samtliga patientprover är aidentifierade genom tilldelning av ett nummer mellan 1–16 för att bevara patienternas integritet och kunna redovisa resultat. Proverna hade kasserats i vanliga fall och 3 ml patientplasma behölls i 6 veckor enligt instruktion av medicinskt ansvarig. Enligt lag (2003:460) som avser att all forskning ska prövas etiskt men enligt 2 § inte forskning vid högskoleutbildning på grundnivå (24).

Under arbetet respekterades patientdatalagen (2008:355) och endast nödvändig information om patienten tilldelades och i största mån användes anonymiserade nummer för att undvika obehörigas tillgång till patientuppgifterna (25).

Proverna som användes faller inte under biobanksdatalagen då det är prover som rutinmässigt tas och endast sparas en kort tid. Dessutom analyseras proverna inom sex månader från att de är tagna och proverna kasseras i samband med att arbetet avslutas enligt biobankslagen (2002:297) som gäller fram till den 1/7-2023 (26).



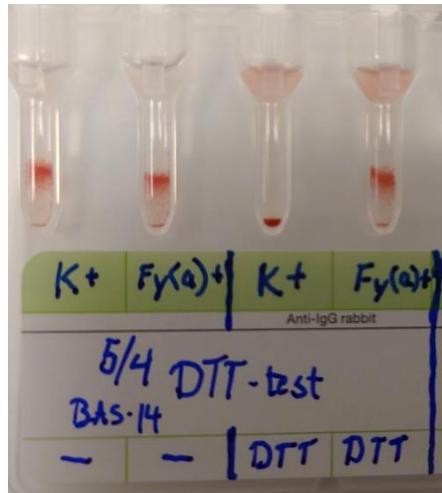
3 Resultat

3.1 Kontroll av DTT behandlade BAS-testerythrocyter

Testet utfördes varje dag de DTT behandlade BAS-testerythrocyterna skulle användas, detta som en kontroll för att fastställa funktionen på andra antigen efter behandlingen, samt att bekräfta att Kell antigenet hade denaturerats (se figur 7). Vid alla test blev resultatet överensstämmande för den obehandlade BAS-testcell 14. 3+ positiv reaktion för både anti-Fy(a) och anti-Kell. Resultatet för DTT behandlade testerythrocyter var positivt med 3+ reaktion för anti-Fy(a) och negativt för anti-Kell. Den 11/4 uteblev resultat för de DTT-behandlade testerythrocyterna (se tabell I).

Tabell I. Resultat från kontrollförsök. Utfördes varje dag då patientprover testades med DTT behandlade BAS-testerythrocyter (1%) som positiv kontroll och obehandlade BAS-testerythrocyter (0,8%) som negativ kontroll. ”inget res.” anger att inget resultat erhöles vid testet, ”-” anger att resultatet var negativt.

Datum	Kontroller		BAS 14	
	DTT-BAS 14 A-Kell	A-Fy(a)	A-Kell	A-Fy(a)
2023-04-04	-	3+	3+	3+
2023-04-05	-	3+	3+	3+
2023-04-11	inget res.	inget res.	3+	3+
2023-04-12	-	3+	3+	3+
2023-04-13	-	3+	3+	3+
2023-04-14	-	3+	3+	3+
2023-04-19	-	3+	3+	3+
2023-04-21	-	3+	3+	3+



Figur 7. Kontroll som utfördes före varje dag patientprover skulle testas samt för hållbarhetsstudien. Utfördes med obehandlade- och DTT-behandlade 14 BAS-testerythrocyter (1%). K+ anger mikrorör där anti-Kell antikroppar användes, Fy(a) anger mikrorör där anti-Fya antikroppar användes. "-" anger mikrorör där obehandlade BAS-testerythrocyter användes och "DTT" anger brunnar där DTT-behandlade BAS-testerythrocyter använts. BAS-testcell 14 användes då den är positiv för både Kell och Fya.

3.2 Försök med patientprover med DTT behandlade testerythrocyter

De 16 patientplasmaproverna testades med DTT behandlade- och obehandlade-BAS-testerythrocyter. Obehandlade BAS-testerythrocyter resulterade i 1+ till 3+ agglutinationsreaktioner i alla fyra mikrorör, för alla utom patientprov n.13 som var positiv i BAS-testerythrocyt 11 och 13 och negativ i BAS-testerythrocyt 12 och 14.

Efter tester med DTT behandlade BAS-testerythrocyter mot de behandlade patienternas prover resulterade alla mikrorör för samtliga BAS-testceller som negativa agglutinationsreaktioner och alla erythrocyter samlades i botten på mikrorören (se figur 8 och tabell II).



Tabell II. Patientprover testade mot BAS-testceller som är obehandlade eller behandlade med DTT. Originalbedömningen som gjordes vid antikroppsscreen när provet anlände är bifogat för jämförelse mot utförd bedömning.

Patientprov nr.	Resultat efter screen BAS-celler 11–14 BAS-testceller utan DTT behandling				Originalantikroppsscreen BAS-celler 11–14 BAS-testceller utan DTT behandling				Resultat efter screen BAS-celler 11–14 BAS-testceller med DTT behandling			
	11	12	13	14	11	12	13	14	11	12	13	14
1	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	1+	-	-	-	-
2	2+	3+	3+	2+	1+	1+	2+	1+	-	-	-	-
3	2+	2+	2+	1+	1+	2+	2+	1+	-	-	-	-
4	2+	2+	1+	1+	1+	1+	2+	1+	-	-	-	-
5	1+	2+	1+	1+	1+	2+	1+	1+	-	-	-	-
6	2+	2+	2+	1+	2+	1+	2+	1+	-	-	-	-
7	1+	2+	2+	1+	1+	2+	1+	1+	-	-	-	-
8	1+	2+	2+	2+	2+	1+	2+	1+	-	-	-	-
9	2+	2+	2+	1+	2+	2+	2+	1+	-	-	-	-
10	2+	2+	3+	1+	2+	2+	2+	1+	-	-	-	-
11	1+	2+	1+	1+	2+	2+	2+	2+	-	-	-	-
12	2+	2+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	-	-	-	-
13	1+	-	1+	-	2+	2+	2+	2+	-	-	-	-
14	2+	2+	2+	1+	2+	2+	2+	2+	-	-	-	-
15	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	-	-	-	-
16	2+	2+	2+	1+	1+	2+	2+	1+	-	-	-	-



Figur 8. Antikroppsscreening utförd med patientprov n. 6–10 bestående av plasma med BAS-testerythrocyter (1%) 11–14, obehandlade (Märkta i svart ”Ej DTT”) och DTT-behandlade (Märkta i blått ”DTT”).

Tester med friska patienternas plasma med DTT-behandlade BAS-testerythrocyter, med kända antikroppar sedan tidigare tester stämde överens med sin respektive antikropp enligt antigram (se Tabell III). Anti-M var svag i testcell 12 och 13.

Tabell III. Friska patienters plasma med DTT behandlade BAS-testerythrocyter (1%). Patientproverna hade tidigare antikroppsidentifierats och screeningen ställdes mot antigram.

Screen	Screen				Kända antikroppens antigram			
	11	12	13	14	11	12	13	14
anti-D test 14/4	1+	2+	3+	-	+	+	+	0
anti-M test 14/4	2+	(+)	(+)	2+	+	+	+	+
anti-Cw Test 21/4	-	-	2+	-	0	0	+	0
anti-C Test 21/5	1+	2+	2+	-	+	+	+	0
anti-E Test 21/6	-	-	-	1+	0	0	0	+

3.3 Hållbarhetsstudie

BAS-testerythrocyterna för hållbarhetsstudien hade lätt hemolys efter de första 48 timmarna från tillverkning. Hemolysen tilltog inte under de första veckorna och resultatet var tydliga 3+ reaktioner fram till dag 25 från start (se tabell IV). Läsbarheten hade avtagit i antal celler dag 29 från start och där utefter anses resultatet vara opålitligt. Vid materialstudien där en uppsättning BAS-testerythrocyter bereddes i plaströr och en uppsättning i glasrör, uppstod hemolys i plaströren efter 48 timmar som innan. Testcellerna i glasrör uppstod hemolys först efter sju dagar.



Tabell IV. DTT-behandlade och obehandlade BAS cell 14 med IH-QC4 (anti-Kell) och IH-QC2 (anti-Fy(a)). *: Avtagande antal erythrocyter, markant hemolys. **: Största delen celler hemolyserade, svagt läsbart resultat.

HÅLLBARHETSSTUDIE				
DATUM	DTT-BAS 14		BAS 14	
	A-Kell	A-Fy(a)	A-Kell	A-Fy(a)
2023-04-17	-	3+	3+	3+
2023-04-19	-	3+	3+	3+
2023-04-21	-	3+	3+	3+
2023-04-24	-	3+	3+	3+
2023-04-26	-	3+	3+	3+
2023-04-28	-	3+	3+	3+
2023-05-03	-	3+	3+	3+
2023-05-05*	-	3+	3+	3+
2023-05-08	-	3+	3+	3+
2023-05-10	-	3+	3+	3+
2023-05-12	-	3+	3+	3+
2023-05-15**	-	3+	3+	3+

3.4 Statistik

Vid antikroppsscreenen utföll 62 av 64 analyser som förväntat av tester med obehandlade testerythrocyter. Antal positiva och negativa reaktioner jämfördes mellan originalscreenen och den egna utförda antikroppsscreenen. PPV och NPV beräknades till 96,8% respektive 0%. PPA och NPA beräknades till samma värden, 96,8% respektive 0%.

4 Diskussion

Syftet med studien var att verifiera användningen av DTT-behandlade testerythrocyter vid antikroppsscreen på patientprover från daratumumab-behandlade myelom patienter för Södra Älvsborgs sjukhus, Borås. Detta för att kunna med större säkerhet välja ut rätt blodenheter för blodtransfusioner till patienter med multipelt myelom.

Då CD38 uttrycks i så stor utsträckning på MM celler är daratumumab ett lämpligt och effektivt läkemedel att behandla multipelt myelom. Problemet är att en stor mängd vanliga celler i kroppen också uttrycker CD38, däribland vanliga erythrocyter. Detta leder till problem som uppstår vid antikroppsscreen med AHG då daratumumab-antikropparna från patientens plasma reagerar med BAS-testerythrocyterna vid screenen. Detta resulterar i positiva reaktioner som döljer andra antikroppar och även orsakar falskt positiva resultat. Läkemedlet är dock effektivt att slå ut myelomceller och behövs för behandling av patienter (10,13,14).



Processen att skicka prover till Göteborgs Sahlgrenska sjukhus för genotypning av dessa patienter för att ta reda på blodgruppsfenotyp kan kompletteras med DTT behandling av testerytrocyter. DTT-behandlingen gör att CD38 denatureras och de ospecifika reaktionerna som följer de kliniskt relevanta antikropparna vid antikroppsscreenen elimineras. Detta möjliggör ytterligare underlag för val av erytrocyter för transfusion (16,18).

Nackdelen är att DTT denaturerar inte bara CD38 utan även blodgruppsantigen som exempelvis Kell. Andra blodgruppsantigen-system som kan vara DTT känsliga är Dombrock (DO), Indian (IN), John Milton Hagen (JMH), Landsteiner-Wiener (LW), Lutheran (LU), Raph (RAPH), Yt (YT), Cromer (CROM) (8,27). Mest kliniskt relevant är dock Kell och därför väljs Kell-negativt blod vanligen till daratumumab-behandlade patienter.

Fördelen med DTT är att det är billigt och behandlingen av testerytrocyter är enkel och snabb samt att DTT lösningar går att frysas in till senare tillfälle och är då hållbara ett år (18,27).

Vid antikroppsscreenen med obehandlade testerytrocyter som jämfördes mot originalscreenen, resulterade PPV och NPV i 96,8% respektive 0% som visar på att det med största sannolikhet att en positiv reaktion bedömdes som positiv, 62 av 64 reaktioner bedömdes som positiva. Negativa reaktioner bedömdes i 2 patientprover som var positiva vid originalscreeningen därav blev NPV 0%. Samma resultat vid PPA och NPA där 96,8% av bedömda positiva resultat blir positiva och 0% negativa. Därför stämmer bedömningen i positiv reaktion med största sannolikhet. Resultatet för patientprov 13 vid screen med obehandlade BAS-testerytrocyter var negativt med testcell nr 12 och 14 vilket inte stämde överens med tidigare antikroppsscreen. Det fenomenet kan ha sin orsak i att proven sparats i en längre period i frys innan projektet startade och att daratumumab-antikropparna inte var lika starka längre.

Resultatet visar på att DTT är effektivt till att denaturera CD38 och möjliggöra upptäckten av kliniskt relevanta antikroppar då samtliga prover blev negativa efter test med DTT behandlade BAS-testerytrocyter. Kontroller visade att Kell-antigenet också denaturerades, men Fy(a)-antigenet kvarstod efter DTT behandling som då tillåter upptäckt av de mest kliniskt relevanta antikropparna hos myelompatienter trots daratumumab-behandlingen. Kontroller som gjorts i andra studier med anti-Kell och anti-D har också visat att Kell denaturerar men D-antigenet kvarstår (13). Vidare tester med kända antikroppar reagerade som förväntat med DTT behandlade BAS-testerytrocyter som visar på att andra kliniskt relevanta antigen utom Kell inte påverkas. Anti-M var svag i reaktionen med testcell 12 och 13, detta berodde på att anti-M reaktionen vid originalscreenen var svag. Anti-M är som mest reaktiv vid låga temperaturer, så en högre temperatur kan orsaka en lägre reaktivitet som vid rumstemperatur (28).

Patientproverna resulterade alla i negativa resultat efter antikroppsscreen med DTT-behandlade testerytrocyter som visats i tidigare studier. I vårt projekt sågs inga nya antikroppar ha uppstått men i andra studier i endast ett fåtal fall har reaktivitet setts i antikroppsscreen med DTT-behandlade testerytrocyter (13). Skulle fallet vara sådant skickas provet till genotypning som vanligt. I andra studier har man litat på



antikroppsscreeningen med DTT-behandlade testerytrocyter och grundat utlämning av blod på ett negativt BAS-test (16).

DTT-behandlade testerytrocyterna hemolyserade lättare än obehandlade testerytrocyter och uppvisade hemolys redan vid tvätt efter behandling med DTT i fyra av åtta tillverkade uppsättningar. Materialet på behållarna som cellerna behandlades i kan ha påverkat. Då en testuppsättning tillverkades i glasrör uppvisades ingen hemolys efter tillverkning under första veckan. En uppsättning som gjordes samtidigt i plastbehållare uppvisade lätt hemolys redan efter 48 timmar. Mer materialstudier hade behövt utföras och större uppsättning med plast och glasrör för att bekräfta att materialet var orsaken till hemolysen. Hållbarhetsstudien utfördes före materialstudien, den visade att cellerna som behandlades med DTT i plaströr var hållbara och pålitliga i 25 dagar. Eftersom dag 25 var antalet celler få och hemolysen mer påtaglig bör cellerna inte användas längre än 25 dagar. Vidare tester och verifiering på hållbarhet på celler behandlade i glasrör hade behövts för att fastställa slutliga tiden cellerna går att använda.

I studien finns brister då endast en uppsättning gjordes på varje patientprov, detta minskar trovärdigheten då studien får lägre reproducerbarhet. Den reproducerbarhet som finns som stärker studien är de upprepade utförda kontroller som bekräftar att DTT behandlingen av testerytrocyter fungerar.

Metoden är effektiv och en antikroppsscreen kan göras på plats på Södra Älvsborgs Sjukhus i Borås, som komplement till genotypningen för val av erytrocyter vid transfusion till daratumumabbehandlade patienter. Om patienten inte uppvisar några irreguljära antikroppar kan blod lämnas ut till patienten före genotypningen så länge blodet är Kell-negativt. Det sparar tid för patienten att få sin blodtransfusion och ger en ekonomisk vinning då provet inte behöver skickas till SU för genotypning. Screeningen utförs då med DTT-behandlade testerytrocyter om daratumumab-behandlat patientprov inkommer. Uppvisar patienten irreguljära antikroppar behövs fortfarande en genotypning utföras vid Sahlgrenska Universitetssjukhuset.

En nackdel är att endast antikroppsscreen kan utföras då antikroppsidentifiering måste utföras genom genotypning. Ett annat alternativ hade varit att behandla testerytrocyterna med lägre koncentration DTT direkt i reaktionsbrunnen på mikroröret. Detta hade möjliggjort antikroppsidentifiering med gelkortsteknik också, på bekostnad av mer arbetsmoment och felkällor (20).

4.1 Felkällor

Vid första testet av prov 11–14 uppstod en tunn hinna ovanpå gelen i Coombs Anti-IgG korten och även falskt svagt positiva reaktioner med de DTT-behandlade BAS-testcellerna. Patienten har tidigare varit negativ och borde då få ett negativt resultat med DTT behandlade testerytrocyter. Felkällan berodde på fibrintrådar som uppstått då provet sparats i sex veckor. Problemet löstes genom att plasmaprovet centrifugerades vid 3000 rpm, (1250 g) i 10 minuter så fibrintrådarna sjönk till botten. Provet sattes om och plasma från toppskiktet användes, proven blev då negativa som förväntat (12).



Två batchar med DTT behandlade erythrocyter totalhemolyserade och gick inte att bruka för tester, det var endast BAS-testcell 14 från batcharna som tillverkades den 5:e april och den 12:e april

som hade totalhemolyserat. Cell 14 var den sista BAS-testcellen i batcharna som vattensugen användes till vid tvättning. Den 11:e respektive den 13:e april hade cellerna hemolyserat som kan ses i resultatet för kontroll (Tabell 1.). Den 12:e kommer resultatet från den nytillverkade cellen som gjordes samma dag. Den 12:e och 13:e april tillverkades nya celler som användes till kontrollen. Trolig orsak är vid PBS-tvättningen, när supernatanten skulle kasseras med vattensug användes för lite flöde på kranen, som fått vatten att flöda tillbaka ner i röret och kontaminerat cellerna som därav lyserat över tid (29). Under tvättningen rengjordes sugen genom att suga vanligt kranvatten mellan kasseringen av supernatant, vattnet som fastnade då på sugens utsida orsakade att vatten överfördes till cellerna till nästa BAS-testcellrör. Övriga DTT-behandlade celler var fortfarande fullt dugliga vid den 11:e april.

DTT-behandlade BAS-testerythrocyter tillredda i glasrör visade tendenser att hålla bättre än dom tillredda i plaströr. En uppsättning i plaströr och en i glasrör gjordes samtidigt. Testcellerna som tillreddes i plaströr uppvisade lätt hemolys efter ett dygn, testceller tillredda i glasrör uppvisade hemolys först efter en vecka. Fler studier behövs utföras för att bekräfta detta.

5 Slutsats

DTT-behandlade testerythrocyter underlättar valet av blodenheter till patienter med daratumumab-behandling vid Södra Älvsborgs sjukhus då antikroppsscreenen kan utföras på plats. Metoden är pålitlig då panreaktiviteten uteblir vid test. De DTT-behandlade testerythrocyterna uppvisar fortfarande alla kliniskt relevanta antigener utom Kell vid tester mot kända antikroppar. DTT behandlingen tycks försvaga testerythrocyterna något och hemolys uppstår men majoriteten av cellerna är brukbara efter tre veckor med förvaring i kyl. DTT behandlingen är pålitlig och billig och underlättar val av erythrocyter till daratumumab-behandlade patienter och är därmed en lämplig metod att använda vid Södra Älvsborgs sjukhus.



6 Referenser

1. Holt SG, Kotagiri P, Hogan C, Hughes P, Masterson R. The potential role of antibodies against minor blood group antigens in renal transplantation. *Transpl Int*. 2020 Aug;33(8):841–8.
2. Daniels G. *Human blood groups*. 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Science; 2002. 560 p.
3. Daniels G, Bromilow I. *Essential guide to blood groups*. Third edition. Chichester, West Sussex, UK: Wiley Blackwell; 2014. 1 p.
4. Mitra R, Mishra N, Rath GP. Blood groups systems. *Indian J Anaesth*. 2014 Sep;58(5):524–8.
5. 201 Table of blood group systems [Internet]. International Society of Blood Transfusion; 2022 [cited 2023 Jun 10]. Available from: <https://www.isbtweb.org/resource/tableofbloodgroupsystems.html>
6. Dean L. *Blood Groups and Red Cell Antigens*. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005.
7. BAS-test [Internet]. Sahlgrenska Universitetssjukhuset; 2019 [cited 2023 Mar 30]. Available from: <https://www.sahlgrenska.se/for-dig-som-ar/vardgivare/laboratoriemedicin/analyslistan/bas-test/>
8. Reid ME, Lomas-Francis C, Olsson ML. *The blood group antigen factsbook*. Third edition. Amsterdam: Elsevier/AP; 2012. 745 p.
9. Theis SR, Hashmi MF. Coombs Test. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 [cited 2023 May 5]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547707/>
10. McCullough J. *Transfusion medicine*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. 584 p.
11. ID-Card “Coombs Anti-IgG” B004024 v.01. Bio Rad;
12. Abedi M, editor. *Bedömning av reaktionsstyrka med gel- och rörteknik, TM*. Dok nr 5944-7. Handhavandebeskrivningar. Serologi Borås, Skene och Alingsås; 2022.
13. Deneys V, Thiry C, Frelik A, Debry C, Martin B, Doyen C. Daratumumab: Therapeutic asset, biological trap! *Transfus Clin Biol*. 2018 Feb;25(1):2–7.
14. Bhatnagar V, Gormley NJ, Luo L, Shen YL, Sridhara R, Subramaniam S, et al. FDA Approval Summary: Daratumumab for Treatment of Multiple Myeloma After One Prior Therapy. *Oncologist*. 2017 Nov;22(11):1347–53.
15. Saltarella I, Desantis V, Melaccio A, Solimando AG, Lamanuzzi A, Ria R, et al. Mechanisms of Resistance to Anti-CD38 Daratumumab in Multiple Myeloma. *Cells*. 2020 Jan 9;9(1):167.



16. Subramaniyan R, Satheshkumar R, Pereira KR. Role of daratumumab in transfusion medicine: a must know entity. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2017;39(4):375–8.
17. Rosé M, Bourahla I, Ghiddi A, Al-Akabawi A, Chan E, Toussi M. Assessment of Healthcare Professionals' Knowledge and Understanding of the Risk of Blood Typing Interference with Daratumumab: A Survey of 12 European Countries. *Adv Ther.* 2021 May;38(5):2284–93.
18. Lorenzen H, Lone Akhtar N, 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 Oct;113(7):686–93.
19. Berthelie V, Laboureau J, Boulla G, Schuber F, Deterre P. Probing ligand-induced conformational changes of human CD38. *Eur J Biochem.* 2000 May;267(10):3056–64.
20. 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.* 2020 Jul;18(4):290–4.
21. Sigle JP, Mihm B, Suna R, Bargetzi M. Extending shelf life of dithiothreitol-treated panel RBCs to 28 days. *Vox Sang.* 2018 May;113(4):397–9.
22. McHugh LC, Snyder K, Yager TD. The effect of uncertainty in patient classification on diagnostic performance estimations. *PLoS One.* 2019;14(5):e0217146.
23. West R, Kobovich A. Factsheet. Understanding the Accuracy of Diagnostic and Serology Tests: Sensitivity and Specificity [Internet]. Johns Hopkins Bloomberg School of public Health; 2020 [cited 2023 Apr 19]. Available from: <https://www.centerforhealthsecurity.org/resources/COVID-19/COVID-19-factsheets/201207-sensitivity-specificity-factsheet.pdf>
24. Lag (2003:460) om etikprövning av forskning som avser människor. Utbildningsdepartementet; 2003.
25. Patientdatalag (2008:355). Socialdepartementet; 2008.
26. Lag (2002:297) om biobanker i hälso- och sjukvården m.m. [Internet]. Socialdepartementet; 2002 [cited 2023 Jun 19]. Available from: https://www.riksdagen.se/sv/dokument-och-lagar/dokument/svensk-forfattningssamling/lag-2002297-om-biobanker-i-halso-och_sfs-2002-297/
27. Chapuy CI, Aguad MD, Nicholson RT, AuBuchon JP, Cohn CS, Delaney M, et al. International validation of a dithiothreitol (DTT)-based method to resolve the daratumumab interference with blood compatibility testing. *Transfusion.* 2016 Dec;56(12):2964–72.
28. Wang S, Wang J, Mo X, Wang Z, Wu Y, Liu F, et al. Analysis of anti-M antibody status and blood transfusion strategy in Hunan, China. *Ann Transl Med.* 2022 Nov;10(21):1166.



29. Goodhead LK, MacMillan FM. Measuring osmosis and hemolysis of red blood cells. *Adv Physiol Educ.* 2017 Jun 1;41(2):298–305.