

3. Material und Methoden

Die Untersuchungen gliederten sich in zwei Teile: einen retrospektiven Teil von 9/98 bis 12/99 und einen prospektiven Teil von 1/2000 bis 8/2001.

3.1 Blutgruppenbestimmung

Vor der Durchführung der Bluttransfusion wurde sowohl vom Spender als auch vom Empfänger die Blutgruppe mit Hilfe der Objektträgermethode bestimmt.

Das hierfür benötigte Anti-A-Serum wurde von Katzen mit der Blutgruppe B gewonnen, 30 Minuten bei 56°C erhitzt und gefiltert. Als Anti-B-Reagenz diente eine Weizenkeim-Lektin-Lösung (*Triticum vulgaris*, SIGMA L-9640, 64 µg/ml, verdünnt mit 0,01 M phosphatgepufferter Kochsalzlösung, PBS (Dulbecco, Biochrom, Berlin)) (GIGER et al. 1991c). Beide Reagentien wurden portioniert und bei -20°C gelagert. Wurden die Reagentien aufgetaut, so wurden diese bei 4°C über max. 6 Wochen gelagert.

Zur Blutgruppenbestimmung wurden 30 µl Anti-A-Serum bzw. 30 µl Anti-B-Lösung mit 15 µl EDTA-Vollblut auf jeweils einem Objektträger vermischt. Nach Schwenken des Objektträgers wurde das Blut auf Agglutination hin überprüft.

Eine Katze wies die Blutgruppe A auf, wenn ihre Erythrozyten eine Agglutination mit dem Anti-A-Serum (Abb.1), und die Blutgruppe B eine Agglutination mit dem Anti-B-Reagenz aufwies. Katzen mit der Blutgruppe AB agglutinierten mit beiden Reagentien (GRIOT-WENK und GIGER, 1995), wobei darauf geachtet wurde, dass sie nicht autoagglutinierten, d.h. die Autokontrolle war jeweils negativ.

Abb.1: Agglutination mit Anti-A-Serum bei einer Katze mit der Blutgruppe A



Wenn eine spontane Erythrozytenagglutination beim Patienten vorlag, wurde zunächst ein „Waschen der Erythrozyten“ durchgeführt. Hierzu wurde das Blut 1 Minute bei 1000g zentrifugiert (Minifuge RF, Heraeus Sepatech) und das Plasma abpipettiert. Anschliessend wurde PBS-Lösung hinzugegeben, vermischt, erneut zentrifugiert (1 Minute bei 1000g) und der Überstand abdekantiert. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Eine Bestimmung der Blutgruppe mit Hilfe der Objektträgermethode war nur möglich, wenn nach Erythrozytenwaschung die Agglutination nicht persistierte.

Handelte es sich um die Blutgruppe B, wurde zusätzlich das sog. „Back typing“ durchgeführt (GIGER et al., 1991a). Hierbei wurde EDTA-Blut des Probanden 2 Minuten bei 1000g zentrifugiert und 30 µl des gewonnenen Plasmas mit 15 µl EDTA-Vollblut einer Typ A-Katze auf einem Objektträger vermischt. Eine Agglutination bestätigte die Blutgruppe B.

In unklaren Fällen und zur Bestätigung der Blutgruppe AB wurde eine Hämagglutinations-Röhrchenmethode durchgeführt (GIGER et al., 1991a). Das Blut wurde zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. Das Zentrifugat wurde anschliessend nach der oben beschriebenen Methode gewaschen und mit PBS-Lösung eine 3-5%ige Erythrozytensuspension hergestellt. Anschliessend wurden drei Röhrchen vorbereitet und mit Anti-A-Serum, Anti-B-Lösung und „Back typing“ beschriftet. 25 µl der Erythrozytensuspension wurden mit jeweils 50 µl Anti-A-Serum (Verdünnung Anti-A-Serum, mit PBS 1:4) bzw. Anti-B-Reagenz (Verdünnung Weizenkeim-Lektin-Lösung 64 µg/ml mit PBS 1:8) vermischt. Im 3. Röhrchen wurden 25 µl einer Typ A-Erythrozytensuspension mit 50 µl Plasma des Probanden vermischt. Es folgte eine 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zentrifugation (Labofuge A, Heraeus Sepatech) (15 Sekunden lang bei 1000g) erfolgte die Beurteilung. Zunächst wurde der Überstand auf Hämolyse hin überprüft, nach Resuspension der zellulären Phase durch Tippen gegen das Röhrchen erfolgte die Beurteilung der Agglutination.

3.2 Kreuzprobe

Im prospektiven Teil der Studie wurden vor und ca. 1 bzw. 4 Wochen nach der Transfusion Kreuzproben zur Überprüfung der serologischen Kompatibilität durchgeführt.

Hierbei wurde zunächst EDTA-Blut des Spenders und des Empfängers zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und vom Zentrifugat eine 3-5%ige Erythrozytensuspension nach der oben beschriebenen Methode hergestellt. Anschliessend wurden drei Röhrchen vorbereitet und mit „Majorprobe“, „Minorprobe“ bzw. „Empfängerkontrolle“ beschriftet.

Nach folgendem Schema wurden jeweils 50 µl Plasma mit 25 µl Erythrozytensuspension pipettiert (GIGER, 1992b):

- Majorprobe: Empfängerplasma + Spendererythrozyten
- Minorprobe: Spenderplasma + Empfängererythrozyten
- Empfängerkontrolle: Empfängerplasma + Empfängererythrozyten

Nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37°C und anschliessender Zentrifugation (15 Sekunden bei 1000g) wurde zunächst der Überstand auf Hämolyse untersucht. Bei bereits vor Durchführung der Kreuzprobe vorhandener Hämolyse des Plasmas erfolgte die Beurteilung im Vergleich mit dem Ansatz der Empfängerkontrolle. Durch Tippen gegen das Röhrchen wurde die zelluläre Phase resuspendiert und auf Agglutination überprüft. Fehlte eine makroskopische Agglutination, wurde der Ansatz auch mikroskopisch beurteilt.

Der Grad der Agglutination wurde von + bis +++ (1+ bis 3+) angegeben. Die Kreuzprobe wurde als inkompatibel beurteilt, wenn im Major- bzw. Minoransatz eine Agglutination oder Hämolyse auftrat. Die Empfängerkontrolle wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob eine Autoagglutination oder Grundhämolyse vorlag. In diesen Fällen war eine Beurteilung der Kompatibilität nur dann möglich, wenn die Agglutination in der Major- bzw. Minorprobe stärker ausgeprägt war als in der Empfängerkontrolle.

Der Ansatz der ersten Kreuzprobe erfolgte in der Regel nach der Transfusion. Die Kreuzprobe diente in diesem Fall nicht allein der Überprüfung der Kompatibilität (dies erfolgte durch die Blutgruppenbestimmung), sondern zusammen mit der 2. und 3. Kreuzprobe als Verlaufskontrolle. So erklärt sich, dass Transfusionen durchgeführt wurden, obwohl eine positive Kreuzprobe vorlag.

Die Durchführung einer zweiten und dritten Kreuzprobe war nur möglich, wenn das Empfängertier zu einer erneuten Blutabnahme nach ca. 1 bzw. 4 Wochen zur Verfügung stand. Handelte es sich bei dem Spendertier um ein Tier aus der Privathaltung, wurde das Blut des Spendertieres bis zum Zeitpunkt der zweiten Kreuzprobe bei 4-6°C gelagert. Nur in einigen Fällen war es möglich, eine erneute Blutprobe abzunehmen. Von den klinikeigenen Spenderkatzen wurde jeweils eine frische Blutprobe zur Durchführung der zweiten bzw. dritten Kreuzprobe verwendet.

3.3 Blutspender

Zur Blutentnahme standen sowohl klinikeigene Katzen als auch Katzen aus der Privathaltung zur Verfügung. Der Bedarf an Vollblut war durch die klinikeigenen Spenderkatzen nicht zu decken, so dass die Patientenbesitzer versuchten, Spendertiere zu organisieren. Hierbei handelte es sich um weitere Katzen im eigenen Haushalt oder um ein Tier aus der Nachbarschaft oder dem Bekanntenkreis. Einige Besitzer und Studenten waren auch bereit, ihre Katze regelmässig zur Blutspende vorzustellen (Blutspendekartei).

Jedes Spendertier wurde zunächst allgemein klinisch untersucht und es wurde eine hämatologische und klinisch-chemische Blutuntersuchung durchgeführt. Bei den klinikeigenen Spenderkatzen wurde das Blut zur Bestimmung des Hämatokrits in Sedation zusammen mit der Blutspende abgenommen. Zweimal pro Jahr wurde bei den klinikeigenen Spenderkatzen eine komplette Blutuntersuchung (Hämatologie, klinische Chemie) durchgeführt. Katzen waren zur Blutspende geeignet, wenn sie gesund, möglichst gross, entwurmt und geimpft waren. Der Hämatokrit sollte mind. 35% betragen, und es sollte sich möglichst um Katzen aus der Wohnungshaltung handeln. Für Katzen, die regelmässig Blut spendeten, wurde ein Protokoll geführt. Es wurde das Datum, das Gewicht, Laborergebnisse, die Art der Sedation, die Lokalisation der Blutentnahme (rechte/linke V. jugularis), das Spendevolumen, das Auftreten von Nebenwirkungen, Schwierigkeiten bei der Blutentnahme sowie der Name des Empfängers eingetragen.

3.4 Blutentnahme

Die Spendertiere wurden durch intramuskulärer Verabreichung von Ketamin (Ketamin 10%[®], Essex Tierarznei, München) (5-6 mg/kg) und Azepromazin (Vetranquil[®], Sanofi-Cefa GmbH, Düsseldorf) (0,1 mg/kg) bzw. Midazolam (Midazolam[®] Ratiopharm GmbH) (0,1 mg/kg) sediert. Die Blutentnahme erfolgte mit offenem System unter sterilen Kautelen aus der



Abb.2: Durchführung der Blutentnahme

Vena jugularis mit Hilfe eines Butterfly-Katheters (Vasoflo[®] Perfusionsbesteck, 19G, Dispomed Witt, Gelnhausen). Der Jugularvenenbereich wurde geschoren und mit Alkohol desinfiziert. Zur Blutentnahme wurden drei Hilfspersonen benötigt (Abb.2). Eine Person fixierte die Spenderkatze in Sternallage. Nach Punktion der V. jugularis und Halten des Butterflys durch eine Person wurde das Blut von einer weiteren Person in antikoagulans-haltige Spritzen bei gleichzeitigem Schwenken aspiriert. Das Spendevolumen richtete sich nach dem Körpergewicht, wobei ca. 10% des Blutvolumens entnommen wurden. Bei Katzen mit einem Hkt von 30 - <35% oder Katzen, die älter als 8 Jahre waren, wurde eine geringere Menge Blut abgenommen. Das Blut wurde anschliessend in einen Transferbeutel (Baxter Healthcare Corporation, Unterschleißheim) überführt.

War das Blut zur Konservierung bestimmt, so wurde der Blutbeutel sofort durch einen Clip verschlossen.

Nach der Blutentnahme wurde das Spendertier mindestens eine Stunde überwacht. Hierbei wurde die Farbe der Schleimhäute, der Puls und die Atmung regelmässig kontrolliert. Alle Spender wurden subkutan oder selten intravenös mit Ringerlaktat (Sterofundin[®]) in einer Menge von ca. 20 ml/kg infundiert.

Wurde das Blut sofort oder innerhalb von 8 Stunden zur Transfusion benötigt, fand Natriumzitrat (3,13% Braun, Melsungen) als Antikoagulans Verwendung (1 Teil Na-Zitrat auf 9 Teile Blut).

Zur Blutkonservierung diente als Erythrozytenstabilisator und Antikoagulans CPDA-1 (1,2 ml CPDA-1 auf 8,8 ml Blut), das aus einem Einfachbeutelssystem (Baxter Fenwal[®], Unterschleissheim) entnommen wurde.

Der Blutbeutel wurde mit dem Spendernamen, Blutgruppe, Datum der Blutspende und der Menge des entnommenen Blutes beschriftet.

Natriumzitrathaltiges Blut wurde sofort transfundiert und nur in Einzelfällen bei 4-6°C bis zu 8 Stunden gelagert. CPDA-1-haltige Blutkonserven wurden bei 4-6°C bis maximal 15 Tage aufbewahrt. Die Beutel wurden mehrmals pro Woche vorsichtig geschwenkt. Es erfolgte keine Auftrennung in einzelne Blutkomponenten.

Von einigen gelagerten Bluteinheiten wurde sowohl nach Zugabe der CPDA-1-Lösung als auch nach der Lagerung zum Zeitpunkt der Transfusion eine geringe Blutmenge zur Bestimmung des Hämatokrits und des Hämolysegrads im Plasma entnommen. Zusätzlich wurde nach 4-10 Tagen Lagerung von einigen Bluteinheiten eine mikrobiologische Untersuchung durchgeführt.



3.5 Durchführung der Bluttransfusion

Die Bluttransfusion wurde über einen venösen Zugang (Vasocan[®], Braun Melsungen) in die V. saphena oder V. cephalica antebrachii bzw. über einen Jugularkatheter (Cavafix[®], Braun Melsungen) verabreicht (Abb.3). Für die Transfusion wurde ein spezielles Transfusionsbesteck mit Mikrofilter mit einer Porengröße von 200µm (Sangofix[®] Air, Braun Melsungen) verwendet.

Abb.3: Bluttransfusion

Initial wurde das Blut mit einer geringen Transfusionsgeschwindigkeit (2-3 ml in den ersten 5 Minuten) verabreicht und der Empfänger bezüglich des Auftretens von Transfusionsreaktionen beobachtet. Traten keine Reaktionen auf, erhielten normovolämische Katzen ca. 10 ml/kg/Stunde und Katzen mit hypovolämischem Schock bis zu 60 ml/kg/Stunde. Patienten mit kardiovaskulärer Dysfunktion wurden langsamer transfundiert (ca. 4ml/kg/Stunde) (GIGER, 1992). Es wurde darauf geachtet, dass das Blut innerhalb von 4 Stunden verabreicht wurde. Das Transfusionsvolumen wurde nach folgender Formel berechnet (GRIOT-WENK und GIGER, 1995):

Transfusionsvolumen (ml) =
erwünschter Hkt-Anstieg (%) x Körpergewicht des Empfängers x 2

In der Regel war das Transfusionsvolumen jedoch durch die Verfügbarkeit und das Beutelvolumen limitiert. Reichte das Spendevolumen einer Katze nicht aus, um eine hochgradig anämische Katze zu stabilisieren, wurde dem Empfänger am gleichen Tag Blut von zwei oder drei Spendertieren zugeführt. Zwischen den einzelnen Transfusionen erfolgte keine Hkt-Kontrolle, und das gesamte Transfusionsvolumen wurde für die Auswertung addiert und als eine Transfusion zusammengefasst.

Während der Transfusion und danach wurde der Empfänger überwacht. Hierbei wurde der Verlauf der Körpertemperatur, die Atem- und Pulsfrequenz und die kapilläre Rückfüllungszeit in etwa 10-minütigen Abständen beurteilt. Gegen Ende der Bluttransfusion wurde das Restblut aus dem Beutel und dem Schlauchsystem mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) gespült. 16-24 Stunden nach Verabreichung der Bluttransfusion wurde der Patient erneut klinisch untersucht und es erfolgte eine Hkt- und Bilirubinkontrolle. Eine Katze mit einem rupturierten Hämangioendotheliosarkom erhielt eine Infusion mit bovinem

Hämoglobin (Oxyglobin[®], Biopure, Corporation) in einer Gesamtdosierung von 25 ml/kg über ca. 2 Stunden.

3.6 Direkter Coombs-Test (DAT, Direkter Antiglobulintest)

Die Durchführung des direkten Coombs-Tests zum Nachweis antierythrozytärer Antikörper bzw. Komplement auf der Erythrozytenoberfläche erfolgte an der Tierärztlichen Hochschule Hannover (Arbeitsgruppe Immunologie).

Die Erythrozyten wurden dreimal mit PBS gewaschen und 25 µl Erythrozytenkonzentrat mit 975 µl R2F-Lösung (Firma Biochrom, Berlin) gemischt.

Zum Nachweis der Antiglobulinklasse wurden monospezifische Antiseren (Goat-Anti-Cat IgM [Bethyl, Montgomery, Texas, USA, Vertrieb über Natutec, Frankfurt/Main], Goat-Anti-Cat IgG H+L [Dianova, Hamburg], Sheep-Anti-Cat C₃ [The Binding Site GmbH, Heidelberg]) verwendet. Auf Mikrotiterplatten wurde von den Antiseren und C₃ mit PBS eine Verdünnungsreihe von 1:20, 1:40, 1:80 und 1:160 hergestellt und jeder Verdünnungsstufe das Gemisch aus Erythrozyten und R2F-Lösung zugegeben. Jeweils ein Ansatz wurde bei 4°C und bei 37°C 90 Minuten inkubiert. Als Negativkontrollen wurden PBS und fetales Kälberserum verwendet. Der Test wurde als positiv beurteilt, wenn eine Erythrozytenagglutination eintrat.

3.7 Auswertung der Bluttransfusionen

Die Studie umfasste einen retrospektiven (15 Monate) und eine prospektiven (21 Monate) Teil. Es wurden folgende Parameter in die Auswertung der Bluttransfusionen einbezogen:

Signalement des Empfängers

Signalement des Spenders

Blutgruppen

Spendevolumen

Indikationen

Transfusionsvolumen

Transfusionsreaktionen

Hkt vor und nach der Bluttransfusion

Bestimmung des zu erwartenden Hkt-Anstiegs mit folgender Formel:

Hkt-Anstieg (%) = Transfusionsvolumen : (2x kg KG des Empfängers)

Vergleich des Hkt-Anstiegs mit errechnetem Wert

Anzahl der Transfusionen pro Katze

Bestimmung der Überlebensrate bis 10 Tage nach der letzten Transfusion

Im prospektiven Teil der Studie wurden in einem Teil der Fälle zusätzliche Parameter ausgewertet:

Bilirubinmessung vor und nach der Bluttransfusionen

Kreuzprobe vor der Bluttransfusion, ca. 1 und 4 Wochen danach

Coombs-Test vor und nach der Bluttransfusion

3.8 Statistik

Die Auswertung erfolgte mit Angabe von Prozentpunkten (Median) sowie Minimal- und Maximalwerten. In einem Teil der Fälle wurde zusätzlich Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Als statistische Software wurde SPSS 10 (SPSS GmbH Software, München) verwendet.