

Valutazione di una metodica immunocromatografica rapida per la determinazione del gruppo sanguigno di sistema AB nel gatto



Introduzione e scopo del lavoro - Per prevenire reazioni trasfusionali mortali è fondamentale somministrare sangue compatibile. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le performances di un test immunocromatografico per la determinazione del gruppo sanguigno nel gatto confrontandole con la metodica gold standard di agglutinazione in provetta.

Materiali e metodi - Sono stati tipizzati in doppio cieco utilizzando il test in provetta e il test immunocromatografico 50 campioni di sangue felino in EDTA. La tecnica immunocromatografica è stata impiegata inoltre per tipizzare campioni emodiluiti ed emoconcentrati, conservati con anticoagulante CPDA, a temperatura ambiente, a -20°C e a 4-6°C.

Risultati - Con tecnica in provetta 36 campioni sono risultati di gruppo A, 9 di gruppo B e 5 di gruppo AB. Sono stati ottenuti risultati identici con le due metodiche in 45/50. I valori di sensibilità e specificità relativi al test immunocromatografico sono risultati rispettivamente 97,2% e 71,4% per il gruppo A, 100% e 100% per il gruppo B, 20% e 97,7% per il gruppo AB. La concordanza è risultata buona per il gruppo A, eccellente per il gruppo B e scarsa per il gruppo AB. L'immunocromatografia ha tipizzato correttamente campioni emodiluiti, emoconcentrati, con CPDA, conservati a temperatura ambiente fino a 7 giorni e a 4-6°C fino a 4 settimane.

Discussione - L'immunocromatografia è in grado di identificare con elevata sensibilità e specificità il gruppo sanguigno A e il gruppo B, il più problematico nelle trasfusioni, mentre la maggior parte dei rari gatti di gruppo AB è stata identificata come appartenente al gruppo A.

Eva Spada^{1*},
Med Vet, PhD

Roberta Perego²,
Med Vet, PhD

Luciana Baggiani³,
Med Vet

Daniela Proverbio⁴,
Med Vet, PhD

INTRODUZIONE

La medicina trasfusionale veterinaria in Italia ha visto importanti progressi nell'ultimo decennio. Sebbene caratterizzata da alcune problematiche legate alle caratteristiche della specie e alla limitata disponibilità di materiale spe-

cificatamente dedicato, anche la medicina trasfusionale felina ha subito un forte sviluppo e con frequenza sempre maggiore un gatto oggi può donare sangue o ricevere una trasfusione ematica.

Per ridurre l'insorgenza di reazioni potenzialmente fatali nei gatti riceventi una trasfusione e per identificare i donatori di sangue più idonei è indispensabile utilizzare test per la determinazione del gruppo sanguigno di fa-

¹ Ricercatore universitario, Specialista in patologia e clinica degli animali da compagnia

² Ricercatore universitario

³ Tecnico di laboratorio specializzato

⁴ Professore associato

Dipartimento di Medicina Veterinaria (DIMEVET), Laboratorio di Ricerca di Medicina Emotrasfusionale Veterinaria (REVLab), Università degli Studi di Milano, Milano

*Corresponding Author (eva.spada@unimi.it)

Ricevuto: 09/06/2017 - Accettato: 04/10/2017

Lavoro presentato come poster al 56° congresso annuale AIVPA, 5-7 maggio 2017, Piacenza

cile e rapido impiego e di comprovata capacità nell'identificare correttamente gli antigeni eritrocitari. Nella specie felina esiste un principale sistema di gruppo sanguigno chiamato AB, all'interno del quale i soggetti possono appartenere al gruppo A, B o AB. In Italia la prevalenza del gruppo A varia dall'87,1% fino al 92,3%¹⁴ e può raggiungere il 100% nei gatti di razza Maine Coon^{4,5}, il gruppo B mostra prevalenze dal 5,1% al 12,9%, mentre il gruppo AB è il più raro, con prevalenze massime del 5,7% nei gatti in Piemonte¹⁴ e fino al 18% nei gatti di razza Ragdoll⁶. Esiste anche un gruppo sanguigno di più recente scoperta chiamato Mik⁷ per il quale i gatti attualmente non possono essere testati data l'assenza in commercio di test e reagenti specifici.

È indispensabile utilizzare test per la determinazione del gruppo sanguigno di facile e rapido impiego e di comprovata capacità nell'identificare correttamente gli antigeni eritrocitari.

Nei gatti esistono anticorpi naturali nei confronti degli antigeni eritrocitari non self, chiamati alloanticorpi, che si formano a partire da pochi mesi di età in seguito a stimolazione da parte di comuni antigeni ambientali. Questi alloanticorpi sono assenti nei gatti di gruppo AB, sono presenti in tutti i soggetti di gruppo B, in proporzioni variabili a seconda della provenienza geografica dei soggetti di gruppo A e sono presenti in alcuni soggetti Mik negativi e possono essere responsabili di gravi reazioni trasfusionali nel caso di somministrazione di sangue non compatibile, anche alla prima trasfusione in soggetti mai trasfusi⁷⁻¹². Nel gatto quindi è fondamentale valutare l'emocompatibilità prima di ogni trasfusione determinando il gruppo sanguigno e procedendo alla somministrazione di sangue di gruppo A in gatti A, di gruppo B in gatti B e di gruppo AB o A in gatti di gruppo AB. Anche in occasione della prima trasfusione in questa specie è inoltre importante eseguire le prove di compatibilità crociata (cross matching) per identificare eventuali alloanticorpi nei confronti di gruppi sanguigni che non possono essere testati¹³.

Le metodiche disponibili per la tipizzazione del gruppo sanguigno si basano su reazioni di agglutinazione che possono avvenire in provetta, su vetrino, su cartina oppure su strisce di materiale di diversa natura. L'agglutinazione in provetta è considerata il test gold standard^{14,15}, dotato di una sensibilità e specificità del 100% nell'identificare i gruppi sanguigni del sistema AB nel gatto. Si tratta però di un test che necessita di reagenti dif-

ficili da reperire (come il plasma di gruppo B o la lectina del *Triticum vulgare*), di personale esperto per la sua realizzazione e di lunghi tempi di esecuzione (circa 55 minuti). Per tali motivi questa tecnica viene di solito utilizzata nei centri trasfusionali per confermare i gruppi sanguigni che hanno mostrato le maggiori problematiche di tipizzazione, come il gruppo B e AB¹⁴⁻¹⁸. Esistono poi kit ad uso ambulatoriale di più pratica e rapida realizzazione, tra i quali i test basati sulla tecnica immunocromatografica commercializzati di recente^{17,18}. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la performance diagnostica di un test immunocromatografico rapido per la determinazione del gruppo sanguigno A, B e AB nel gatto, confrontandola con la metodica gold standard di agglutinazione in provetta. Lo studio ha valutato l'applicabilità di questo kit in campioni con differenti caratteristiche (con Hct normale, inferiore e superiore ai valori di normalità), miscelati a diverse soluzioni anticoagulanti (acido etilendiamminotetracetico - EDTA e citrato, fosfato, destrosio, adenina - CPDA) e conservati a diverse temperature e per intervalli temporali differenti.

MATERIALI E METODI

Per realizzare questo studio sono stati tipizzati in doppio cieco con metodo di agglutinazione in provetta e con test immunocromatografico rapido (RapidVet®-H IC® Feline Blood Typing; Agrolabo, Scarmagno, Torino) 50 campioni di sangue in EDTA prelevati da 42 gatti non anemici (Hct medio \pm DS 34,3% \pm 8,2, range 24-45%) e da 8 gatti anemici (Hct medio \pm DS 16,5% \pm 5,1, range 8,3-22%). I gatti risultati di gruppo sanguigno B o AB con la tecnica gold standard sono stati confermati con tecnica che identifica gli alloanticorpi (back typing)^{14,15}. Prima della determinazione del gruppo sanguigno i cam-

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la performance diagnostica di un test immunocromatografico rapido per la determinazione del gruppo sanguigno A, B e AB.

pioni sono stati valutati per la presenza di emolisi e autoagglutinazione. La presenza o assenza di emolisi è stata registrata valutando la colorazione del plasma del campione di sangue intero dopo centrifugazione a 1500 x g per 10 minuti. La presenza o assenza di agglutinazione è stata registrata valutando macro- e/o microscopicamente (ingrandimento a 40X) una goccia di sangue del campione precedentemente miscelata a una goccia di soluzione fisiologica.

Le performances del test immunocromatografico sono

Tabella 1 - Tipologia di campioni ematici analizzati per valutare le performances di una tecnica immunocromatografica rapida per la determinazione del gruppo sanguigno di sistema AB nel gatto
Tipologia di campione analizzato
42 campioni con normale Hct (24-45%)
8 campioni con Hct <24%
5 campioni con Hct <10% (diluiti con soluzione fisiologica)
5 campioni con Hct > 45% (concentrati riducendo la quota plasmatica)
5 campioni con anticoagulante CPDA (da sacche di sangue felino)
3 campioni conservati a T ambiente testati ogni 7 gg per 4 settimane
3 campioni conservati a 4-6°C testati ogni 7 gg per 4 settimane
3 campioni conservati a -20°C testati ogni 7 gg per 4 settimane

state valutate anche nella tipizzazione di 5 campioni artificialmente emodiluiti con soluzione fisiologica (Hct<10%) e di 5 campioni emoconcentrati (Hct>45%), ottenuti eliminando parte del plasma. Sono stati inoltre testati 5 campioni di sangue provenienti da sacche di sangue intero felino con anticoagulante CPDA (citrato-fosfato-destrosio-adenina) (Hct medio \pm DS 31% \pm 7,2%, range 27-42%). Infine 3 campioni di sangue in EDTA conservati a temperatura ambiente, 3 campioni congelati a -20°C e 3 refrigerati a 4-6°C sono stati testati ogni 7 giorni per 4 settimane. Per valutare la ripetibilità della metodica un campione di ciascun gruppo sanguigno infine è stato ritestato 10 volte. Le caratteristiche dei campioni analizzati sono riassunte nella Tabella 1. Per realizzare questo studio è stata impiegata l'eccedenza di campioni tipizzati per motivi clinici, per questo non è stata necessaria l'approvazione del comitato etico per la sua realizzazione. I proprietari dei pazienti hanno dato il loro consenso per l'utilizzo a scopo di ricerca dell'eccedenza dei campioni ematici prelevati a scopo clinico.

Test immunocromatografico rapido

Il test immunocromatografico utilizzato si basa sulla migrazione degli eritrociti di gatto su strisce reattive poste in tre zone distinte di un supporto in plastica a forma di mezzaluna, una striscia per il gruppo A, una per il gruppo B e una per il controllo, sulle quali sono presenti anticorpi specifici rispettivamente anti-A, anti-B e anti-eritrociti di gatto. Gli eritrociti migrano sulla membrana e, a seconda degli antigeni esposti, vanno a legarsi all'an-

ticorpo specifico per il gruppo sanguigno sviluppando una banda di colorazione rossa. Ogni kit monouso si presenta in un incarto singolo da conservare a temperatura ambiente contenente un dispositivo a mezzaluna con un pozzetto centrale e tre finestre denominate "Type A", "Type B" e "Control", una provetta contenente un diluente, una pipetta monouso e un flacone di diluente con tappo dosatore. Utilizzando sangue con anticoagulante (la ditta produttrice indica l'utilizzo di sangue con anticoagulante EDTA o eparina), dopo aver posizionato il dispositivo su di una superficie piana, con l'impiego della pipetta fornita nel kit, viene dispensata e miscelata con il diluente una goccia di campione all'interno della specifica provetta. Vengono poi prelevate e dispensate nella finestra centrale del dispositivo 3 gocce del campione di sangue diluito e successivamente 3 gocce di diluente. Al termine dei 10 minuti di attesa della migrazione, la comparsa di una linea rossa verticale nel pozzetto "Type A" indica che il gruppo sanguigno è A, una linea rossa verticale nel pozzetto "Type B" indica che il gruppo è B, mentre una linea rossa verticale in entrambi i pozzetti indica l'appartenenza del campione al gruppo AB. Nel-

Gli eritrociti migrano sulla membrana e, a seconda degli antigeni esposti, vanno a legarsi all'anticorpo specifico per il gruppo sanguigno sviluppando una banda di colorazione rossa.

la finestra del controllo deve sempre apparire una linea rossa orizzontale perché i risultati siano ritenuti validi.

Test di agglutinazione in provetta

Questa tecnica utilizza come reagente per l'identificazione degli eritrociti di gruppo A, il plasma di un gatto di gruppo B e come reagente per identificare gli eritrociti di gruppo B, la lectina del *Triticum vulgare*, sostanza che lega le sialoglicoproteine contenute nell'acido N-acetilneuraminico (l'unico presente nei gatti di gruppo B e presente in limitate quantità sugli eritrociti di gruppo A), ma non quelle contenute nell'acido N-glicolilneuraminico (presente sugli eritrociti di gruppo A)^{19,20}. Brevemente, il campione di sangue da testare viene centrifugato per separare il plasma dal pellet di globuli rossi. I globuli rossi vengono lavati per 3 volte con soluzione fisiologica e al termine dei lavaggi viene preparata una sospensione al 5% di globuli rossi del campione da testare (475 μ L di soluzione fisiologica e 25 μ L di globuli rossi lavati). In tre provette di vetro vengono aggiunti 50 μ L della sospensione al 5% dei globuli rossi lavati da testare e nella prima provetta identificata con A vengono aggiunti 100 μ L di plasma di gatto B, nella seconda provetta identificata con B, 100 μ L di soluzione contenente la lecti-

na del *Triticum vulgare*, mentre nell'ultima provetta identificata come controllo si aggiungono 100 µL di soluzione fisiologica. Le provette vengono poi incubate a temperatura ambiente per 15 minuti e, successivamente, centrifugate a 1200 x g per 15 secondi. Dopo centrifugazione i globuli rossi vengono risospesi agitando delicatamente la provetta e la presenza/assenza di agglutinazione viene valutata macroscopicamente. I campioni risultano di gruppo sanguigno A se l'agglutinazione si verifica nella provetta identificata con A, di gruppo B se si verifica nella provetta B e di gruppo AB se si verifica in entrambe le provette.

Test degli alloanticorpi (back typing)

Questo test serve per confermare l'appartenenza al gruppo sanguigno B o AB di un campione di sangue. Il principio si basa sulla ricerca degli alloanticorpi rivolti verso gli antigeni degli eritrociti di gruppo A, sempre presenti nei soggetti di gruppo sanguigno B e invece assenti nei gatti di gruppo AB. Brevemente, 50 µL di plasma dei gatti risultati di gruppo B o AB viene aggiunto ad una provetta contenente 25 µL di sospensione al 5% di pellet di eritrociti di gruppo A. Dopo incubazione a temperatura ambiente per 15 minuti e successiva centrifugazione a 1200 x g per 15 secondi, i globuli rossi vengono risospesi tramite delicata agitazione della provetta. La presenza di agglutinazione macroscopicamente visibile sarà presente in caso di plasma di gruppo B e assente in caso di plasma appartenente ad un gatto di gruppo AB.

Analisi statistica

I risultati di entrambe le tecniche sono stati analizzati statisticamente per calcolare sensibilità (Se), specificità (Sp), valore predittivo positivo (VPP), valore predittivo negativo (VPN) del metodo immunocromatografico rispetto all'agglutinazione in provetta. La concordanza dei risultati è stata valutata tramite test Cohen (test di Kappa non pesato). Ai valori di Kappa (K) è stato attribuito il seguente grado di concordanza²¹:

- <0,40 scarsa
- 0,41-0,60 moderata
- 0,61-0,80 buona
- 0,81-1,00 eccellente

La valutazione statistica è stata effettuata utilizzando il software statistico MedCalc (versione 16.4.3). I risultati

sono stati espressi come valore % e indice di confidenza al 95% (95%CI).

RISULTATI

Nessun campione ha mostrato emolisi o autoagglutinazione. Con tecnica di agglutinazione in provetta 36 campioni (72%) sono risultati di gruppo A, 9 (18%) di gruppo B e 5 (10%) di gruppo AB.

Il test immunocromatografico è stato in grado di tipizzare tutti i campioni, mostrando una buona concordanza generale con i risultati della tecnica gold standard (K=0,75, 95%CI 0,55-0,95) con risultati identici ottenuti in 45 su 50 campioni (90%) (Tabella 2). Esempi di campioni risultati di gruppo A e B sono riportati rispettivamente nella Figura 1a e 1b.

I 5 campioni non concordanti sono risultati 4 campioni AB tipizzati come A dall'immunocromatografia e un campione di gruppo A erroneamente identificato come AB (Tabella 2). I valori di Se, Sp, VPP, VPN e di Kappa per ogni gruppo sanguigno (Tabella 3) hanno indicato buone performances del test immunocromatografico

Il test immunocromatografico è stato in grado di tipizzare tutti i campioni, mostrando una buona concordanza generale con i risultati della tecnica gold standard (K=0,75, 95%CI 0,55-0,95).

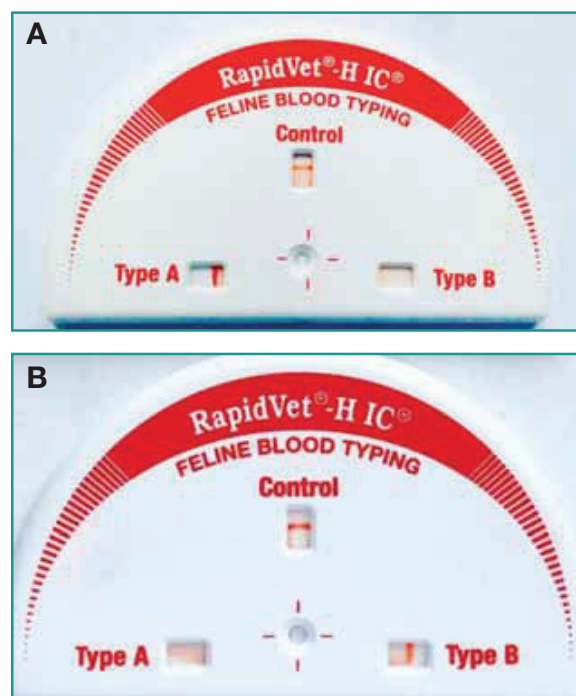


Figura 1 - Campioni di sangue di gatto in EDTA analizzati con tecnica immunocromatografica rapida e risultati di gruppo A (1A) e B (1B).

I risultati di entrambe le tecniche sono stati analizzati statisticamente per calcolare sensibilità (Se), specificità (Sp), valore predittivo positivo (VPP), valore predittivo negativo (VPN) del metodo immunocromatografico.

Tabella 2 - Risultati della tipizzazione di 50 campioni di sangue di gatto in EDTA analizzati con tecnica gold standard di agglutinazione in provetta e con tecnica immunocromatografica

Immunocromatografia	Agglutinazione in provetta			
	A	B	AB	Totale
A	35	0	4	39
B	0	9	0	9
AB	1	0	1	2
Totale	36	9	5	50

nell'identificazione del gruppo A ed eccellente del gruppo B. È risultata invece scarsa la capacità di tipizzare correttamente i campioni di gruppo AB che nella maggior parte dei casi (4/5) sono stati identificati come appartenenti al gruppo A dalla tecnica immunocromatografica.

Il test immunocromatografico è stato in grado di tipizzare tutti i campioni emodiluiti, emoconcentrati, con anticoagulante EDTA e con CPDA, i campioni conservati a temperatura ambiente fino a 7 giorni e campioni conservati a 4-6°C fino a 4 settimane. Il test non è invece riuscito a tipizzare i campioni congelati. I risultati dei campioni ripetuti 10 volte hanno mostrato una ripetibilità del 100%.

DISCUSSIONE

Come in medicina canina, anche in medicina trasfusionale felina è fondamentale avere a disposizione test per la determinazione del gruppo sanguigno di rapido e semplice impiego da utilizzare in situazioni di urgenza. La rapidità di esecuzione non deve però andare a discapito dell'accuratezza del test, perché questo potrebbe aumentare l'insorgenza di reazioni trasfusionali mortali che nel gatto possono verificarsi anche alla prima trasfusione in un gatto di gruppo B trasfuso con sangue di gruppo A⁸⁻¹². Nella specie felina, infatti, le reazioni trasfusionali im-

munologiche più gravi sono causate dalla presenza nei soggetti di gruppo sanguigno B degli alloanticorpi rivolti verso gli antigeni eritrocitari A. Questi anticorpi sono rappresentati da immunoglobuline ad alto titolo (da >1:32 fino a 1:2048) ad azione emolizzante (IgG e IgM) e agglutinante (IgM) e possono essere responsabili di gravi reazioni mortali anche in seguito all'inoculo di solo 1 ml di sangue di gruppo A⁸. Il gruppo sanguigno B mostra prevalenze variabili nei gatti indagati in Italia che vanno dal 5,1% in gatti donatori del nord e centro Italia⁴ al 12,9% in gatti del centro Italia¹. Questi soggetti di gruppo B possono sviluppare reazioni trasfusionali mortali se non correttamente tipizzati. È quindi fondamentale avere a disposizione non solo test di rapida esecuzione, ma soprattutto con sensibilità e specificità del 100% nell'identificare i gatti di gruppo B, che il test di immunocromatografia rapida valutato in questo studio ha dimostrato di possedere.

Soggetti di gruppo B possono sviluppare reazioni trasfusionali mortali se non correttamente tipizzati.

Per la presenza e le caratteristiche degli alloanticorpi i gatti devono essere trasfusi con sangue dello stesso gruppo sanguigno nei quali le prove di compatibilità crocia-

Tabella 3 - Valori in percentuale di sensibilità (Se), specificità (Sp), valore predittivo positivo (VPP), valore predittivo negativo (VPN) e valore di Kappa del test immunocromatografico rapido confrontato al test di agglutinazione in provetta per la determinazione del gruppo sanguigno in 50 campioni di sangue intero di gatto con anticoagulante EDTA

Gruppo	Se (95%CI)	Sp (95%CI)	VPP (95%CI)	VPN (95%CI)	KAPPA
A	97,2 (85,4-99,9)	71,4 (41,9-91,6)	89,7 (79,2-95,2)	90,9 (58,4-98,6)	0,73
B	100 (66,3-100)	100 (91,4-100)	100	100	1,00
AB	20 (0,5-71,6)	97,7 (88,2-99,9)	50 (6,8-93,1)	91,6 (87,6-94,4)	0,24

ta risultino negative per agglutinazione e/o emolisi. I gatti con gruppo sanguigno AB sono molto rari nella popolazione felina generale con prevalenze che vanno dallo 0% in gatti del centro Italia¹ al 5,7% in gatti del nord Italia². Questa caratteristica epidemiologica comporta spesso l'estrema difficoltà di avere a disposizione gatti donatori o unità ematiche di gruppo AB. Data l'assenza di alloanticorpi in questi soggetti è possibile trasfondere sangue di gruppo A, purché le prove di compatibilità crociata (cross-matching) risultino negative¹³. Le prove di compatibilità potrebbero dare esito positivo e quindi indicare un'incompatibilità tra il ricevente di gruppo AB e il donatore di gruppo A nel caso quest'ultimo abbia alloanticorpi anti-B. In questo caso si può procedere alla somministrazione del concentrato di eritrociti di gruppo A, evitando di somministrare la componente plasmatica contenente gli alloanticorpi anti-B. La metodica immunocromatografica valutata nel nostro studio ha mostrato di confondere spesso i campioni di gruppo AB tipizzandoli erroneamente come A. Questo errore potrebbe non avere gravi conseguenze cliniche, ma deve essere tenuto in considerazione nelle razze in cui la prevalenza del gruppo AB è elevata come nei gatti di razza Ragdoll⁶, che potrebbero essere selezionati come donatori di plasma "universale". Inoltre questo limite rende la metodica immunocromatografica valutata inadatta per la realizzazione di studi epidemiologici nei quali si voglia indagare la distribuzione dei tre gruppi sanguigni

La possibilità di tipizzare il gruppo sanguigno anche con anticoagulanti comunemente utilizzati in medicina trasfusionale come il CPDA, può risultare utile nel caso si debbano fare degli esami di controllo sulle sacche di sangue.

nella popolazione felina, poiché non svelerebbe la reale prevalenza dei gruppi sanguigni A e AB. I risultati dello studio presentato concordano con una precedente valutazione di questa tecnica eseguita nel lavoro di Hourani e coll.¹⁷. Come in questo lavoro, infatti, le performances nell'identificazione dei campioni di gruppo A e B sono risultate elevate, ma sono emerse le stesse difficoltà di tipizzazione relative al gruppo AB. Le difficoltà di tipizzazione che questo e altri metodi, come ad esempio l'agglutinazione su cartina, hanno mostrato nei confronti dei gatti di gruppo AB^{3,14-16} potrebbero derivare dall'esistenza di almeno due fenotipi di eritrociti appartenenti al gruppo AB che differiscono nella quantità di antigene A espresso sulla superficie degli eritrociti stessi²². Diversamente dai risultati dello studio di Hourani e coll.¹⁷, nessun campione del nostro studio

ha mostrato risultati inconclusivi. Questo potrebbe derivare da interventi di miglioramento relativi alla produzione del kit realizzati in questi anni dall'azienda produttrice.

Gli unici campioni che la tecnica immunocromatografica non è stata in grado di tipizzare sono stati quelli di sangue congelato. Questo risultato, riscontrato anche utilizzando altri metodi che si basano sulla reazione tra antigene e anticorpo¹⁸, può essere giustificato dal fatto che durante il congelamento la membrana eritrocitaria va incontro a completa lisi.

La tecnica immunocromatografica è stata in grado di tipizzare campioni conservati refrigerati fino a un mese

Il kit è in grado di identificare con elevata sensibilità e specificità il gruppo sanguigno A, maggiormente diffuso nella popolazione felina e il gruppo B, il più problematico nelle trasfusioni ematiche feline.

e fino a 7 giorni a temperatura ambiente. Questa caratteristica può risultare utile qualora si richieda al laboratorio la determinazione del gruppo sanguigno del paziente in tempi successivi a quelli delle analisi di base, oppure quando lo stesso campione viene spedito a un laboratorio esterno e non si è certi del rispetto delle temperature di conservazione durante la spedizione.

La possibilità di tipizzare il gruppo sanguigno anche in campioni con anticoagulanti comunemente utilizzati in medicina trasfusionale come il CPDA, può risultare utile nel caso si debbano fare degli esami di controllo sulle sacche di sangue. In particolare, questa capacità di tipizzare anche i campioni con CPDA potrebbe risultare utile per eseguire test di controllo in seguito all'insorgenza di reazioni trasfusionali fatali in soggetti riceventi di gruppo sanguigno apparentemente compatibile, nei quali si voglia escludere un errore di tipizzazione del sangue del donatore conservato nelle unità ematiche.

Le principali limitazioni di questo studio sono rappresentate dalla scarsa numerosità dei campioni valutati e dal non aver valutato le performances della tecnica immunocromatografica in campioni autoagglutinanti o emolitici. Sia l'autoagglutinazione che l'emolisi possono interferire con le metodiche di emotipizzazione e si possono riscontrare in pazienti con forme di anemia di origine autoimmune (come in corso di anemia immunomediata o da infezione da FeLV o emoplasmi) o tossica (come in caso di intossicazione da paracetamolo), condizioni patologiche che spesso richiedono una trasfusione ematica come terapia di supporto. Infine, non sono state analizzate le condizioni di salute dei soggetti dai quali provenivano i campioni tipizzati, informazioni che potevano risultare utili per valutare e caratterizzare even-

tuali possibili differenze di performance. Da alcuni studi^{15,17} è infatti emerso come spesso ci siano difficoltà di tipizzazione nei soggetti anemici affetti da virus della leucemia felina virale (FeLV).

In conclusione il test immunocromatografico RapidVet®-H IC® Feline Blood Typing risulta un test di rapida e sem-

plice esecuzione, in grado di identificare con elevata sensibilità e specificità il gruppo sanguigno A, maggiormente diffuso nella popolazione felina¹⁻⁶ e il gruppo B, il più problematico nelle trasfusioni ematiche feline⁹⁻¹². Con questa tecnica la maggior parte dei rari gatti di gruppo AB è stata identificata come appartenente al gruppo A.

PUNTI CHIAVE

- Per prevenire reazioni trasfusionali mortali nel gatto è fondamentale somministrare sangue compatibile già dalla prima trasfusione.
- I test per la determinazione del gruppo sanguigno dovrebbero essere di rapido e semplice impiego e di comprovata capacità nell'identificare correttamente il gruppo sanguigno.
- Il test immunocromatografico RapidVet®-H IC® Feline Blood Typing ha mostrato una buona concordanza con l'agglutinazione in provetta (K=0,75) con risultati identici ottenuti in 45 su 50 campioni (90%).
- L'immunocromatografia risulta un test in grado di identificare con elevata sensibilità e specificità i gruppi sanguigni A e B.
- Con l'immunocromatografia i rari gatti di gruppo AB possono essere erroneamente identificati come di gruppo A.

Evaluation of an immunochromatographic technique for AB system feline blood typing

Summary

Introduction and aim of the study - Administration of compatible blood is a prerequisite to prevent fatal transfusion reactions in cats. The purpose of this study was to evaluate the performance of a rapid immunochromatographic test for feline blood typing comparing the results with the gold standard technique of tube agglutination.

Materials and methods - Fifty blood samples in EDTA were blood typed in duplicate by tube agglutination and by an immunochromatographic technique. Immunochromatography was also used to type hemodiluted and bemoconcentrated samples, samples anticoagulated with CPDA anticoagulant, and stored at room temperature, at either -20°C or 4-6°C.

Results - The tube technique recorded 36 samples as type A, 9 type B and 5 type AB. Results were identical with the two methods in 45/50 samples with good concordance. Sensitivity and specificity of the immunochromatographic technique were respectively 97.2% and 71.4% for type A, 100% and 100% for type B, 20% and 97.7% respectively for type AB. Concordance was good for type A, excellent for type B and poor for type AB. Immunochromatography was able to correctly type hemodiluted and bemoconcentrated samples, samples anticoagulated with CPDA, and samples stored at room temperature for up to 7 days and at 4-6 °C for up to 4 weeks.

Discussion - Immunochromatography is able to identify, with high sensitivity and specificity, both type A and type B blood groups, which are the most problematic in transfusion medicine. Using immunochromatography cats with the rare AB group are generally mistakenly typed as group A.

BIBLIOGRAFIA

1. Continenza R, Lubas G, Gigliucci B. Indagini preliminari sul sistema di gruppo sanguigno AB nel gatto allevato in Italia. XLVI Congresso SISVet, Venezia, 1992, pp. 1470-1477.
2. Cavana P, Picco S, Bellino C *et al.* Distribuzione dei gruppi sanguigni nei gatti della regione Piemonte (Italia). 55° Congresso Nazionale SCIVAC-SIMEF Medicina Felina "Le nuove acquisizioni nella pratica clinica", Milano, 2007, pp. 439-440.
3. Proverbio D, Spada E, Baggiani L *et al.* Comparison of gel column agglutination with monoclonal antibodies and card agglutination methods for assessing the feline AB group system and a frequency study of feline blood types in northern Italy. Veterinary Clinical Pathology 40:32-39, 2011.
4. Spada E, Miglio A, Proverbio D *et al.* Signalment and blood types in cats being evaluated as blood donors at two Italian university blood banks. Veterinary Medicine International Article ID:704836:1-3, 2014.
5. Spada E, Antognoni MT, Proverbio D *et al.* Haematological and biochemical reference intervals in adult Maine Coon cat blood donors. Journal of Feline Medicine and Surgery 17:1020-1027, 2015.
6. Proverbio D, Spada E, Perego R *et al.* Assessment of blood types of

- Ragdoll cats for transfusion purposes. *Veterinary Clinical Pathology* 42:157-162, 2013.
7. Weinstein NM, Blais M-C, Harris K *et al.* A newly recognized blood group in domestic shorthair cats: the mik red cell antigen. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21:287-292, 2007.
 8. Bucheler J, Giger U. Alloantibodies against A and B blood types in cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 38:283-295, 1993.
 9. Giger U, Akol KG. Acute hemolytic transfusion reaction in an Abyssinian cat with blood type B. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 4:315-316, 1990.
 10. Giger U, Bucheler J. Transfusion of type-A and type-B blood to cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 198:411-418, 1991.
 11. Auer L, Bell K. Transfusion reactions in cats due to AB blood group incompatibility. *Research in Veterinary Science* 35:145-152, 1983.
 12. Auer L, Bell K, Coates S. Blood transfusion reactions in the cat. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 180:729-730, 1982.
 13. Spada E, Baggiani L. Test di compatibilità pretrasfusionale. In: Proverbio D. Ed. *Manuale di medicina trasfusionale del cane e del gatto*. Milano: Point Veterinarie Italie, 2017, pp. 127-134.
 14. Stieger K, Palos H, Giger U. Comparison of various blood-typing methods for the feline AB blood group system. *American Journal of Veterinary Research* 66:1393-1399, 2005.
 15. Seth M, Jackson KV, Giger U. Comparison of five blood-typing methods for the feline AB blood group system. *American Journal of Veterinary Research* 72:203-209, 2011.
 16. Proverbio D, Spada E, Baggiani L *et al.* Assessment of a gel column technique for feline blood typing. *Veterinary Research Communications* 33S:201-203, 2009.
 17. Hourani L, Weingart C, Kohn B. Evaluation of a novel feline AB blood typing device. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16:826-831, 2014.
 18. Spada E, Proverbio D, Baggiani L *et al.* Evaluation of an immunochromatographic test for feline AB system blood typing. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 26:137-141, 2016.
 19. Bhavanandan VP, Katlic AW. The interaction of wheat germ agglutinin with sialoglycoproteins. *The Journal of Biological Chemistry* 254:4000-4008, 1979.
 20. Butler M, Andrews GA, Smith JE. Reactivity of lectins with feline erythrocytes. *Comparative Haematology International* 1:217-219, 1991.
 21. Cohen J. A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement* 20:37-46, 1960.
 22. Green JL, Andrews GA, Wyatt CR. Phenotypic differences within the AB blood type of the feline AB blood group system. *Comparative Clinical Pathology* 14:138-145, 2005.

COMPRAVENDITA DI ATTREZZATURE PROFESSIONALI VETERINARIE

VET-EXCHANGE è il servizio telematico, libero e gratuito riservato ai soli medici veterinari. Questo servizio ha l'unico scopo di consentire un più facile contatto tra soggetti interessati alla compravendita di attrezzature professionali veterinarie. **Non è consentito l'accesso alle aziende del settore.**

Il portale registra più di 20.000 visite mensili, con una media di 200 annunci al mese.

Per inserire la propria offerta o richiesta è necessaria la registrazione al servizio tramite un modulo on-line. Al ter-

mine della registrazione il sistema fornirà all'utente un codice che, insieme alla password, consentirà di accedere all'area riservata per modificare/integrare/cancellare la propria scheda prodotti e la scheda dati personale. Le inserzioni permangono in rete per 90 giorni; alla scadenza di questo periodo vengono rimosse automaticamente.

Registrazione e condizioni d'uso dettagliate al sito:
<http://www.vetexchange.it/>



VET-EXCHANGE
 IL MERCATO ITALIANO DELLE ATTREZZATURE PROFESSIONALI VETERINARIE
 Servizio on-line dell'A.N.M.V.I.