

# Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter<sup>1</sup>, C. Weingart<sup>1</sup>, N. Merten<sup>1</sup>, N. Bock<sup>1</sup>, B. Kohn<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klein- und Heimtierklinik, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, Berlin, Deutschland

## Zusammenfassung

Die Kreuzprobe dient der Bestimmung der serologischen Kompatibilität von Spender- und Empfängerblut. Mittels dieses Verfahrens können mögliche Antikörper gegen die Erythrozyten des Spenders detektiert und so das Risiko für immunologische Transfusionsreaktionen reduziert werden. Für die Durchführung von Kreuzproben stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung: Neben dem Röhrchen-Agglutinationsverfahren, welches häufig als Referenzmethode angesehen wird, stehen Gel- und immunchromatographische Verfahren zur Verfügung.

In dieser Studie wurden ein Gel-Röhrchen-Verfahren, ein durch Antiglobuline verstärktes Gel-Röhrchen-Verfahren sowie ein immunchromatographisches Verfahren im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren an 28 verschiedenen Major-Kreuzproben evaluiert. Die Evaluierung ergab insgesamt eine 85,7%ige Übereinstimmung des durch Antiglobuline verstärkten Gel-Röhrchen-, eine 60,7%ige Übereinstimmung des Gel-Röhrchen- und eine 35,7%ige Übereinstimmung des immunchromatographischen Verfahrens mit dem Röhrchen-Agglutinationsverfahren. Bei alleiniger Betrachtung der makroskopisch positiven Testergebnisse war die Übereinstimmung zwischen dem Röhrchen-Agglutinationsverfahren und dem durch Antiglobuline verstärkten Gel-Röhrchen-Verfahren 100 %, dem Gel-Röhrchen Verfahren 62,5 % und dem immunchromatographischen Verfahren 0 %.

Mit dem durch Antiglobuline verstärkten Gel-Röhrchen Verfahren wurden 4/9 schwach positive Kreuzproben, bei welchen mit dem Röhrchen-Agglutinationsverfahren eine mikroskopische Agglutination mit einem Agglutinationsgrad von 1+ – 2+ sichtbar wurde, als kompatibel gewertet. Bei allen weiteren Kreuzproben mit einem stärkeren Agglutinationsgrad stimmten die Ergebnisse mit denen des Röhrchen-Agglutinationsverfahrens überein. Die Transfusion inkompatibler Blutprodukte kann zu hämolytischen Transfusionsreaktionen führen; die klinische Relevanz mikroskopisch schwach positiver Kreuzproben ist jedoch unklar. Die Durchführung der verschiedenen Test-Kits nahm im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren deutlich weniger Zeit in Anspruch. Aufgrund der starken Über-

## Evaluation of different cross-matching techniques in comparison to the tube agglutination method in dogs

Cross-matching is used to determine the serological compatibility of donor and recipient blood. This procedure is used to detect possible antibodies against the donor's erythrocytes, thereby reducing the risk of immunological transfusion reactions. Various methods are available for cross-matching: In addition to the tube agglutination method, which is often viewed as a reference method, gel and immunchromatographic methods are available.

In this study, a gel tube method, an antiglobulin-enhanced gel tube method, and an immunchromatographic method were evaluated in comparison to the tube agglutination method in 28 different major cross-matches. The evaluation resulted in 85,7 % agreement between the antiglobulin-enhanced gel tube method, in 60,7 % agreement between the gel tube method and in 35,7 % agreement between the immunchromatographic method and the tube agglutination method. Considering the macroscopically positive test results alone, the agreement between the tube agglutination method and the antiglobulin-enhanced gel tube method was 100 %, the gel tube method 62,5 % and with the immunchromatographic 0 %.

Using the antiglobulin-enhanced gel tube method, 4/9 weakly positive cross-matches, which were positive with a microscopic degree of agglutination of 1+ – 2+ using the tube agglutination method, were compatible. In all other cross-matches with a higher degree of agglutination, the results were consistent with those of the tube agglutination method. Transfusion of incompatible blood products may result in hemolytic transfusion reactions. However, the clinical relevance of microscopically weakly positive cross-matches is unclear. The application of the various test kits took significantly less time compared to the tube agglutination procedure. Due to the strong agreement and reduction in required time, the antiglobulin-enhanced gel tube method offers a good alternative to the reference method, especially in emergency situations. On the other hand, there was only a weak agreement between the gel tube and no agreement between the immunchromatographic method and the reference method.

<https://doi.org/10.17236/sat00345>

Eingereicht: 28.05.2024  
Angenommen: 24.08.2024

Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhren-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter, C. Weingart, N. Merten, N. Bock, B. Kohn

einstimmung und der Zeitersparnis bietet das durch Antiglobuline verstärkte Gel-Röhren-Verfahren besonders in Notfall-Situationen eine gute Alternative zur Referenzmethode. Hingegen lag lediglich eine schwache Übereinstimmung des Gel-Röhren- und keine Übereinstimmung des immunchromatographischen Verfahrens mit der Referenzmethode vor.

**Keywords:** Canine transfusion medicine, compatibility testing, method comparison

**Schlüsselwörter:** Canine Transfusionsmedizin, Kompatibilitätstestung, Methodenvergleich

## Einleitung

Die Transfusionsmedizin stellt sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin einen wichtigen Teil der Intensiv- und Notfallmedizin dar. Um das Risiko für immunologische Transfusionsreaktionen zu reduzieren, wird die Durchführung von Kreuzproben angeraten.<sup>17,19</sup> Dieses Verfahren dient der Kompatibilitätstestung und ermöglicht Antikörper gegen Antigene der Spendererythrozyten zu detektieren. Für die Durchführung von Kreuzproben stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, welche bereits in mehreren Studien vergleichend untersucht wurden. Bei der Durchführung von Kreuzproben gilt das Röhren-Agglutinationsverfahren (RA) als Referenzmethode.<sup>5</sup> In der Literatur sind verschiedene Protokolle beschrieben.<sup>2,12,15,18,21</sup> Ein Standard für die Durchführung ist bisher nicht festgelegt, jedoch folgen alle Protokolle dem folgenden Prinzip: Das Vollblut von Spender und Empfänger wird jeweils durch Zentrifugation in Erythrozytenkonzentrat und Plasma aufgetrennt. Das Erythrozytenkonzentrat wird in einem dreimaligen Waschvorgang mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung) gewaschen, um möglicherweise vorhandene Antikörper von den Erythrozyten zu entfernen. Nachfolgend wird das Erythrozytenkonzentrat auf eine 3–5%ige Lösung verdünnt. Anschliessend werden für die Major-Probe Spender-Erythrozytenkonzentrat-Lösung und Empfänger-Plasma und für die Minor-Probe Empfänger-Erythrozytenkonzentrat-Lösung und Spender-Plasma vermischt, inkubiert und auf Hämolyse und sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch auf Agglutination kontrolliert. Da Hunde keine klinisch relevanten natürlichen Alloantikörper besitzen<sup>9</sup> und lediglich noch nie zuvor transfundierte Hunde für eine Blutspende zugelassen sind, wird beim Hund routinemässig keine Minor-Kreuzprobe, sondern lediglich eine Major-Kreuzprobe durchgeführt.<sup>5</sup> Zusätzlich wird eine Empfängerkontrolle durchgeführt, um Alloantikörper gegen körpereigene Erythrozyten ausschliessen zu können. Die Sensitivität dieses Verfahrens variiert je nach angewandtem Protokoll.<sup>4</sup> Jedoch wurden in einer Studie auch bei vergleichbarem Versuchsprotokoll abweichende Ergebnisse bei Durchführung durch zwei unterschiedliche Laboratorien festgestellt.<sup>23</sup>

Alternativ steht das Gel-Röhren-(GR)-Verfahren zur Verfügung, bei dem Erythrozyten-Konzentrat und Plasma nach Inkubation auf ein Dextran-Acrylamid-Gel gegeben wer-

den. Durch Zentrifugation sinken ungebundene Erythrozyten durch das Gel auf den Boden des Röhrens, während agglutinierte Erythrozyten im Gel sichtbar sind. Dieses Verfahren steht auch als kommerzielles Test-Kit zur Verfügung. Vorteile sind die objektivere Auswertung und die Beständigkeit der Ergebnisse. In bisherigen Studien konnte eine weitgehende Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen des RA-Verfahrens bestätigt werden.<sup>2,18,21</sup> Allerdings wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Sensitivität bei geringgradiger Ausprägung der Agglutination deutlich herabgesetzt ist. In einer Studie, in welcher 80 Kreuzproben vergleichend durchgeführt wurden, stimmten alle Ergebnisse der Major-Kreuzproben (Agglutinationsgrad 3+ – 4+) überein, jedoch wurde mit dem RA-Verfahren bei 8 Minor-Proben eine Inkompatibilität detektiert (Agglutinationsgrad 1+), während diese Proben mit dem GR-Verfahren kompatibel waren.<sup>2</sup> Ähnliche Ergebnisse wurden auch in einer Studie, in welcher ein Vergleich verschiedener Kreuzproben mit Seren, die Antikörper in verschiedenen Verdünnungsstufen enthielten, deutlich. Dabei konnte eine Übereinstimmung des GR- mit dem RA-Verfahren bei einer Verdünnung von 1:10 und 1:400, jedoch eine sinkende Sensitivität der GR-Methode bei niedrigerer Antikörperkonzentration ab einer Verdünnung von 1:1600 festgestellt werden.<sup>21</sup> Während eines weiteren Vergleichs dieser beiden Testverfahren wurden nur 35% der Kreuzproben mit dem RA-Verfahren als inkompatibel bewertet, während mit dem Gel-Verfahren alle Kreuzproben kompatibel waren.<sup>12</sup> Eine höhere Sensitivität des RA-Verfahrens im Vergleich zur Gel-Methode wurde auch in einer weiteren Studie nachgewiesen.<sup>15</sup> Des Weiteren konnte teilweise eine geringere Spezifität der GR-Methode im Vergleich zum RA-Verfahren nachgewiesen werden: In zwei Studien wurden teilweise (bei 1,4% bzw. bei 3,7% der durchgeführten Kreuzproben) falsch-positive Ergebnisse im Vergleich zum RA-Verfahren beschrieben.<sup>15,21</sup>

In den letzten Jahren wurden mehrere Methoden entwickelt, um Kreuzprobenreaktionen zu verstärken. So erleichtert der Zusatz von Enhancern, wie das LISS-Reagenz, die Bindung von Antikörpern und dadurch die Agglutination.<sup>13</sup> Zusätzlich lässt sich durch den Zusatz von Antiglobulinen die Sensitivität verstärken. Beide Methoden kommen in der Humanmedizin kombiniert als Tube-LISS-Indirekter-Antiglobulin-Test (tube LISS IAT) zum Einsatz. Dieser benö-

tigt durch den Zusatz von LISS-Reagenz und Antiglobulinen eine deutlich kürzere Inkubationszeit und bietet ein ebenso hohes oder sogar höheres Mass an Spezifität und Sensitivität.<sup>6,7</sup> Vergleichbare Methoden wurden bereits in mehreren veterinärmedizinischen Studien getestet.<sup>9,11,15</sup> Im Vergleich zum konventionellem RA- und auch im Vergleich zur GR-Methode konnte durch den Zusatz von Antiglobulinen eine Steigerung der Sensitivität erreicht werden.<sup>9,15</sup> Daneben ist die Kompatibilitätstestung mittels eines immunchromatographischen Verfahrens (ICS) möglich. Das ICS-Assay besteht aus einem Teststreifen, welcher mit anticaninen Antiglobulinen benetzt ist und sowohl IgG, IgM und Komplement C3 detektiert. Die Bindung wird durch einen roten Farbstreifen sichtbar und zeigt die Inkompatibilität der Proben an. Auch dieses Verfahren wurde bereits in mehreren Studien evaluiert: Während zweier Evaluierungen war eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse mit denen eines durch Antiglobuline verstärkten Gel-Testverfahrens (AGR) zu verzeichnen.<sup>9,11</sup> Dennoch wurde in einer weiteren Studie im Jahre 2018, bei der drei verschiedene Kreuzprobenverfahren auf die Erfassung von DEA 7-Antikörpern bei 40 DEA 7 negativen Hunden getestet wurden, eine deutliche Abweichung der Ergebnisse festgestellt: Während sowohl mit dem GR- als auch mit dem RA-Verfahren 21 Kreuzproben positiv ausfielen, wurde mit dem ICS-Verfahren nur ein inkompatibles Kreuzprobenpaar detektiert.<sup>18</sup> Auch in einer weiteren vergleichenden Studie wurden lediglich 2,1 % der Kreuzproben mit dem ICS-Assay als inkompatibel ausgewertet, während mit dem RA-Verfahren 18,3 % der Kreuzproben positiv ausfielen.<sup>15</sup> Darüber hinaus war die Übereinstimmung der Ergebnisse des ICS- mit dem RA-Verfahren auch in einer weiteren Studie lediglich gering.<sup>23</sup> Das AGR-Verfahren wurde in der Literatur bisher lediglich im Vergleich zum ICS-Verfahren aber nicht zum RA-Verfahren evaluiert und beschrieben.

Ziel dieser Studie war es, verschiedene kommerziell erhältliche Kreuzproben-Testkits im Vergleich zum RA-Verfahren auf Übereinstimmung der Ergebnisse sowie deren Praxis-tauglichkeit bei der Durchführung von Major-Kreuzproben beim Hund zu untersuchen.

## Material und Methoden

### Probenmaterial

Für die Evaluation verschiedener Kreuzprobenmethoden im Vergleich zum RA-Verfahren wurden Blutproben jeweils eines Spenders und eines Empfängers benötigt. Als Empfänger-Blutproben dienten EDTA-Blutproben von gesunden Hunden, welche im Rahmen einer Blutspende-Voruntersuchung entnommen wurden, von Hunden, welche eine Bluttransfusion benötigten und von Hunden, welche bereits eine Bluttransfusion erhalten hatten und deren Blutbild kontrolliert wurde. Es wurden lediglich Reste von zu diagnostischen Zwecken entnommenen Proben verwendet. Die

Einwilligung der Patientenbesitzer zur Verwendung von Probenresten zu wissenschaftlichen Zwecken wurde routinemässig bei der Patientenannahme eingeholt. Als Spenderblutproben dienten Proben der Blutkonserven. Die Entnahme erfolgte über eine sterile Spritze mit einer 20G-Kanüle entweder während der Herstellung des Erythrozytenkonzentrats oder direkt vor der Transfusion. Die Spenderblutproben wurden in einem Röhrchen ohne Zusatz eines weiteren Antikoagulanz bei 4°C bis zur Durchführung der Kreuzproben (bis zu 6 Wochen) gelagert.

### Kreuzproben

Der Vergleich der verschiedenen Kreuzproben-Methoden erfolgte an 28 Major-Kreuzproben, welche zuvor durch das konventionelle RA-Verfahren getestet wurden. Die Proben wurden mit folgender Verteilung der Kreuzprobenergebnisse, bezogen auf das RA-Verfahren, ausgewählt: Zehn negative Kreuzproben, zehn nur mikroskopisch positive Kreuzproben gleichmässig verteilt auf die verschiedenen Agglutinationsgrade 1+ – 3+ und 8 makroskopisch positive Kreuzproben gleichmässig verteilt auf die verschiedenen Agglutinationsgrade 1+ – 2+. Kreuzproben mit einer positiven Empfängerkontrolle (Agglutinationsgrad > 1+) wurden ausgeschlossen. Alle Proben wurden zusätzlich zum konventionellem RA-Verfahren mit einem kommerziellen Gel-Röhrchen-Test (RapidVet-H-Major Crossmatch, DMS Laboratories, Flemington, New Jersey), einem durch Antiglobuline verstärkten Gel-Röhrchen-Verfahren (Gel Test Major Canine Crossmatch, Alvedia, Limonest, France), sowie einem immunchromatographischen Verfahren (Lab-Test Crossmatch Canine, Alvedia, Limonest, France) durchgeführt. Die Durchführung der Testkits erfolgte nach Herstellerangaben. Zusätzlich wurde die Zeit gemessen, welche für die Durchführung der Kreuzproben benötigt wurde. Um die Stabilität der Ergebnisse beurteilen zu können, wurden die Test-Ergebnisse sowohl sofort sowie am Folgetag abgelesen.

Die Durchführung erfolgte immer von derselben Person. Die Ergebnisse wurden fotografisch dokumentiert und von einer zweiten Person, geblindet zu den Ergebnissen der durchführenden Person, ausgewertet.

### Röhrchen-Agglutinationsverfahren

Die Durchführung des RA-Verfahrens erfolgte wie in der bisherigen Literatur beschrieben.<sup>2</sup> Für die Durchführung wurden je 200 µl Vollblut vom Empfänger sowie 100 µl Erythrozytenkonzentrat vom Spender verwendet. Neben jeder Major-Kreuzprobe wurde auch eine Empfängerkontrolle durchgeführt. Empfänger-Vollblut und Spender-Erythrozytenkonzentrat wurden bei 385 × g (Zentrifuge: Häma Pico 17; Heraeus; Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) für 2 Minuten zentrifugiert. Das Empfänger-Plasma wurde abpipettiert, auf Anzeichen von Hämolyse untersucht und in einem weiteren Röhrchen für die Kreuzprobe verwahrt. Spender- und Empfänger-Erythrozytenkonzentrat wurden

Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter, C. Weingart, N. Merten, N. Bock, B. Kohn

Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhren-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter, C. Weingart, N. Merten, N. Bock, B. Kohn

je dreimal gewaschen. Dafür wurde dem Erythrozytenkonzentrat 500 µl PBS-Lösung (Roti®Cell PBS, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) zugesetzt und erneut bei 385 × g für 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und der Vorgang wurde zweimal wiederholt. Zur Herstellung einer 3–5%igen Erythrozytenkonzentrat-Lösung wurden 500 µl PBS mit 20 µl Erythrozytenkonzentrat vermischt. Für die Major-Kreuzprobe wurden 2 Tropfen (50 µl) des Empfängerplasmas mit 1 Tropfen (25 µl) der Spender-Erythrozytenkonzentrat-Lösung vermischt. Zur Herstellung der Empfängerkontrolle wurden 2 Tropfen (50 µl) des Empfängerplasmas mit 1 Tropfen (25 µl) der Empfänger-Erythrozytenkonzentrat-Lösung vermischt (Abbildung 1). Die Probenröhrchen wurden anschliessend mit Parafilm verschlossen und für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden die Kreuzproben-Röhrchen zentrifugiert (15 s bei 100 × g [Zentrifuge: Hettich Eba 20, Hettich, Tuttlingen, Deutschland]). Zur makroskopischen Beurteilung wurde zunächst der Überstand auf Hämolyse untersucht. Der Grad der Hämolyse wurde mit 0 – ++++ (0 = Plasma erscheint nahezu transparent, (+) = Plasma erscheint leicht verfärbt, + = Plasma ist leicht rötlich, ++ = Plasma ist rötlich, +++ = Farbe des Plasmas nahezu identisch mit Farbe der Erythrozyten, ++++ = Farbe des Plasmas und der Erythrozyten kann nicht mehr differenziert werden) beurteilt. Nachfolgend wurde die Probe durch Tippen gegen das Röhrchen resuspendiert. Ein Tropfen dieser Probe wurde auf einem Objektträger untersucht. Der Grad der makroskopischen Agglutination wurde mit 0 – +++ (0 = keine, + = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig) beurteilt. Bei der anschliessenden mikroskopischen Beurteilung

wurde die Probe innerhalb von 60 Sekunden zunächst bei einer 100-fachen und schliesslich bei einer 500-fachen Vergrößerung auf Erythrozyten-Agglutination untersucht. Der Grad der Agglutination wurde hier mit 0 – ++++ (0 = keine Agglutination, + = viele feine Agglutinate, ++ = mehrere grosse und kleine Agglutinate, +++ = mehrere grosse Agglutinate, ++++ = 1–2 grosse Agglutinate) beschrieben. Eine Kreuzprobe galt bei einem mikroskopischen Agglutinationsgrad von ≥ 1+ als positiv.

### Kreuzproben-Test-Kits

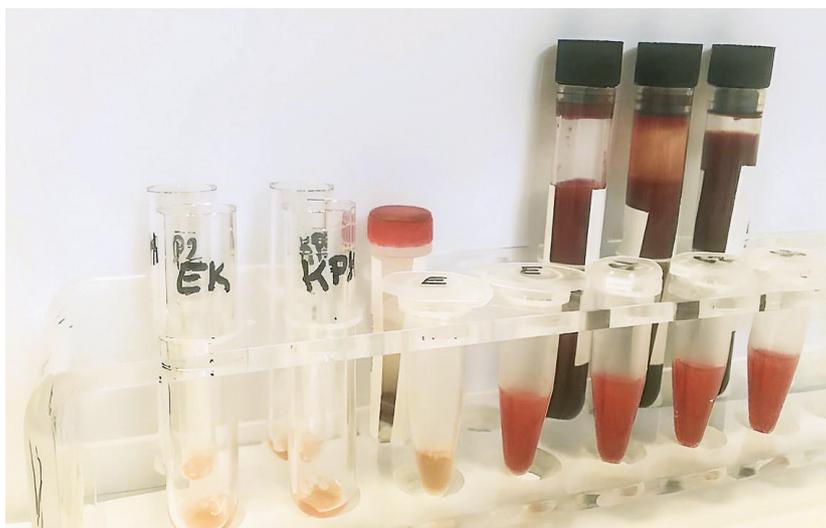
Insgesamt wurden 1 ml Empfänger-Vollblut und 100 µl Spender-Erythrozytenkonzentrat benötigt. Zur Separierung des Empfänger-Plasmas wurde das Vollblut bei 1000 × g (Hettich Eba 270; Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für 5 Minuten zentrifugiert.

### Gel-Röhren Verfahren (GR) (RapidVet-H-Major Crossmatch®, DMS Laboratories, Flemington, New Jersey)

Zur Durchführung der Kreuzprobe wurden 200 µl Empfänger-Plasma in das Reaktions-Röhrchen und 50 µl Spender-Erythrozytenkonzentrat in das Präparier-Röhrchen mit einer NaCl-Lösung, speziell für den Gebrauch für immunohämatologische Testverfahren, pipettiert. Anschliessend wurden je 100 µl aus dem Präparier-Röhrchen in ein Röhrchen für die Positiv-Kontrolle mit einem Lektin-Gemisch, in ein Röhrchen für die Negativ-Kontrolle mit einer NaCl-Lösung, speziell für den Gebrauch für immunohämatologische Testverfahren, sowie in das Reaktions-Röhrchen pipettiert. Nach einer Inkubation von fünf Minuten bei Raumtemperatur wurden je 50 µl aus jedem Röhrchen in das dazugehörige Gel-Röhrchen pipettiert. Anschliessend wurden die Test-Röhrchen bei 900 × g (Zentrifuge: Häma Pico 17; Heraeus; Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) für 8 Minuten zentrifugiert. Agglutinierende Erythrozyten sinken nicht durch das Gel zum Boden, sind innerhalb des Gels sichtbar und zeigen so ein inkompatibles Testergebnis an, ungebundene Erythrozyten sinken bis zum Boden des Röhrchens und zeigen so ein kompatibles Testergebnis an.

### Antiglobulin verstärktes Gel-Röhren Verfahren (AGR) (Gel Test Major Canine Crossmatch®, Alvedia, Limonest, France)

Zur Vorbereitung wurden die Gel-Tests (Gel tube + Gel support) für 2 Minuten bei 1000 × g zentrifugiert. Daraufhin wurde 1 ml einer ionenarmen Kochsalzlösung (LISS Reagenz) als Pufferlösung in ein Teströhrchen gefüllt und 10 µl Spender-Erythrozytenkonzentrat hinzugegeben. Von dieser Erythrozyten-Lösung wurden nun 50 µl in einem zweiten Teströhrchen mit 25 µl Empfänger-Plasma vermischt und bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Anschliessend wurden 30 µl der Suspension in das Gel-Test-Röhrchen pipettiert und bei 2000 × g für zehn Minuten zentrifugiert (spezielle Zentrifuge: Hettich Eba 270; Tuttlingen, Deutschland). Agglutinierende Erythro-



**Abbildung 1:** Durchführung von Kreuzproben mit dem Röhren-Agglutinationsverfahren; Vordere Reihe von links: Röhrchen (R) 1: Empfängerkontrolle, R 2; erste Kreuzprobe, R 3; Empfänger-Plasma, R 4; Erythrozytenkonzentrat-Lösung von Empfänger und R 5–7: diversen möglichen Spendern, hintere Reihe von links: R 1; zweite und R 2; dritte Kreuzprobe, R 3; Empfänger-Erythrozytenkonzentrat, R 4–6: Erythrozytenkonzentrat diverser Spender.

zyten sinken nicht durch das Gel zum Boden und werden innerhalb des Gels sichtbar. Je nach Lage der Erythrozyten im Gel ist eine Einteilung in verschiedene Agglutinationsgrade 1+ – 4+ möglich. Alle Ergebnisse  $\geq 1+$  zeigen eine inkompatible Kreuzprobe an.

#### Immunchromatographisches Verfahren (ICS) (Lab-Test Crossmatch Canine®, Alvedia, Limonest, France)

Zunächst wurden vier Tropfen der ersten Pufferlösung, eine ionenarme Kochsalzlösung (LISS Reagenz) in das Teströhrchen gegeben und mit 10  $\mu$ l Spender-Erythrozytenkonzentrat vermischt. Anschliessend wurden 120  $\mu$ l Empfängerplasma hinzugegeben und mit der Erythrozytenkonzentrat-Lösung vermischt. Die Lösung wurde für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend erfolgte ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS: Dafür wurden jeweils 3 ml PBS mit der Lösung vermischt und bei 1000  $\times$  g (Hettich Eba 20; Tuttlingen, Deutschland) für 2 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Nach drei Waschvorgängen wurden drei Tropfen einer zweiten Pufferlösung, eine Verdünnungslösung, welche in den Testkits enthalten ist, dem Sediment zugeführt und mit diesem vermischt. Nun konnte der Kreuzproben-Streifen in die Suspension gestellt werden. Nach bis zu zehn Minuten wird neben einem roten Kontrollstreifen eine Inkompatibilität als rote Test-Linie sichtbar.

#### Statistische Analysen

Die statistische Auswertung erfolgte über IBM SPSS Statistics 27 (IBM Corp. Released 2020. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 27.0. Armonk, NY: IBM Corp). Das Mass der Übereinstimmung der Ergebnisse der verschiedenen Kreuzproben Verfahren gegenüber dem RA-Verfahren wurde mit Cohens Kappa bestimmt. Mögliche Abweichungen wurden mit dem McNemar-Test ausgewertet. Zur Berechnung der Spezifität und Sensitivität wurde das RA-Verfahren als ausgewählte Vergleichsmethode verwendet. Als signifikant wurden alle Werte  $p \leq 0,05$  angesehen.

Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter, C. Weingart, N. Merten, N. Bock, B. Kohn

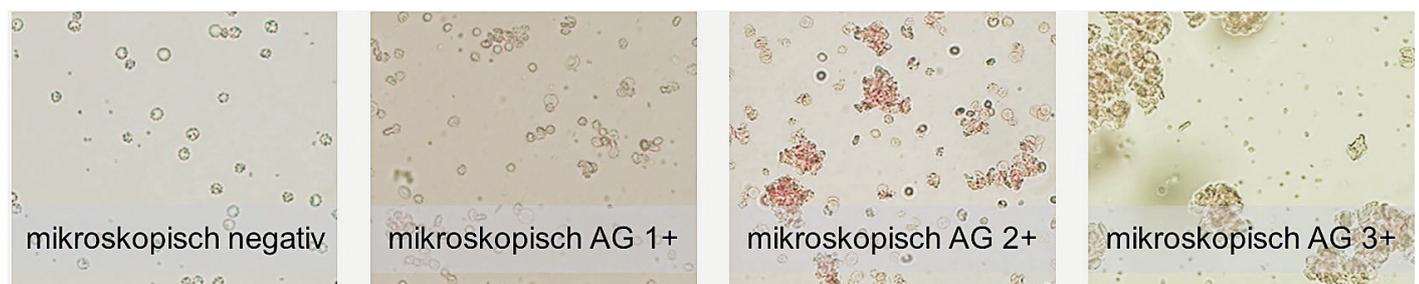
#### Ergebnisse

##### Röhrchen-Agglutinationsverfahren (Referenzmethode)

Mit dem RA-Verfahren waren insgesamt 10 Kreuzproben kompatibel und 18 Kreuzproben inkompatibel. Hämolyse trat nicht auf. Die Verteilung der Agglutinationsgrade war wie folgt: makroskopischer AG 1+ (n=3), 2+ (n=5) (Abbildung 2); nur mikroskopischer AG 1+ (n=5), 2+ (n=4), 3+ (n=1) (Abbildung 3). Die mikroskopischen Agglutinationsgrade der insgesamt 18 positiven Kreuzproben waren wie folgt: AG 1+ (n=5), AG 2+ (n=5), AG 3+ (n=8). Bei fünf Kreuzproben (makr. AG 2+ – 3+, mikr. AG 3+), war die



**Abbildung 2:** Makroskopische Auswertung von Kreuzproben mit dem Röhrchen-Agglutinationsverfahren: negativ und positiv mit makroskopischen Agglutinationsgraden (AG) 1+ – 2+



**Abbildung 3:** Mikroskopische Auswertung von Kreuzproben mit dem Röhrchen-Agglutinationsverfahren: negativ und positiv mit mikroskopischen Agglutinationsgraden (AG) 1+ – 3+

Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhren-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter, C. Weingart, N. Merten, N. Bock, B. Kohn

dazugehörige Empfängerkontrolle mikroskopisch schwach positiv (mikr. AG 1+). Die Durchführung beanspruchte 30 – 43 Minuten (Median 36). Die Ergebnisse waren bei keiner Probe stabil und am Folgetag auswertbar.

### Gel-Röhren Verfahren (GR)

Mit dem GR-Verfahren waren 19 Kreuzproben kompatibel, neun waren inkompatibel (Abbildung 4). Eine Kreuzprobe war verglichen mit dem RA-Verfahren falsch positiv. Die Spezifität lag bei 90 % (95 % Konfidenzintervall 60 % – 98 %). Bei drei von zehn Kreuzproben, welche mit dem RA-Verfahren lediglich eine mikroskopische Agglutination zeigten, wurde mit dem GR-Verfahren ebenfalls eine Inkompatibilität nachgewiesen. Zudem waren fünf von acht Proben (62,5 %), bei denen mit dem RA-Verfahren bereits makroskopisch eine Agglutination sichtbar war, mit der GR-Methode inkompatibel (Tabelle 1). Die Sensitivität lag bei 44 % (95 % Konfidenzintervall 25 % – 66 %). Insgesamt wurde bei 17/28 Proben (60,7 %) eine Übereinstimmung der Ergebnisse festgestellt ( $k=0,29$ ,  $p=0,06$ ). Die Abweichung der Ergebnisse des GR-Verfahrens zu denen des RA-Verfahrens war signifikant ( $p=0,01$ ). Die Durchführung des GR-Tests war sehr einfach und beanspruchte lediglich 14 – 17 Minuten (Median 17). Jedoch war die Auswertung bei drei Proben erschwert. Nach weiterer Beratung durch

den Hersteller wurden diese Proben als inkompatibel gewertet. Die Ergebnisse blieben bei 26/28 Proben über mindestens 24 Stunden stabil.

### Durch Antiglobuline verstärktes Gel-Röhren Verfahren (AGR)

Durch das AGR-Verfahren wurde bei 14 Kreuzproben eine Inkompatibilität (AG 1+ [n=6], AG 2+ [n=3], AG 3+ [n=4], AG 4+ [n=1]) festgestellt, 14 Kreuzproben waren kompatibel (Abbildung 5). Bei allen Proben, welche mit dem RA-Verfahren kompatibel waren, wurde auch mit dem AGR-Verfahren eine kompatible Kreuzprobe angezeigt. Es wurde eine Spezifität von 100 % erreicht (95 % Konfidenzintervall 72 % – 100 %). Von 10 Proben, welche mit dem RA-Verfahren lediglich eine mikroskopische Agglutination aufwiesen, wurden sechs Proben (AG 1+ [n=2/5], AG 2+ [n=3/4], AG 3+ [n=1/1]) mit dem AGR-Verfahren als inkompatibel bewertet. Zudem waren bei jeder Probe, welche mit dem RA-Verfahren makroskopisch inkompatibel war, auch Agglutinate im Gel sichtbar (Tabelle 1). Die Sensitivität lag insgesamt bei 77 % (95 % Konfidenzintervall 54 % – 91 %). Die Ausprägung der Ergebnisse war in zehn Fällen geringer, in 17 Fällen identisch und in einem Fall stärker ausgeprägt als die mikroskopische Auswertung mit dem RA-Verfahren. Insgesamt stimmten 85,7 % der Ergebnisse bei diesem Ver-

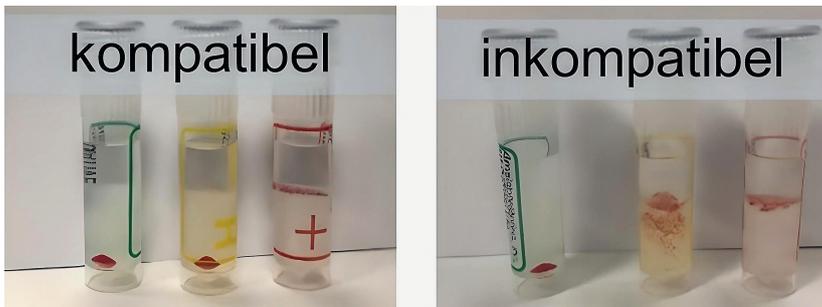


Abbildung 4: Kreuzprobenergebnisse mit dem Gel-Röhren Verfahren: kompatibel und inkompatibel.



Abbildung 5: Kreuzprobenergebnisse mit dem durch Antiglobuline verstärktem Gel-Röhren-Verfahren: negativ und positiv (Grad 1+ – 4+); Agglutinierende Erythrozyten sinken nicht durch das Gel zum Boden und werden innerhalb des Gels sichtbar. Je nach Lage der Erythrozyten im Gel ist eine Einteilung in verschiedene Agglutinationsgrade möglich: Grad 1+: Erythrozyten sind hauptsächlich am Boden sichtbar, wenige Agglutinate verteilen sich innerhalb des Gels; Grad 2+: Erythrozytenagglutinate verteilen sich innerhalb des Gels; Grad 3+: Erythrozytenagglutinate sinken nur teilweise durch das Gel; Grad 4+ Erythrozytenagglutinate passieren das Gel nicht und bilden oberhalb des Gels eine Linie.

fahren mit denen des RA-Verfahrens überein. Im Vergleich zeigte dieses Verfahren eine starke Übereinstimmung ( $k=0,71$ ,  $p<0,01$ ). Die Durchführung war sehr einfach und beanspruchte 21 – 23 Minuten (Median 22,5). Die Auswertung war in einem Grossteil der Proben eindeutig. Lediglich zwei Proben waren fraglich schwach inkompatibel und wurden nach Beratung durch den Hersteller als inkompatibel (AG 1+) gewertet. Bei allen Proben waren die Ergebnisse mindestens über 24 Stunden stabil.

### Immunchromatographisches Verfahren (ICS)

Mit dem ICS-Verfahren waren alle Proben kompatibel (Abbildung 6). Nur bei den Kreuzproben, welche mit dem RA-Verfahren kompatibel waren, stimmten die Ergebnisse überein (Tabelle 1). Dies war bei 10/28 Proben (37,5%) zutreffend. Die Spezifität lag bei 100% (95% Konfidenzintervall 72% – 100%). Die Sensitivität lag bei 0% (95% Konfidenzintervall 0% – 0,18). Die Cohens-Kappa-Analyse war bei diesem Verfahren nicht signifikant ( $k=0,00$ ,  $p=1,00$ ). Die Durchführung des McNemar-Tests war aufgrund der Probenverteilung nicht möglich. Das Ergebnis war bei einer Probe nicht eindeutig. Auf Grundlage einer Beratung durch den Hersteller wurde diese Probe als kompatibel gewertet. Auch bei diesem Testverfahren waren die Ergebnisse über mindestens 24 Stunden stabil. Die Durchführung war durch den Waschvorgang aufwendiger und beanspruchte 29 – 36 Minuten (M 30,5).

## Diskussion

In dieser Studie wurden verschiedene kommerziell erhältliche Kreuzproben-Testkits im Vergleich zum RA-Verfahren auf Übereinstimmung der Ergebnisse sowie deren Praxis-tauglichkeit bei der Durchführung von Major-Kreuzproben beim Hund untersucht. Die in dieser Studie verwendeten Verfahren wurden bereits in mehreren Studien angewandt und beschrieben,<sup>7,12,15,18,21</sup> jedoch wurde bisher kein Standardverfahren für die Veterinärmedizin festgelegt.<sup>5</sup> Während der Evaluation wurde eine deutliche Übereinstimmung des AGR-Verfahrens mit 85,7%, jedoch lediglich eine schwache Übereinstimmung des GR-Verfahrens mit 60,7% und keine Übereinstimmung des ICS-Verfahrens mit 35,7% mit dem RA-Verfahren festgestellt.

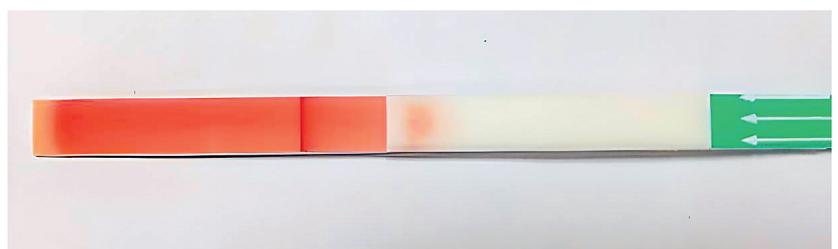
Da das RA-Verfahren nach wie vor als Referenzmethode gilt, wurde dieses Verfahren als Vergleichsmethode ausgewählt. Auch in anderen vergleichenden Studien wies dieses Verfahren eine sehr gute Sensitivität auf.<sup>2,12,15,18,21</sup> Jedoch kann es auch zu fehlerhaften Ergebnissen kommen. So könnte Rouleaux-Bildung oder ungenügendes Waschen der Erythrozyten in falsch-positiven Ergebnissen und zu starkes Verdünnen der Erythrozyten oder Zerstörung fragiler Aggregate durch zu starkes Tippen gegen das Röhrchen in falsch-negativen Ergebnissen resultieren.<sup>1</sup> Weiterhin werden

für dieses Verfahren unterschiedliche Protokolle beschrieben, welche teilweise lediglich eine direkte Zentrifugation, eine Inkubation bei Raumtemperatur, eine Inkubation bei 37°C, den Zusatz von Albumin oder auch von Antiglobulinen beinhalten. Auf diese Weise variieren Sensitivität und Spezifität je nach angewandtem Protokoll.<sup>4</sup> Jedoch wurde in einer Studie, bei der die Ergebnisse zweier RA-Verfahren verglichen wurden, auch bei Verwendung einer ähnlichen Methode durch zwei unterschiedliche Laboratorien lediglich eine schlechte Übereinstimmung der Ergebnisse festgestellt.<sup>23</sup> Daraus lässt sich folgern, dass die Ergebnisse dieser Methode durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden können und die Auswertung einer gewissen Subjektivität unterliegt. Um die Fehlerquelle möglichst gering zu halten, wurden Kreuzproben in dieser Studie immer von derselben Person durchgeführt und die Auswertung wurde zudem durch eine zweite Person, geblendet zu den Ergebnissen der durchführenden Person, reevaluiert.

Bei fünf Kreuzproben (makr. AG 2+ – 3+, mikr. AG 3+) war die dazugehörige Empfängerkontrolle bei Durchführung des RA-Verfahrens mikroskopisch schwach positiv (mikr. AG 1+). Aufgrund der schwachen Ausprägung dieser Reaktion wurden diese Kreuzproben nicht aus der Vergleichsuntersuchung ausgeschlossen. Jedoch ist der Einfluss einer positiven Empfängerkontrolle auf das Ergebnis der Kreuzprobe insbesondere in Bezug auf die verschiedenen Kreuzproben-Verfahren bisher noch unklar.

Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter, C. Weingart, N. Merten, N. Bock, B. Kohn



**Abbildung 6:** Kreuzprobenergebnis mit dem immunchromatographischen Verfahren: kompatibel; im positiven Fall wird neben einem roten Kontrollstreifen eine Inkompatibilität als rote Test-Linie sichtbar, in dieser Abbildung ist lediglich der rote Kontrollstreifen sichtbar.

**Tabelle 1:** Übereinstimmung verschiedener Kreuzproben Methoden (Gel-Röhrchen Verfahren [GR], Antiglobulin verstärktes Gel-Röhrchen Verfahren [AGR] und immunchromatographisches Verfahren [ICS]) im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren.

	GR	AGR	ICS
<b>Negativ</b>	9/10 (90%)	10/10 (100%)	10/10 (100%)
<b>Mikroskopisch positiv</b>	3/10 (30%)	6/10 (60%)	0/10 (0%)
<b>Makroskopisch positiv</b>	5/8 (62,5%)	8/8 (100%)	0/8 (0%)
<b>Gesamtheit</b>	17/28 (60,7%)	24/28 (85,7%)	10/28 (35,7%)

Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter, C. Weingart, N. Merten, N. Bock, B. Kohn

Das konventionelle Gel-Verfahren ohne Verstärkung durch Antiglobuline, welches als Labormethode sowie auch als Testkit durchgeführt werden kann, weist laut mehreren Studien eine vergleichbare Sensitivität und Spezifität wie das RA-Verfahren auf.<sup>2,14,18</sup> In einer Studie bei Katzen wurden mehrere Kreuzproben aufgrund von Rouleaux-Bildung mit einem konventionellen GR-Verfahren falsch-positiv ausgewertet.<sup>16</sup> In anderen Untersuchungen wurde vermutet, dass diese Methode lediglich starke Agglutination anzeigt und feine Agglutinate durch die Gel-Matrix bis zum Boden des Gel-Röhrchens absinken.<sup>2,12,15,21</sup> In dieser Studie wurde das GR-Verfahren als Test-Kit angewandt. Eine Inkompatibilität wurde bei 30 % der nur mikroskopisch und bei 62,5 % der makroskopisch positiven Kreuzproben festgestellt. Die Übereinstimmung war insgesamt lediglich schwach ( $k=0,29$ ,  $p=0,06$ ). Das angewandte Test-Kit wurde bereits in mehreren vergleichenden Studien eingesetzt: In einer Untersuchung wurden zwar übereinstimmende Ergebnisse von GR- und RA-Verfahren bei hoher Antikörperkonzentration, jedoch eine sinkende Sensitivität bei niedriger Antikörperkonzentration ab einer Verdünnung von 1:1600 festgestellt.<sup>21</sup> In zwei weiteren Studien, in denen dieses Verfahren im Vergleich zum RA-Verfahren getestet wurde, wurden keine der mit dem RA-Verfahren als inkompatibel gewerteten Kreuzproben detektiert.<sup>12,15</sup> Jedoch wurden teilweise (in 1,42 – 3,73 % der durchgeführten Kreuzproben) falsch-positive Ergebnisse im Vergleich zum RA-Verfahren beschrieben.<sup>15,21</sup> Auch in der vorliegenden Evaluierung war eine Kreuzprobe mit dem GR-Verfahren inkompatibel, während das RA-Verfahren ein kompatibles Ergebnis anzeigte.

Durch den Zusatz von Antiglobulinen (Coombs'-Reagenz) könnte die Sensitivität des Testverfahrens verstärkt werden.<sup>8,15</sup> Die Verstärkung durch den Zusatz von Antiglobulinen kann bei verschiedenen Verfahren angewandt werden. Neben der Verstärkung des RA-Verfahrens oder der GR-Methode kann ein durch Antiglobuline verstärktes immunchromatographisches (ICS) Verfahren Anwendung finden.

Obgleich in verschiedenen vergleichenden Evaluationen übereinstimmende Ergebnisse mit dem AGR-Verfahren erzielt wurden,<sup>9,11</sup> wies das ICS-Verfahren in mehreren Studien jedoch lediglich eine Sensitivität von unter 50 % auf.<sup>15,18,23</sup> In unserer Studie wurde bei keiner Kreuzprobe eine Inkompatibilität mit dem ICS-Verfahren nachgewiesen.

Die AGR-Methode, welche ebenfalls als Labormethode sowie als Testkit Anwendung findet, wies in bisherigen Untersuchungen eine 100%ige Übereinstimmung mit dem ICS-Verfahren bei Verwendung eines Test Kits auf.<sup>9,11</sup> Es lag eine höhere Sensitivität im Vergleich zur konventionellen GR-Methode ohne Verstärkung durch Antiglobuline bei Anwendung der Labormethode (bei 27 % der Proben war

die Agglutination im Vergleich stärker) vor.<sup>8</sup> Im Vergleich zum RA-Verfahren wurde dieses Verfahren bisher noch nicht evaluiert. In unserer Studie wurde ein Testkit angewandt. Zwei von fünf Kreuzproben mit einem mikroskopischen Agglutinationsgrad von 1+, 3/4 Kreuzproben mit einem mikroskopischen Agglutinationsgrad von 2+ und alle Kreuzproben mit einem stärkeren Agglutinationsgrad wurden mit diesem Verfahren als inkompatibel erkannt. Insgesamt wurde so eine deutliche Übereinstimmung von 85,7 % mit dem RA-Verfahren ( $k=0,71$ ,  $p<0,01$ ) festgestellt.

35 % der Kreuzproben wiesen mit dem RA-Verfahren lediglich eine mikroskopisch sichtbare Agglutination auf. Die klinische Relevanz niedriger Antikörper-Titer ist unklar. Das Auftreten akuter Transfusionsreaktionen ist unwahrscheinlich, jedoch ist es möglich, dass auch die Transfusion einer schwach kreuzproben-inkompatiblen Blutkonserve den Transfuserfolg mindern könnte. Zudem könnte es zu einer Erhöhung des Antikörpertiters kommen, wodurch bei weiteren Transfusionen Komplikationen entstehen könnten. Empfänger mit sehr niedrigen Alloantikörperspiegeln könnten möglicherweise nicht sofort auf eine Transfusion reagieren, sondern die Alloantikörperproduktion nach der Transfusion hochregulieren.<sup>22</sup> Verzögerte Transfusionsreaktionen sind insbesondere aufgrund der Grunderkrankungen der Empfänger klinisch schwer nachzuweisen und könnten daher unbemerkt bleiben. Durch die Transfusion ausschliesslich kreuzprobenkompatibler Blutprodukte wurde ein höherer Transfuserfolg beschrieben.<sup>17</sup> Die Transfusion einer makroskopisch kreuzproben-inkompatiblen Blutkonserve kann das Auftreten einer akuten hämolytischen Transfusionsreaktion zur Folge haben und stellt somit ein hohes Risiko für den Patienten dar.<sup>3,10</sup> Aus diesem Grund ist besonders die korrekte Erfassung makroskopisch positiver Kreuzprobenergebnisse von klinischer Relevanz. Während durch die AGR-Methode 100 % der makroskopisch positiven Kreuzproben als inkompatibel detektiert wurden, erkannte die GR-Methode 62,5 % und das ICS-Verfahren keine der makroskopisch inkompatiblen Kreuzproben.

Falsch-positive Kreuzproben im Vergleich zur Referenzmethode traten in dieser Studie selten auf. Lediglich bei einer Probe, welche mit dem RA-Verfahren als kompatibel gewertet wurde, wurde mit dem GR-Verfahren eine inkompatible Kreuzprobe detektiert. Das Auftreten falsch-positiver Proben spielt eine untergeordnete Rolle für den Patienten, kann allerdings zur Einschränkung der Verfügbarkeit von Blutprodukten und somit zu einer Verzögerung der Transfusion führen.

Da Bluttransfusionen häufig in Notfallsituationen indiziert sind, bleibt häufig nicht genügend Zeit für eine umfassende Kompatibilitätstestung.<sup>20</sup> Aus diesem Grund ist es essenziell, dass praxistaugliche Verfahren verfügbar sind, welche eine schnelle und einfache Durchführung ermöglichen und

eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen. Die Durchführung der Kreuzproben ist besonders bei den Gelverfahren durch Entfallen des Waschvorgangs und kürzere Inkubationszeiten vereinfacht und deutlich schneller. Während die Durchführung des RA-Verfahrens in dieser Studie im Median 36 Minuten in Anspruch nahm, wurde für das ICS-Verfahren 30,5 Minuten, für die AGR-Methode 22,5 Minuten und für die GR-Methode lediglich 17 Minuten benötigt. Einen weiteren Vorteil bieten die beschriebenen Testkits durch die weitgehende Stabilität der Ergebnisse, wodurch eine Reevaluierung zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht wird.

Obgleich Kreuzproben unabhängig von der angewandten Methode mit einem Agglutinationsgrad von  $\geq 1+$  als inkompatibel gewertet werden, kann es in der Praxis zu Situationen kommen, in denen aufgrund fehlender Verfügbarkeit von Blutkonserven die Transfusion geringgradig kreuzproben-inkompatibler Blutkonserven unvermeidbar ist. Aus diesem Grund ist die Einteilung in verschiedene Grade der Inkompatibilität von Bedeutung. Diese wird laut Herstellerangaben lediglich für die AGR-Methode beschrieben, jedoch wird in verschiedenen Studien auch die Bandstärke des ICS-Verfahrens in die Grade  $1+ - 4+$  eingeteilt.<sup>11</sup> Die Auswertung der GR-Methode hingegen ermöglicht lediglich die Einteilung in kompatible und inkompatible Kreuzproben.

Diese Studie weist mehrere Limitationen auf. So wurde lediglich eine kleine Anzahl von Proben verglichen, sodass eine statistische Signifikanz nicht immer gegeben war. Zudem wurden keine Kreuzproben mit einem mikroskopischen Agglutinationsgrad von  $4+$  oder einem makroskopischen Agglutinationsgrad von  $3+$  verglichen. Eine solch starke Reaktion in der Kreuzprobe ist äusserst selten und wurde lediglich bei Kreuzproben beobachtet, welche aufgrund deutlicher Agglutination in der Empfängerkontrolle aus der Studienpopulation ausgeschlossen werden mussten.

In mehreren Studien wurde vermutet, dass die mikroskopische Auswertung des RA-Verfahrens zu sensitiv sein könnte und schwach mikroskopisch positive Kreuzproben möglicherweise keine klinische Relevanz haben.<sup>15,23</sup> Da auch im Rahmen dieser Untersuchung möglichst kompatible Transfusionen verabreicht wurden, konnte die klinische Relevanz der verglichenen Kreuzproben in dieser Studie nicht untersucht werden.

## Danksagung

Die Studie wurde finanziell durch die Ernst-Reuter-Stiftung unterstützt. Alvedia stellte die durch Antiglobuline verstärkten Gel-Röhrchen und die immunchromatographischen Kreuzproben-Kits kostenlos zur Verfügung; DMS stellte die RapidVet-Gel-Kreuzproben-Kits kostenlos zur Verfügung. PD Dr. med. vet. Roswitha Merle unterstützte diese Arbeit durch die Beratung in Bezug auf die statistische Analyse.

Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter, C. Weingart,  
N. Merten, N. Bock,  
B. Kohn

Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter, C. Weingart, N. Merten, N. Bock, B. Kohn

## Évaluation de différentes techniques de compatibilité croisée par rapport à la méthode d'agglutination en tube chez le chien

Le test de compatibilité croisée permet de déterminer la compatibilité sérologique du sang du donneur et du receveur. Cette procédure permet de détecter d'éventuels anticorps dirigés contre les érythrocytes du donneur et de réduire ainsi le risque de réactions transfusionnelles immunologiques. Différentes méthodes sont disponibles pour la réalisation d'échantillons croisés: Outre la méthode d'agglutination en tube, qui est souvent considérée comme la méthode de référence, il existe des méthodes sur gel et immunochromatographiques.

Dans cette étude, une méthode sur tube-gel, une méthode sur tube-gel renforcée par des antiglobulines et une méthode par immunochromatographie ont été évaluées par rapport à la méthode d'agglutination en tube sur 28 échantillons croisés majeurs différents. L'évaluation a montré une concordance globale de 85,7% entre la méthode des tubes-gel renforcés par des antiglobulines, de 60,7% entre la méthode des tubes-gel et la méthode d'agglutination des tubes, et de 35,7% entre la méthode immunochromatographique et la méthode d'agglutination des tubes. Si l'on considère uniquement les résultats des tests macroscopiques positifs, la concordance entre la méthode d'agglutination sur tube et la méthode sur tube-gel renforcée par des antiglobulines était de 100%, celle sur tube-gel de 62,5% et celle immunochromatographique de 0%.

Avec la méthode du gel-tube renforcé par des antiglobulines, 4/9 échantillons croisés faiblement positifs, pour lesquels une agglutination microscopique avec un degré d'agglutination de 1+ - 2+ a été visible avec la méthode d'agglutination en tube, ont été jugés compatibles. Pour tous les autres échantillons croisés présentant un degré d'agglutination plus important, les résultats étaient conformes à ceux obtenus par la méthode d'agglutination en tube. La transfusion de produits sanguins incompatibles peut entraîner des réactions transfusionnelles hémolytiques, mais la pertinence clinique d'échantillons croisés faiblement positifs au microscope n'est pas claire. La réalisation des différents kits de test a pris beaucoup moins de temps que la procédure d'agglutination en tube. En raison de la forte concordance et du gain de temps, la méthode des tubes-gel renforcés par des antiglobulines constitue une bonne alternative à la méthode de référence, en particulier dans les situations d'urgence. En revanche, il n'y avait qu'une faible concordance entre la méthode des tubes en gel et la méthode de référence et aucune concordance entre la méthode immunochromatographique et la méthode de référence.

**Mots clés:** médecine transfusionnelle canine, test de compatibilité, comparaison des méthodes

## Valutazione di diverse tecniche di cross-matching messe a confronto con il metodo di agglutinazione in provetta nei cani

Il cross-matching è una procedura utilizzata per determinare la compatibilità sierologica tra il sangue del donatore e quello del ricevente. Questo metodo consente di rilevare eventuali anticorpi diretti contro gli eritrociti del donatore, riducendo così il rischio di reazioni trasfusionali immunologiche. Esistono diversi metodi per eseguire il cross-matching: oltre al metodo di agglutinazione in provetta, considerato spesso come metodo di riferimento, sono disponibili anche metodi basati su gel e tecniche immunocromatografiche.

In questo studio sono stati valutati un metodo con gel in provetta, un metodo con gel in provetta potenziato con antiglobuline e un metodo immunocromatografico, confrontandoli con il metodo di agglutinazione in provetta su 28 campioni di maggiore cross-matching. I risultati della valutazione hanno mostrato una concordanza complessiva dell'85,7% per il metodo con gel in provetta potenziato con antiglobuline, del 60,7% per il metodo con gel in provetta e del 35,7% per il metodo immunocromatografico rispetto al metodo di agglutinazione in provetta. Considerando solo i risultati positivi a livello macroscopico, la concordanza tra il metodo di agglutinazione in provetta e il metodo con gel in provetta potenziato con antiglobuline è stata del 100%, quella con il metodo con gel in provetta del 62,5%, mentre con il metodo immunocromatografico dello 0%.

Il metodo con gel in provetta potenziato con antiglobuline ha valutato 4 su 9 campioni di cross-matching debolmente positivi come compatibili. In questi campioni, il metodo di agglutinazione in provetta aveva evidenziato un'agglutinazione microscopica di grado 1+ - 2+. Per tutti gli altri campioni con un'agglutinazione di grado maggiore, i risultati sono stati concordi con quelli del metodo di riferimento. La trasfusione di emocomponenti incompatibili può portare a reazioni trasfusionali emolitiche; tuttavia, la rilevanza clinica dei campioni debolmente positivi al microscopio non è chiara. I vari kit di test hanno richiesto molto meno tempo rispetto al metodo di agglutinazione in provetta. Grazie alla forte concordanza e al risparmio di tempo, il metodo con gel in provetta potenziato con antiglobuline rappresenta una valida alternativa al metodo di riferimento, soprattutto in situazioni di emergenza. D'altra parte, il metodo con gel in provetta ha mostrato solo una debole concordanza e il metodo immunocromatografico non ha evidenziato alcuna concordanza con il metodo di riferimento.

**Parole chiave:** Medicina trasfusionale canine, test di compatibilità, confronto tra metodi

## Literaturnachweis

- <sup>1</sup> Arnold JE, Camus MS, Freeman KP, Giori L, Hooijberg EH, Jeffery U, Korchia J, Meindel MJ, Moore AR, Sisson SC, Vap LM, Cook JR: ASVCP Guidelines: Principles of Quality Assurance and Standards for Veterinary Clinical Pathology (version 3.0): Developed by the American Society for Veterinary Clinical Pathology's (ASVCP) Quality Assurance and Laboratory Standards (QALS) Committee. *Vet Clin Pathol* 2019; 48(4):542–618.
- <sup>2</sup> Blais MC, Berman L, Oakley DA, Giger U: Canine Dal blood type: A red cell antigen lacking in some Dalmatians. *J Vet Intern Med* 2007; 21(2):281–286.
- <sup>3</sup> Callan MB, Jones LT, Giger U: Hemolytic transfusion reactions in a dog with an alloantibody to a common antigen. *J Vet Intern Med* 1995; 9(4):277–279.
- <sup>4</sup> Caudill MN, Meichner K, Koenig A, Berghaus RD, Garner B: Comparison of serum versus EDTA plasma in canine major crossmatch reactions. *Vet Clin Pathol* 2021; 50(3):319–326.
- <sup>5</sup> Davidow EB, Blois SL, Goy-Thollot I, Harris L, Humm K, Musulin S, Nash KJ, Odunayo A, Sharp CR, Spada E, Thomason J, Walton J, Wardrop KJ: Association of Veterinary Hematology and Transfusion Medicine (AVHTM) Transfusion Reaction Small Animal Consensus Statement (TRACS) Part 2: Prevention and monitoring. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2021; 31(2):167–188.
- <sup>6</sup> Dinardo CL, Bonifácio SL, Mendrone A Jr: Indirect antiglobulin test-crossmatch using low-ionic-strength saline-albumin enhancement medium and reduced incubation time: effectiveness in the detection of most clinically significant antibodies and impact on blood utilization. *Immunohematology* 2014; 30(1):1–5.
- <sup>7</sup> Garg S, Saini N, Bedi RK, Basu S: Comparison of micro column technology with conventional tube methods for antibody detection. *J Lab Physicians* 2017; 9(2):95–99.
- <sup>8</sup> Goy-Thollot I, Nectoux A, Guidetti M, Chaprier B, Bourgeois S, Boisvineau C, Barthélemy A, Pouzot-Nevoret C, Giger U: Detection of naturally occurring alloantibody by an in-clinic antiglobulin-enhanced and standard crossmatch gel column test in non-transfused domestic shorthair cats. *J Vet Intern Med* 2019; 33(2):588–595.
- <sup>9</sup> Goy-Thollot I, Giger U, Boisvineau C, Perrin R, Guidetti M, Chaprier B, Barthélemy A, Pouzot-Nevoret C, Canard B: Pre- and Post-Transfusion Alloimmunization in Dogs Characterized by 2 Antiglobulin-Enhanced Cross-match Tests. *J Vet Intern Med* 2017; 31(5):1420–1429.
- <sup>10</sup> Giger U, Gelens CJ, Callan MB, Oakley DA: An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog. *J Am Vet Med Assoc* 1995; 206(9):1358–1362.
- <sup>11</sup> Guidetti M, Goy-Thollot I, Boisvineau C, Giger U: Alloimmunization of a dog erythrocyte antigen 1- dog transfused with weakly dog erythrocyte antigen 1+ blood. *J Vet Intern Med* 2019; 33(5):2037–2045.
- <sup>12</sup> Guzman LR, Streeter E, Malandra A: Comparison of a commercial blood cross-matching kit to the standard laboratory method for establishing blood transfusion compatibility in dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2016; 26(2):262–268.
- <sup>13</sup> Löw B, Messeter L: Antiglobulin test in low-ionic strength salt solution for rapid antibody screening and cross-matching. *Vox Sang* 1974; 26(1):53–61.
- <sup>14</sup> Luethy D, Owens SD, Stefanovski D, Nolen-Walston R, Giger U: Comparison of Tube, Gel, and Immunochromatographic Strip Methods for Evaluation of Blood Transfusion Compatibility in Horses. *J Vet Intern Med* 2016; 30(6):1864–1871.
- <sup>15</sup> Marshall H, Blois SL, Abrams-Ogg ACG, Bersenas AM, Ruotsalo K, Monteith G: Accuracy of point-of-care crossmatching methods and crossmatch incompatibility in critically ill dogs. *J Vet Intern Med* 2021; 35(1):245–251.
- <sup>16</sup> McClosky ME, Cimino Brown D, Weinstein NM, Chappini N, Taney MT, Marryott K, Callan MB: Prevalence of naturally occurring non-AB blood type incompatibilities in cats and influence of crossmatch on transfusion outcomes. *J Vet Intern Med* 2018; 32(6):1934–1942.
- <sup>17</sup> Odunayo A, Garraway K, Rohrbach BW, Rainey A, Stokes J: Incidence of incompatible crossmatch results in dogs admitted to a veterinary teaching hospital with no history of prior red blood cell transfusion. *J Am Vet Med Assoc* 2017; 250(3):303–308.
- <sup>18</sup> Spada E, Perego R, Viñals Flórez LM, Del Rosario Perlado Chamizo M, Baggiani L, Dall'Ara P, Proverbio D: Comparison of cross-matching method for detection of DEA 7 blood incompatibility. *J Vet Diagn Invest* 2018; 30(6):911–916.
- <sup>19</sup> Spada E, Proverbio D, Baggiani L, Canzi I, Perego R: Activity, specificity, and titer of naturally occurring canine anti-DEA 7 antibodies. *J Vet Diagn Invest* 2016; 28(6):705–708.
- <sup>20</sup> Tocci LJ, Ewing PJ: Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: an overview of pretransfusion testing. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009; 19(1):66–73.
- <sup>21</sup> Villarnovo D, Burton SA, Horney BS, MacKenzie AL, Vanderstichel R: Preliminary evaluation of a gel tube agglutination major cross-match method in dogs. *Vet Clin Pathol* 2016; 45(3):411–416.
- <sup>22</sup> Zaremba RM, Brooks AC, Thomovsky EJ: Transfusion Medicine: An Update on Antigens, Antibodies and Serologic Testing in Dogs and Cats. *Top Companion Anim Med.* 2019; 34:36–46.
- <sup>23</sup> Zaremba RM, Brooks AC, Thomovsky EJ, Moore GE, Johnson PA: Comparison of a commercial immunochromatographic strip crossmatch kit and standard laboratory crossmatch methods for blood transfusion compatibility in dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2022; 32(5):582–591.

Evaluation verschiedener Kreuzproben-Techniken im Vergleich zum Röhrchen-Agglutinationsverfahren beim Hund

L. Herter, C. Weingart, N. Merten, N. Bock, B. Kohn

## Korrespondenzadresse

Dr. Christiane Weingart  
Klein- und Heimtierklinik  
Fachbereich Veterinärmedizin  
Freie Universität Berlin  
Oertzenweg 19 b,  
D-14163 Berlin,  
Telefon: +49 308 38 62 422  
E-Mail: christiane.weingart@fu-berlin.de