

Persönliche PDF-Datei für

Monika Lindemann, Andreas Heinold, Veronika Lenz, Peter A. Horn, Falko M. Heinemann

Mit den besten Grüßen vom Georg Thieme Verlag

[www.thieme.de](http://www.thieme.de)

## Die durchflusszytometrische Verträglichkeitsprobe – sensitivere Diagnostik zur Prädiktion von Transplantatabstoßungen

DOI 10.1055/s-0043-113802

Transfusionsmedizin 2017; 7: 233–237

Dieser elektronische Sonderdruck ist nur für die Nutzung zu nicht-kommerziellen, persönlichen Zwecken bestimmt (z. B. im Rahmen des fachlichen Austauschs mit einzelnen Kollegen und zur Verwendung auf der privaten Homepage des Autors). Diese PDF-Datei ist nicht für die Einstellung in Repositorien vorgesehen, dies gilt auch für soziale und wissenschaftliche Netzwerke und Plattformen.

**Verlag und Copyright:**

© 2017 by  
Georg Thieme Verlag KG  
Rüdigerstraße 14  
70469 Stuttgart  
ISSN 2191-8805

Nachdruck nur  
mit Genehmigung  
des Verlags

 **Thieme**

# Die durchflusszytometrische Verträglichkeitsprobe – sensitivere Diagnostik zur Prädiktion von Transplantatabstoßungen

## The Flow Cytometric Crossmatch – a More Sensitive Prediction of Transplant Rejections

### Autoren

Monika Lindemann, Andreas Heinold, Veronika Lenz, Peter A. Horn, Falko M. Heinemann

### Institut

Institut für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Essen (AÖR), Essen

### Schlüsselwörter

durchflusszytometrisches Crossmatch, Crossmatch zur Detektion von komplementvermittelter Zytotoxizität, antikörpervermittelte Abstoßung, Lebendnierenspende

### Key words

flow cytometric crossmatch, CDC crossmatch, antibody mediated rejection, living kidney donation

### Bibliografie

DOI <https://doi.org/10.1055/s-0043-113802>

Transfusionsmedizin 2017; 7: 233–237 © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York | ISSN 2191-8805

### Korrespondenzadresse

Prof. Dr. med. Monika Lindemann  
Universitätsklinikum Essen (AÖR),  
Institut für Transfusionsmedizin  
Hufelandstraße 55, 45147 Essen  
Monika.Lindemann@uk-essen.de

### ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Lebendnierenspende hat man die Chance, das immunologische Risiko vor Transplantation sehr detailliert zu testen. Neben der Bestimmung der humanen Leukozytenantigene (HLA) ist die Suche nach HLA-Antikörpern und die Verträglichkeitsprobe (Crossmatch) zwingend erforderlich, wobei in Deutschland derzeit als Standard die komplementver-

mittelte Zytotoxizität gemessen wird (CDC-Crossmatch). Es geht darum, herauszufinden, ob der Empfänger präformierte spenderspezifische Antikörper hat, die eine Transplantatabstoßung auslösen können. Im Ausland, beispielsweise in Großbritannien, ist dagegen das durchflusszytometrische Crossmatch inzwischen als Standardverfahren etabliert. Dieses wurde bereits 1983 beschrieben und ist sensitiver als das CDC-Crossmatch. Es gibt inzwischen umfangreiche Studien, die zeigen, dass ein positives durchflusszytometrisches Crossmatch ein erhöhtes Risiko für antikörpervermittelte Abstoßungen anzeigt. Dies konnte in unserer Kohorte bestätigt werden, in der ein positives durchflusszytometrisches Crossmatch für die T-Zellen ein 10,1-fach und für die B-Zellen ein 3,2-fach erhöhtes Risiko anzeigt.

### ABSTRACT

Prior to living kidney donation the immunological risk can be assessed very detailed. Apart from testing for human leukocyte antigens (HLA) the detection of HLA antibodies and the crossmatch are mandatory. In Germany, the standard method is still based on complement dependent cytotoxicity (CDC crossmatch). It is used to detect preformed donor-specific antibodies that could lead to transplant rejection. Abroad, for example in Great Britain, the flow cytometric crossmatch is currently established as a standard assay. This crossmatch was already described in 1983 and it is more sensitive than the CDC crossmatch. There are comprehensive data showing that a positive flow cytometric crossmatch indicates an increased risk of antibody mediated rejection. We could confirm these data in our own cohort; a positive T cell flow crossmatch indicated a 10.1-fold and a positive B cell crossmatch a 3.2-fold increased risk.

## Methoden zur immunologischen Risikoabschätzung vor Transplantation

Zur immunologischen Risikoabschätzung wird vor Transplantationen die Verträglichkeit zwischen Spender und Empfänger untersucht. Neben der Bestimmung von HLA-Antigenen bei Spender

und Empfänger muss das Empfängerserum auf spenderspezifische Antikörper getestet werden. Dies ist in den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Standards von Eurotransplant festgelegt. Vorbestehende Antikörper zum Zeitpunkt einer Nierentransplantation können vor allem gegen ABO-Blutgruppen oder gegen humane Leukozytenantigene (HLA) gerichtet sein und zu einer hyperakuten Transplantatabstoßung führen [1]. Die Bestim-

mung von HLA-Antikörpern erfolgt vor Nierentransplantation mittels Antikörpersuchtest und bei Vorliegen von Antikörpern zusätzlich mittels Antikörperspezifisierung (siehe „Faktenbox“). Ein Teil der üblichen Tests basiert auf der komplementvermittelten Zytotoxizität (Complement dependent Cytotoxicity [CDC]) und wird auch als Lymphozytotoxizitätstest (Lymphocytotoxicity Test [LCT]) bezeichnet. Neuere, inzwischen ebenfalls weitverbreitete Verfahren verwenden farbkodierte Polystyrolkugeln (sogenannte Microbeads), an die HLA-Antigene gekoppelt sind (Luminex-Methode). Mit der Luminex-Methode ist eine Antikörpersuche (sogenanntes Screen bzw. Mixed Beads Assay) oder eine detaillierte Differenzierung der HLA-Antikörper (sogenanntes Single Antigen Bead Assay) möglich. Allerdings findet man auch nicht spenderspezifische Antikörper und „natürliche“ Antikörper, die möglicherweise gegen Mikroorganismen gerichtet sind und die lange Zeit als nicht prädiaktiv für den Transplantationsverlauf angesehen wurden [2]. Aktuelle Daten jedoch weisen darauf hin, dass auch „natürliche“ Antikörper mit einer antikörpervermittelten Abstoßung assoziiert sein könnten [3]. Bei der Luminex-Methode kommen außerdem falsch negative Reaktionen vor, beispielsweise aufgrund eines Prozoneneffekts [4].

Ferner ist eine Verträglichkeitsprobe (Crossmatch) vorgeschrieben, bei der mononukleäre Zellen oder T- und B-Zellen des Spenders mit dem Serum des Empfängers inkubiert werden (siehe „Faktenbox“). Dieser Ansatz basiert auf der Prämisse, dass HLA-Antikörper des Empfängers nicht nur gegen das Transplantat, sondern auch gegen Lymphozyten des Spenders gerichtet sind (► **Abb. 1**). Das Crossmatch wurde bereits 1964 von Terasaki und McClelland beschrieben [5] und basiert – genau wie die Tests zur Antikörpersuche – auf der komplementvermittelten Zytotoxizität (CDC-Crossmatch). Es konnte gezeigt werden, dass ein positives CDC-Crossmatch prädiaktiv für eine hyperakute Abstoßung ist [6]. Dieses Crossmatch-Verfahren detektiert HLA- und Non-HLA-Antikörper, welche das Komplement aktivieren und zur IgG- oder IgM-Klasse gehören können. IgM-Antikörper werden dann postuliert, wenn eine positive Reaktion nach Zugabe von Dithiothreitol (DTT) verschwindet, da DTT zur Spaltung von Disulfidbindungen in IgM-Antikörpern führt. Die IgM-Antikörper gelten als nicht transplantationsrelevant. Antikörper, die nach DTT-Zugabe persistieren, werden dagegen als IgG-Antikörper angesehen, die transplantationsrelevant sind. Es wurden einige Modifikationen beschrieben, um das CDC-Crossmatch sensitiver und spezifischer zu machen [7–9]. Diese haben sich aber in der Routinediagnostik nicht durchgesetzt. Das CDC-Crossmatch ist in Deutschland weiterhin das Standardverfahren. Im Ausland dagegen, beispielsweise in Großbritannien, ist ein anderes zellbasiertes Verfahren, das durchflusszytometrische Crossmatch, inzwischen als Standardverfahren etabliert, selbst bei der immunologischen Rufbereitschaft im Nachtdienst. Es wurde bereits 1983 von Garovoy et al. beschrieben [10].

## Durchflusszytometrisches Crossmatch

Das durchflusszytometrische Crossmatch wurde eingeführt, weil es methodenbedingt sensitiver als das CDC-Crossmatch ist [10–14]. In seiner Sensitivität liegt es zwischen dem CDC-Crossmatch und der oben beschriebenen Testung auf HLA-Antikörper mittels

### FAKTENBOX

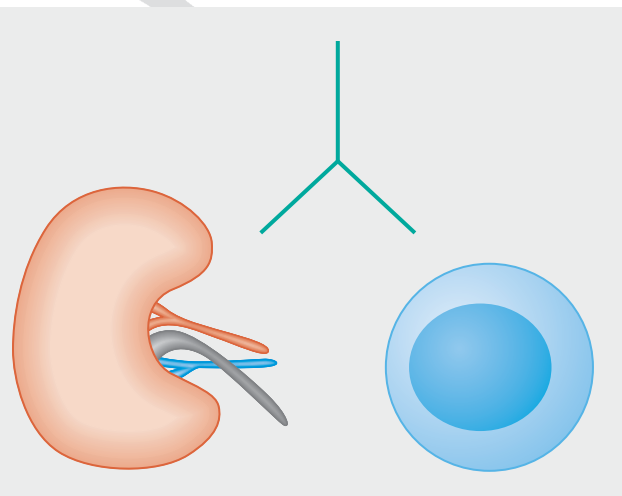
Immunologische Risikoabschätzung vor Lebendnierentransplantation

HLA-Antikörpersuche und -spezifizierung

- Lymphozytotoxizitätstest, welcher die komplementvermittelte Zytotoxizität misst (Lymphocytotoxicity Test [LCT], Complement dependent Cytotoxicity [CDC])
- Luminex

Crossmatch

- CDC, für T- und B-Zellen, falls positiv mit Dithiothreitol (DTT)
- durchflusszytometrisch für T- und B-Zellen



► **Abb. 1** Prämisse des Crossmatches – HLA-Antikörper aus Empfängerserum reagieren gegen das Transplantat und gegen Spenderlymphozyten.

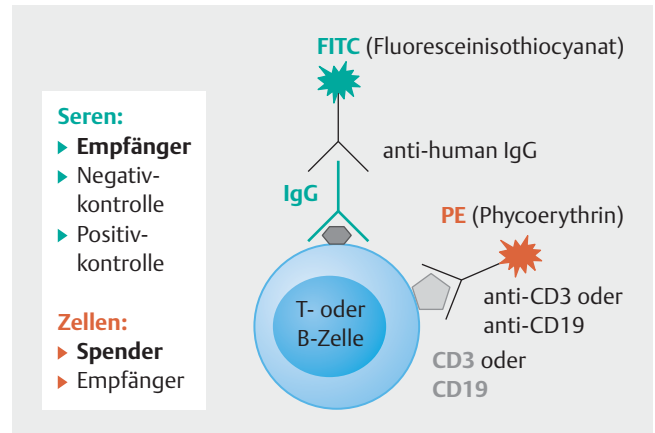
Single Antigen Beads. Es detektiert – im Unterschied zum Antikörpernachweis mittels Single Antigen Beads – nur spenderspezifische Antikörper, und zwar sowohl HLA- als auch Non-HLA-Antikörper. Es werden komplementaktivierende und nicht aktivierende Antikörper erfasst. Um diese zu differenzieren, könnte man das durchflusszytometrische Crossmatch so modifizieren, dass nur komplementaktivierende IgG-Subklassen (IgG1 und IgG3 anstelle des gesamten IgG) erfasst werden. Die Beladung mit spenderspezifischen IgG-Antikörpern wird detektiert durch einen Antikörper gegen humanes IgG, der direkt oder über einen Verstärkerkomplex [15] mit einem weiteren Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, z. B. Fluoresceinisothiocyanat (FITC) (► **Abb. 2**). Die T- und B-Zellen des Spenders werden durch Antikörper gegen Oberflächenantigene (anti-CD3 bzw. anti-CD19) nachgewiesen, die an fluoreszierende Farbstoffe wie Phycoerythrin (PE) gekoppelt sind. Es werden üblicherweise folgende Kombinationen getestet: allogener Wert (Spenderzellen und Empfängerserum), autologer Wert (Empfängerzellen und Empfängerserum), Negativkontrollen mit Serum

ohne HLA-Antikörper und Positivkontrollen mit Serum, das HLA-Antikörper mit einer Panel-Reaktivität (PRA) von über 95% enthält (► **Abb. 2**). T-Zellen werden untersucht, um HLA-Klasse-I-Antikörper zu detektieren, B-Zellen zur Detektion von Klasse-I- und -II-Antikörpern. Allerdings können auch aktivierte T-Zellen HLA-Klasse-II-Antigene exprimieren und binden dann ebenfalls HLA-Klasse-II-Antikörper [16].

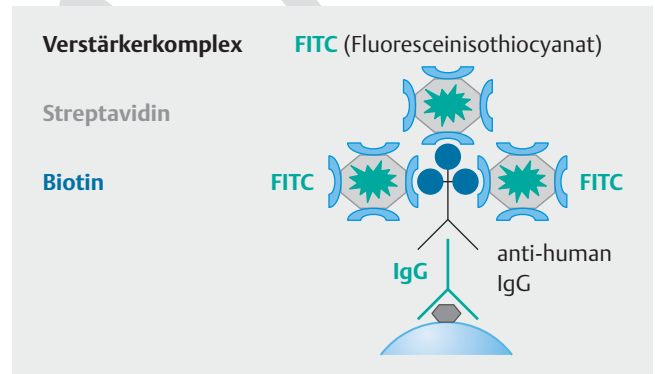
## Eigene Erfahrungen mit dem durchflusszytometrischen Crossmatch

Seit 2004 wird am Transplantationszentrum Essen vor der Lebendnieren spende zusätzlich zum CDC-Crossmatch regelmäßig ein durchflusszytometrisches Crossmatch durchgeführt. Wir haben uns zu diesem Vorgehen entschlossen, weil bei einer Lebendspende die Chance besteht, die Verträglichkeit zwischen Spender und Empfänger vor Transplantation detaillierter zu untersuchen, und selbst Antikörper mit sehr niedrigem Titer schädlich für das Transplantat sein können [17]. Auch wenn ein positives durchflusszytometrisches Crossmatch derzeit nicht als Kontraindikation für eine Transplantation angesehen wird, zeigt doch ein positives durchflusszytometrisches T-Zell-Crossmatch ein erhöhtes Risiko für eine Abstoßung an [18, 19]. In einer Essener Kohorte bestand bei positivem T-Zell-Crossmatch ein 10,1-fach erhöhtes Risiko für eine antikörpervermittelte Abstoßung [15]. Ein negatives T-Zell-Crossmatch vor Transplantation ist nach unseren Daten ein exzellenter Prädiktor dafür, dass eine antikörpervermittelte Abstoßung nicht auftritt. Methodisch ist hier anzumerken, dass in Essen im Gegensatz zu anderen Zentren [11 – 13, 20 – 27] eine besonders sensitive Technik verwendet wird, bei der eine Signalverstärkung über Biotin-Streptavidin-Komplexe erfolgt. Spenderspezifisches IgG wird dabei über biotinkoppeltes Anti-human-IgG detektiert, an das 3 Streptavidin-FITC-Proteine binden, was etwa zu einer Verdreifachung des Signals führt (► **Abb. 3**) [15, 28]. Während in unserer Kohorte der negative prädiktive Wert bei 99% lag, wurde er ohne Verwendung des Verstärkerkomplexes mit 90% angegeben [27]. Der Test wurde bei uns so sensitiv eingestellt, um möglichst alle spenderspezifischen IgG-Antikörper zu erfassen. Die Ergebnisse des durchflusszytometrischen Crossmatches werden bei uns genutzt, um die immunsuppressive Therapie zu adaptieren oder, bei Verfügbarkeit mehrerer Spender, den geeigneten auszuwählen.

Wir führen das durchflusszytometrische T-Zell-Crossmatch folgendermaßen durch: In einem 1. Schritt werden mittels Forward/Sideward Scatter (FSC/SSC) die Lymphozyten- und Monozytenregionen abgegrenzt (► **Abb. 4**). Dann werden durch Markierung mit Anti-CD3-Antikörpern die T-Zellen innerhalb der Lymphozytenregion identifiziert. In dieser Population wird anschließend die Bindung des Biotin-IgG/Streptavidin-Komplexes dargestellt. Als Ergebnis wird die mediane Fluoreszenzintensität angegeben, wobei eine lineare Skala von 0–1024 verwendet wird. Hier soll betont werden, dass die Auswertung des durchflusszytometrischen Crossmatches nicht standardisiert ist und z. B. beim weitverbreiteten UK-NEQAS-Ringversuch Grenzwerte sehr unterschiedlich definiert sind [27]. Grenzwerte müssen vom jeweiligen Zentrum



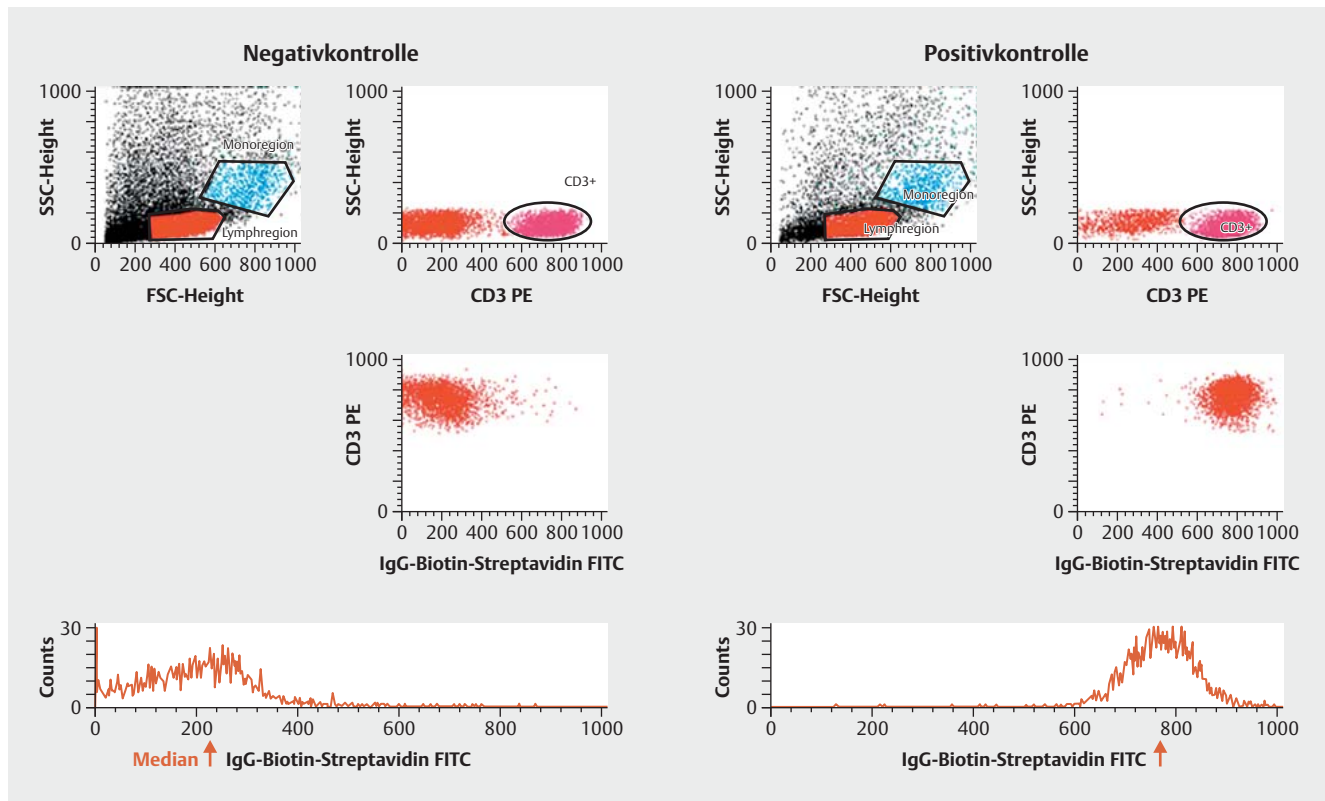
► **Abb. 2** Prinzip des durchflusszytometrischen Crossmatches – Kombinationen von Seren und Zellen sowie Strukturen, die durch fluoreszierende Antikörper detektiert werden.



► **Abb. 3** Biotin-Streptavidin-Komplex, der zu einer etwa 3-fachen Signalverstärkung führt.

festgelegt werden, etwa wie bei uns durch eine Receiver-operating-characteristic-Analyse (ROC-Analyse).

Der Stellenwert des B-Zell-Crossmatches ist bislang weniger klar als der des T-Zell-Crossmatches. In unserer Kohorte war auch ein positives B-Zell-Crossmatch prädiktiv, es zeigte ein 3,2-fach erhöhtes Risiko für eine antikörpervermittelte Abstoßung an [28]. Dabei kommt es im Vergleich zum T-Zell-Crossmatch zu stärkeren Hintergrundreaktionen. Um diese zu reduzieren, ist es beim durchflusszytometrischen B-Zell-Crossmatch üblich, Pronase zuzugeben [18, 28, 29]. Pronase ist ein proteolytisches Enzym, das an F(c)-Rezeptoren bindet und diese verdaut [30]. Damit sollen unspezifische Reaktionen verhindert werden. Pronase entfernt beispielsweise auch CD20 von den B-Zellen und kann daher ermöglichen, trotz der Gabe von Rituximab (einem Antikörper gegen CD20) das B-Zell-Crossmatch auswerten zu können [31]. Diese Beobachtung deckt sich mit unseren eigenen Erfahrungen [28]. Es ist zu beachten, dass die Behandlung mit Pronase auch die HLA-Expression verändern kann, sodass jedes Labor für seine Versuchsbedingungen die Grenzwerte zwischen negativer und positiver Reaktion optimal einstellen muss [32]. Ein CDC-Cross-



► **Abb. 4** Durchführung des durchflusszytometrischen Crossmatches – Gating-Strategie und Beispiel für Negativ- und Positivkontrollen beim durchflusszytometrischen Crossmatch der T-Zellen. FSC: Forward Scatter, SSC: Sideward Scatter, PE: Phycoerythrin, FITC: Fluoresceinisothiocyanat.

match ist – im Gegensatz zum durchflusszytometrischen Crossmatch – für die B-Zellen nach Rituximabgabe fast immer positiv und damit nicht auswertbar [28]. Somit erzielt man bei ABO-Blutgruppen-inkompatiblen Transplantationen, bei denen regelmäßig eine Vorbehandlung mit Rituximab erfolgt, mit einem durchflusszytometrischen Crossmatch eher ein auswertbares Ergebnis. Interessanterweise hat auch die Konstellation der ABO-inkompatiblen Blutgruppen von Spender und Empfänger einen Einfluss auf die Reaktionsstärke beim durchflusszytometrischen T-Zell-Crossmatch, vermutlich weil Isoagglutinine der Klasse IgG an die T-Zellen binden [28]. Es wurde beschrieben, dass nicht nur Erythrozyten, sondern auch Lymphozyten ABO-Blutgruppenantigene tragen [33]. Besaß der Empfänger die Blutgruppe 0 und der Spender A oder B, so konnten wir besonders starke Reaktionen beim durchflusszytometrischen T-Zell-Crossmatch beobachten [28]. Da aufgrund des Organmangels eine Zunahme ABO-inkompatibler Transplantationen wahrscheinlich ist, sollten Grenzwerte auch für diese Konstellationen definiert werden.

## Fazit

Wenn genügend Zeit für eine Vorbehandlung des Empfängers und eine optimale Spenderauswahl bleibt (= Lebendspende) oder wenn das CDC-Crossmatch an Grenzen stößt, sollte auch deutschen Patienten das sensitivere durchflusszytometrische Crossmatch angeboten werden. Diese Methode ist im Ausland seit Jah-

ren ein Standardverfahren. Ihrer Verbreitung in Deutschland steht derzeit entgegen, dass sie arbeitsaufwendiger als das CDC-Crossmatch ist und dass sie nicht kostendeckend abgerechnet werden kann. Gerade in Zeiten des Organmangels aber sollten Diagnostik und Therapie bei Transplantationspatienten optimal sein, damit die wenigen Transplantate möglichst lange funktionstüchtig bleiben.

## Interessenkonflikt

Die Autoren geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

## Literatur

- [1] Kissmeyer-Nielsen F, Olsen S, Petersen VP et al. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet* 1966; 2: 662–665
- [2] Morales-Buenrostro LE, Terasaki PI, Marino-Vazquez LA et al. “Natural” human leukocyte antigen antibodies found in nonalloimmunized healthy males. *Transplantation* 2008; 86: 1111–1115
- [3] Zorn E, See SB. Polyreactive natural antibodies in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2017; 22: 8–13
- [4] Schnaidt M, Weinstock C, Jurisic M et al. HLA antibody specification using single-antigen beads – a technical solution for the prozone effect. *Transplantation* 2011; 92: 510–515
- [5] Terasaki PI, McClelland JD. Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 1964; 204: 998–1000

- [6] Patel R, Terasaki PI. Significance of the positive crossmatch test in kidney transplantation. *N Engl J Med* 1969; 280: 735–739
- [7] Zachary AA, Klingman L, Thorne N et al. Variations of the lymphocytotoxicity test. An evaluation of sensitivity and specificity. *Transplantation* 1995; 60: 498–503
- [8] Chapman JR, Taylor CJ, Ting A et al. Immunoglobulin class and specificity of antibodies causing positive T cell crossmatches. Relationship to renal transplant outcome. *Transplantation* 1986; 42: 608–613
- [9] Nelken D, Cohen I, Furcaig I. A method to increase the sensitivity of the lymphocyte microcytotoxicity test. *Transplantation* 1970; 10: 346–347
- [10] Garovoy MR, Rheischmidt MA, Bigos M et al. Flow cytometry analysis: a high technology crossmatch technique facilitating transplantation. *Transplant Proc* 1983; 15: 1939–1944
- [11] Gloor JM, DeGoey S, Ploeger N et al. Persistence of low levels of alloantibody after desensitization in crossmatch-positive living-donor kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 221–227
- [12] Rebibou JM, Bittencourt MC, Saint-Hillier Y et al. T-cell flow-cytometry crossmatch and long-term renal graft survival. *Clin Transplant* 2004; 18: 558–563
- [13] Karpinski M, Rush D, Jeffery J et al. Flow cytometric crossmatching in primary renal transplant recipients with a negative anti-human globulin enhanced cytotoxicity crossmatch. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2807–2814
- [14] Chapman JR, Deierhoi MH, Carter NP et al. Analysis of flow cytometry and cytotoxicity crossmatches in renal transplantation. *Transplant Proc* 1985; 17: 2480–2481
- [15] Lindemann M, Nyadu B, Heinemann FM et al. High negative predictive value of an amplified flow cytometry crossmatch before living donor kidney transplantation. *Hum Immunol* 2010; 71: 771–776
- [16] Heo WB, Kim CD, Won DI. HLA Class II-specific antibodies can react with T cells in flow cytometry crossmatch: a case report. *Transplant Proc* 2007; 39: 3485–3487
- [17] Cho YW, Cecka JM. Crossmatch tests – an analysis of UNOS data from 1991–2000. *Clin Transpl* 2001; 237–246
- [18] Tait BD, Susal C, Gebel HM et al. Consensus guidelines on the testing and clinical management issues associated with HLA and non-HLA antibodies in transplantation. *Transplantation* 2013; 95: 19–47
- [19] Couzi L, Araujo C, Guidicelli G et al. Interpretation of positive flow cytometric crossmatch in the era of the single-antigen bead assay. *Transplantation* 2011; 91: 527–535
- [20] Scornik JC, Clapp W, Patton PR et al. Outcome of kidney transplants in patients known to be flow cytometry crossmatch positive. *Transplantation* 2001; 71: 1098–1102
- [21] Ishida H, Tanabe K, Furusawa M et al. Evaluation of flow cytometric panel reactive antibody in renal transplant recipients – examination of 238 cases of renal transplantation. *Transplant International* 2005; 18: 163–168
- [22] Kerman RH, Susskind B, Buyse I et al. Flow cytometry-detected IgG is not a contraindication to renal transplantation: IgM may be beneficial to outcome. *Transplantation* 1999; 68: 1855–1858
- [23] Wen R, Wu V, Dmitrienko S et al. Biomarkers in transplantation: prospective, blinded measurement of predictive value for the flow cytometry crossmatch after negative antiglobulin crossmatch in kidney transplantation. *Kidney Int* 2006; 70: 1474–1481
- [24] Matinlauri IH, Kyllonen LE, Eklund BH et al. Weak humoral posttransplant alloresponse after a well-HLA-matched cadaveric kidney transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 198–204
- [25] Panigrahi A, Deka R, Bhowmik D et al. Functional assessment of immune markers of graft rejection: a comprehensive study in live-related donor renal transplantation. *Clin Transplant* 2006; 20: 85–90
- [26] Takakura K, Kiuchi T, Kasahara M et al. Clinical implications of flow cytometry crossmatch with T or B cells in living donor liver transplantation. *Clin Transplant* 2001; 15: 309–316
- [27] Limaye S, O’Kelly P, Harmon G et al. Improved graft survival in highly sensitized patients undergoing renal transplantation after the introduction of a clinically validated flow cytometry crossmatch. *Transplantation* 2009; 87: 1052–1056
- [28] Lindemann M, Lenz V, Nyadu B et al. Effect of ABO incompatibility on T-cell flow cytometry cross-match results prior to living donor kidney transplantation. *Cytometry B Clin Cytom* 2016; doi:10.1002/cyto.b.21496
- [29] Lobo PI, Spencer CE, Stevenson WC et al. The use of pronase-digested human leukocytes to improve specificity of the flow cytometric crossmatch. *Transpl Int* 1995; 8: 472–480
- [30] Forster O, Boltz-Nitulescu G. Digestion and resynthesis of receptors binding IgG-sensitized erythrocytes on rat macrophages. *Immunology* 1982; 47: 107–114
- [31] Bearden CM, Agarwal A, Book BK et al. Pronase treatment facilitates alloantibody flow cytometric and cytotoxic crossmatching in the presence of rituximab. *Hum Immunol* 2004; 65: 803–809
- [32] Hetrick SJ, Schillinger KP, Zachary AA et al. Impact of pronase on flow cytometric crossmatch outcome. *Hum Immunol* 2011; 72: 330–336
- [33] Brody JI, Beizer LH. Alteration of blood group antigens in leukemic lymphocytes. *J Clin Invest* 1965; 44: 1582–1589