

Université de Montréal

Avancées en médecine transfusionnelle féline

*De l'optimisation du prélèvement à la découverte de nouveaux antigènes érythrocytaires*

*Par*

Marie Binvel

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire  
en vue de l'obtention du grade de *Maîtrise ès sciences* (M.Sc.)  
en sciences vétérinaires, option sciences cliniques

Juillet 2020

© Marie Binvel, 2020

Université de Montréal

Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire

---

*Ce mémoire intitulé*

**Avancées en médecine transfusionnelle féline**

***De l'optimisation du prélèvement à la découverte de nouveaux antigènes érythrocytaires***

*Présenté par*

**Marie Binvel**

*A été évalué par un jury composé des personnes suivantes*

**Aude Castel**

Présidente-rapporteuse

**Marie-Claude Blais**

Directrice de recherche

**Mathilde Leclère**

Membre du jury

## Résumé

La médecine transfusionnelle féline a connu une croissance exponentielle au cours des dix dernières années. La découverte du système de groupes sanguins AB et la meilleure compréhension des mécanismes d'incompatibilité donneur-receveur, ainsi que le développement de systèmes de collecte adaptés au chat et de techniques de typage sanguin au chevet du patient ont permis d'améliorer la sécurité des transfusions.

Notre travail s'est intégré dans cette volonté d'optimiser la sécurité des transfusions sanguines chez le chat en se concentrant sur deux aspects différents : le prélèvement de sang et les antigènes érythrocytaires à l'origine d'incompatibilités donneur-receveur non expliquées par le système AB.

Dans un premier temps, un système de collecte de sang adapté au chat a été fabriqué afin de permettre un prélèvement fermé et autoriser le stockage des produits sanguins. Ce système a été comparé à un système ouvert composé de seringues. Le système fermé apparaît adapté au prélèvement de sang car aucune différence significative n'a été enregistrée dans les paramètres vitaux des donneurs après le prélèvement, le succès du prélèvement, ou la qualité du produit sanguin en termes de contamination bactérienne et d'hémolyse, entre les deux systèmes. Le net avantage du système fermé est qu'il assure un temps de prélèvement plus rapide que le système ouvert.

Dans un second temps, en réalisant des tests de compatibilité chez 258 chats de type A, nous avons montré que la probabilité de détecter des incompatibilités entre deux chats de groupe A sélectionnés aléatoirement était de 3.9 %, et que 7 % des chats de groupe A présentaient des allo-anticorps naturels extérieurs au système AB. Sept des 18 allo-anticorps naturels détectés ont été utilisés comme réactifs lors d'un typage sanguin extensif. Les analyses sur l'accord des résultats du typage obtenus avec les différents réactifs ont permis d'identifier cinq nouveaux antigènes érythrocytaires félines différents, nommés FEA 1 à FEA 5 (pour *feline erythrocyte antigen*), dont l'hérédité, la prévalence, la distribution géographique et par race, ainsi que l'immunogénicité restent encore à déterminer.

**Mots-clés** : Transfusion, produits sanguins, systèmes de collecte, contamination, typage sanguin, groupes sanguins, antigènes érythrocytaires, compatibilité, cross-match, réactions transfusionnelles

## Abstract

Feline transfusion medicine has grown exponentially over the past decade. The discovery of the AB blood group system and the better understanding of the mechanisms of donor-receiver incompatibility, as well as the development of cat-friendly collection systems and bedside blood typing techniques have improved transfusion safety.

Our work has been part of this effort to optimize the safety of blood transfusions in cats by focusing on two different aspects: blood collection and red blood cell antigens that cause donor-recipient incompatibilities unexplained by the AB system.

First, a blood collection system adapted to the cat was manufactured to allow collection in a closed-system and storage of blood products. This system was compared to an open system consisting of syringes. The closed system appeared well-adapted for feline blood collection because no significant difference was found in the vital parameters of the donors after collection, the success of the collection, or the quality of the blood product in terms of bacterial contamination and hemolysis. The distinct advantage of the closed system was that it provided a shorter duration of collection than the open system.

Secondly, based on the systematic crossmatches of 258 cats, we showed that the probability of detecting incompatibilities by randomly crossmatching two type A cats was 3.9 %, which resulted in at least 7 % of type A cats having naturally occurring alloantibodies outside the AB blood group system. Seven of the 18 detected naturally occurring alloantibodies were used as reagents in an extensive blood typing. Comparison of the results obtained from this extensive blood typing supports the existence of five, presumably different, new feline erythrocyte antigens, named FEA 1 to FEA 5, whose mode of inheritance, geographical and breed distribution, frequency and immunogenicity have yet to be determined.

**Keywords:** Transfusion, blood products, collection systems, contamination, blood typing, blood groups system, erythrocyte antigens, compatibility, crossmatch, transfusion reactions

# Table des matières

Résumé .....	3
Abstract .....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux .....	12
Liste des figures .....	14
Liste des abréviations .....	16
Remerciements.....	18
Introduction.....	20
Chapitre I – La collecte de sang chez le chat .....	22
1. Produits sanguins et indications de la transfusion chez le chat .....	22
1.1. Présentation des produits sanguins utilisés chez le chat.....	22
1.1.1. Sang entier.....	22
1.1.2. Concentré de globules rouges .....	23
1.1.3. Plasma.....	24
1.1.4. Récapitulatif.....	25
1.2. Principales utilisations des produits sanguins chez le chat.....	26
1.2.1. Transfusions de globules rouges.....	26
1.2.2. Transfusions de plasma .....	27
2. Recrutement des donneurs .....	28
2.1. Qualités d’un bon donneur .....	28
2.2. Gestion du risque de transmission de maladies infectieuses .....	29
3. Prélèvement du sang.....	31

3.1. Systèmes de collecte chez le chat .....	31
3.1.1. Systèmes ouverts.....	31
3.1.2. Systèmes semi-fermés.....	32
3.1.3. Systèmes fermés.....	32
3.2. Réalisation pratique du prélèvement de sang .....	33
3.2.1. Examen du donneur .....	33
3.2.2. Préparation du prélèvement .....	33
3.2.3. Sédation du donneur .....	34
3.2.4. Prélèvement .....	35
3.2.5. Effets secondaires sur le donneur .....	36
4. Conservation des produits sanguins.....	37
4.1. Différents anticoagulants et agents de conservation .....	37
4.1.1. Anticoagulants sans agent de conservation .....	37
4.1.2. Anticoagulants avec agents de conservation .....	38
4.2. Conditions de stockage du sang entier et des concentrés de globules rouges.....	39
4.3. Qualité des produits sanguins conservés.....	40
4.3.1. Estimation in vivo de la viabilité des globules rouges.....	40
4.3.2. Estimation in vitro de la viabilité des globules rouges.....	40
4.3.3. Contamination et prolifération bactérienne .....	42
4.4. Durée de conservation.....	46
4.5. Impact possible du stockage sur le receveur .....	47
Chapitre II – Les antigènes érythrocytaires du chat .....	49
1. Découverte du système AB chez le chat.....	49
1.1. Définition générale .....	49
1.2. Histoire du système AB .....	49
1.3. Hérité dans le système AB .....	50

1.3.1. Mode de transmission des groupes A et B .....	50
1.3.2. Cas du groupe AB.....	51
2. Épidémiologie des groupes A, B et AB.....	52
2.1. Distribution en fonction de la localisation géographique .....	52
2.2. Distribution en fonction de la race .....	54
3. Caractéristiques biologiques du système AB.....	57
3.1. Biochimie des antigènes sanguins du système AB.....	57
3.1.1. Identification moléculaire.....	57
3.1.2. Cytidine monophospho-acide- N-acétylneuraminique hydroxylase .....	58
3.2. Bases génétiques du système AB.....	59
3.2.1. Découverte du polymorphisme du gène de la CMAH .....	59
3.2.2. Identification de nouvelles mutations .....	60
3.2.3. Tests génétiques .....	61
3.3. Résumé des caractéristiques biologiques du système AB .....	63
4. Allo-anticorps naturels dans le système AB.....	63
4.1. Rappel sur les anticorps .....	63
4.1.1. Structure des anticorps.....	63
4.1.2. Notion d'allo-anticorps naturels.....	64
4.2. Réactions anticorps-antigènes érythrocytaires .....	65
4.2.1. Agglutination .....	65
4.2.2. Hémyolyse .....	66
4.2.3. Étude in vitro .....	67
4.3. Caractérisation des allo-anticorps naturels dans le système AB.....	67
4.3.1. Allo-anticorps des chats de groupe B .....	67
4.3.2. Allo-anticorps des chats de groupe A .....	68
4.3.3. Résumé .....	69

4.4. Anticorps polyclonaux versus monoclonaux.....	70
5. Méthodes de détermination des groupes sanguins du système AB .....	72
5.1. Principe général .....	72
5.2. Méthodes de typage sanguin au chevet du patient.....	72
5.2.1. Cartes d'agglutination.....	72
5.2.2. Immunochromatographie.....	74
5.2.3. Tube de gel .....	76
5.3. Méthodes de typage sanguin en laboratoire .....	77
5.3.1. Méthode en tube ou sur lame .....	77
5.3.2. Technique sur colonne de gel .....	78
5.3.3. La cytométrie en flux .....	79
5.4. Erreur de classification et « back typing » .....	80
5.4.1. Les erreurs de typage .....	80
5.4.2. « Back-typing » .....	80
6. Tests de compatibilité : cross-match .....	81
6.1. Principe général des cross-matches majeur et mineur.....	81
6.1.1. Échantillons nécessaires .....	81
6.1.2. Cross-match majeur et mineur .....	82
6.2. Différentes techniques de cross-match .....	82
6.2.1. Micro-titration .....	83
6.2.2. Colonne de gel neutre .....	83
6.2.3. Colonne de gel avec anti-globulines .....	84
6.2.4. Tube de gel .....	85
6.2.5. Immunochromatographie.....	85
7. D'autres systèmes de groupe sanguin.....	86
7.1. Incompatibilités en dehors du système AB.....	86

7.2. Découverte de l'antigène Mik.....	87
8. Importance clinique des antigènes érythrocytaires et de leurs allo-anticorps .....	88
8.1. Isoérythrolyse néonatale .....	88
8.1.1. Pathophysiologie .....	88
8.1.2. Signes cliniques, diagnostic et traitement .....	89
8.1.3. Prévention .....	90
8.2. Réactions transfusionnelles hémolytiques .....	90
8.2.1. Réactions hémolytiques aiguës .....	91
8.2.2. Réactions hémolytiques retardées .....	92
8.2.3. Réactions hémolytiques chez le chat liées au système AB .....	92
8.2.4. Conséquences des antigènes érythrocytaires indépendants du système AB.....	93
Chapitre III – Comparison of a closed system and an open system for blood collection in feline donors .	96
Keywords.....	96
Abstract .....	97
Introduction .....	98
Materials and methods .....	98
Animals .....	98
Blood collection procedures .....	99
Blood collection systems.....	99
Samples and analysis of whole blood .....	100
Analysis and statistics .....	101
Results .....	101
Patients .....	101
Assessing the impact of each method on the donor .....	101
Quality of the blood product .....	102
Bacterial culture and PCR.....	102

Discussion.....	102
Conclusions .....	106
Acknowledgements.....	106
Conflict of interest.....	106
Funding.....	106
Ethical Approval .....	106
Informed Consent .....	107
Informed Consent for publications .....	107
References.....	107
Tables .....	112
Chapitre IV – Identification of five new feline erythrocyte antigens based on the presence of naturally occurring alloantibodies .....	115
Abstract .....	116
Introduction .....	117
Materials and Methods.....	117
Animals .....	118
Samples.....	118
AB Blood Typing .....	119
Detection of naturally occurring alloantibodies by crossmatch gel column test.....	119
Prospective blood typing for novel antigens .....	119
Agglutinin titer .....	120
Statistical analyses .....	120
Results.....	120
Description of cats and AB blood typing results .....	120
Detection of naturally occurring alloantibodies results.....	121
Blood typing for novel antigens results .....	121

Agglutinin titers results .....	122
Discussion.....	122
References.....	129
Tables .....	133
Discussion .....	140
Le prélèvement de sang .....	140
Les antigènes érythrocytaires et la compatibilité sanguine .....	147
Conclusion .....	154
Références bibliographiques .....	155

## Liste des tableaux

Tableau 1. –	Résumé des produits sanguins utilisés chez le chat .....	25
Tableau 2. –	Indications majeures des transfusions de globules rouges chez le chat .....	26
Tableau 3. –	Recommandations minimales et optimales de dépistage d'agents infectieux .....	30
Tableau 4. –	Agents infectieux dont le dépistage doit être considéré dans les régions endémiques 30	
Tableau 5. –	Comparaison des changements biochimiques et hématologiques observés au cours du stockage de sang entier .....	41
Tableau 6. –	Comparaison des changements biochimiques et hématologiques observés au cours du stockage de pRBC	42
Tableau 7. –	Résumé des études sur la contamination bactérienne des unités de sang entier ou de pRBC félines stockées entre 1 et 6°C .....	45
Tableau 8. –	Comparaison des durées de stockage du sang entier félin entre 1 et 6°C dans différentes solutions de conservation.....	46
Tableau 9. –	Comparaison des durées de stockage du pRBC félines entre 1 et 6°C dans différentes solutions de conservation.....	47
Tableau 10. –	Fréquence des groupes sanguins chez les chats domestiques en fonction des différents pays et des années.....	52
Tableau 11. –	Fréquences des groupes sanguins chez les chats de race classées par année et pays	55
Tableau 12. –	Mutations caractérisant les haplotypes A et B.....	60
Tableau 13. –	Combinaison de génotypes et de phénotypes prédits en fonction des mutations identifiées par le nouveau panel de PCR .....	62
Tableau 14. –	Résumé des caractéristiques biologiques du système AB du chat.....	63
Tableau 15. –	Résumé des caractéristiques des allo-anticorps dans le système AB .....	70
Tableau 16. –	Caractéristiques du test RapidVet®-H GEL .....	76
Tableau 17. –	Résumé des différentes études sur l'existence d'incompatibilités extérieures au système AB	87
Tableau 18. –	Résultat du typage sanguin extensif pour trois chats AB et neuf chats B et comparaison aux résultats obtenus chez les chats A .....	150

## Article 1

Table 1: Mean, 95 % confidence interval (CI), Minimal (Min) and maximal (Max) values of the evaluated clinical parameters measured in eight feline donors using closed and open collection systems before sedation, after sedation and after collection. ....	112
Table 2: Mean, 95 % confidence interval (CI), Minimal (Min) and maximal (Max) values of collection parameters in eight feline donors using closed and open collection systems .....	113
Table 3: Bacterial culture (all timepoints combined) and PCR results (at T0, T14 and T28) for the samples with at least one positive result .....	114

## Article 2

Table 1- Crossmatches (n=1228) and cats (n=258) distribution according to compatible or incompatible results .....	133
Table 2- Distribution of cats with NOAb according to their clinical and demographic characteristics.....	134
Table 3 - Agreement assessment between blood typing results obtained with different pairs of naturally occurring alloantibodies (NOAb) [reagent] determined by McNemar’s test, percentage of agreement, Cohen’s kappa agreement and Gwet’s coefficient .....	136
Table 4 - Extensive blood typing results of each index cat with naturally occurring alloantibodies (NOAb) .....	138

## Liste des figures

Figure 1 - Exemple des éléments pouvant constituer un système ouvert .....	31
Figure 2 - Exemple de deux systèmes semi-fermés constitués d'éléments séparables .....	32
Figure 3 - Exemple de matériel préparé pour un prélèvement avec un système ouvert .....	34
Figure 4 - Les étapes du prélèvement de sang chez un chat sédaté .....	36
Figure 5- Exemple d'une unité de sang entier félin .....	39
Figure 6 - Changement de couleur d'une unité de pRBC suite à une contamination bactérienne .....	43
Figure 7 - Bâtonnets libres visualisés sur le frottis issu d'une unité de pRBC féline contaminée.....	43
Figure 8 - Pedigree de deux familles de chats .....	51
Figure 9 - Structure d'une IgG et d'une IgM .....	64
Figure 10- Exemples de réaction d'agglutination chez le chien.....	65
Figure 11 - Résumé des mécanismes d'hémolyse intravasculaire et extravasculaire .....	66
Figure 12 - Distribution des chats en fonction de leur titre en anticorps naturels.....	69
Figure 13- Étape de production des anticorps monoclonaux.....	71
Figure 14 - Typage sanguin avec des cartes d'agglutination RapidVet®-H .....	73
Figure 15- Typage sanguin par IC avec le QuickTEST A+B (Alvedia).....	74
Figure 16 - Typage sanguin par IC avec le RapidVet-H IC® .....	75
Figure 17- Interprétation du RapidVet®-H GEL.....	76
Figure 18 - Échelle d'évaluation de l'agglutination pour la technique en tube .....	78
Figure 19 - Résultats d'un test de typage avec colonne de gel.....	79
Figure 20 - Matériel nécessaire pour la technique sur colonne de gel.....	83
Figure 21 - Échelle permettant l'évaluation de l'agglutination sur colonne de gel .....	84
Figure 22 - Interprétation du RapidVet®-H Crossmtach .....	85
Figure 23 - Notice pour l'interprétation du test LabTest®XM d'Alvedia.....	86
Figure 24 - Urine et sérum d'un chat suite à une réaction transfusionnelle aiguë .....	91

### Article 2

Figure 1 - Distribution of cats with naturally occurring alloantibodies (NOAb) according to the number and the grade of incompatibilities.....	139
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Figure 2 - Gel column results showing FEA 4 (A), FEA 6 (B) and FEA 7 (C) blood typing against the same 6 cats (number 241 to 246). ..... 139

## Liste des abréviations

AABB : *American Association of Blood Banks*

ACD : Acide-citrate-dextrose

ACVIM : *American College of Veterinary Internal Medicine*

ARNr : ARN ribosomal

AS : *Additive Solution*

ASVCP: *American Society for Veterinary Clinical Pathology*

ATP : Adénosine triphosphate

AVHTM : *Association of Veterinary Haematology and Transfusion Medicine*

BP : *Blood Pressure*

CHUV : Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire

CI : *Confidence Interval*

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CMAH : Cytidine monophosphate-acide N acétylneuraminique hydroxylase

CPDA-1: Citrate phosphate dextrose adénine-1

CPD : Citrate phosphate dextrose

Fc : Fragments constants

FDA : *Food and Drug Administration*

FEA : *Feline Erythrocyte Antigen*

FelV: Virus de la leucémie féline

FIV : Virus de l'immunodéficience féline

INF : Isoérythrolyse néonatale féline

HR: *Heart Rate*

LISS : *Low ionic strength saline*

MFI: Moyenne d'intensité de fluorescence

MoAb : Anticorps monoclonaux

NeuAc : Acide N-acétylneuraminique

NeuGc : Acide N-glycolyneuraminique

NOAb : *Naturally Occurring Alloantibodies*

PBS : Solution saline tamponnée

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PCV : *Packed Cell Volume*

pRBC : concentré de globules rouges

OR : Odds Ratio

RBC : *Red Blood Cells*

RR : *Respiratory Rate*

UTR : *Untranslated region*

2,3-DPG : 2,3-diphosphoglycérate

## Remerciements

À ma directrice de recherche et de résidence, **Marie-Claude Blais**. Merci de m'avoir proposé ce sujet de recherche, m'avoir fait confiance pour le mener à bien et avoir partagé avec moi votre passion pour la médecine transfusionnelle. J'en profite pour vous exprimer toute ma reconnaissance pour m'avoir offert cette résidence de médecine interne, m'avoir accompagnée et soutenue pendant ces trois années, et m'avoir ainsi aidée à accomplir mon rêve de devenir interniste. Il reste encore un petit détail à régler mais le rêve est proche de devenir réalité!

À **Julie-Hélène Fairbrother**, merci d'avoir contribué à notre premier article sur les sacs de prélèvements avec autant d'enthousiasme et de rigueur. Merci également pour ta gentillesse et ta bienveillance. En espérant avoir l'occasion de vous recroiser avec Gustave !

À **Valérie Lévesque**, un gros merci pour m'avoir tant aidé à mettre en place le projet des sacs de prélèvement. Merci pour ta gentillesse, ta douceur et ta disponibilité.

À **Julie Arsenault**, merci d'avoir accepté de réaliser la partie statistique de notre deuxième projet. Merci d'avoir pris le temps de comprendre le sujet et ses implications afin de trouver les meilleurs outils mathématiques pour nous aider à interpréter nos résultats.

À **Mathilde Leclère** et **Aude Castel**, merci d'avoir accepté d'être membres de mon jury de maîtrise.

À **Romain**, merci d'avoir été cet ami dont j'avais besoin au cours de la résidence et d'être devenu cet ami dont j'ai besoin dans la vie. Merci de toujours reprendre les chansons que je fredonne (et surtout de les reconnaître !), merci pour ces énormes fous rires souvent aux pires moments (ronde, journal club, ...) qui resteront parmi les meilleurs souvenirs de ma résidence, et merci pour ton soutien pendant les moments de doute, de mauvaise humeur ou de stress. Vivement juin 2021, la piscine et la bière post-examen, à refaire le monde ensemble !

À mes co-résidentes préférées : **Alyssa, Valérie et Émilie**, merci d'avoir fait de cette année un si bon moment en votre compagnie. Merci d'avoir toléré mes bavardages incessants dans le bureau et mes « promis, après, j'arrête de t'embêter ... » ! À tous les restaurants, soirées sushis et conversations potins et râlage à venir. Co-résidentes pour toujours <3

À **Chloé**, merci d'avoir été ma bouffée d'oxygène Montréalaise pendant ces trois années. Merci de m'avoir fait découvrir le thé matcha (un des plus beaux jours de ma vie !) et les meilleurs endroits où bruncher à Montréal. Merci pour ta présence inconditionnelle depuis la prépa (13 ans déjà !!)

À **Agathou**, merci pour ta bonne humeur, ta franchise, ton amitié et pour les très nombreux potins que tu as partagés avec moi (et la moitié du CHUV...). Parce qu'on survivra à cette période de galère ensemble !

À **Laura**, merci d'être devenue de manière inattendue la meilleure compagne de course possible (avec Juno !). Nos 10 km seront un jeu d'enfants avec tous ces entraînements. Vivement nos vacances en Guadeloupe (ou Hawaï, ou l'Ouest canadien, ou Saint Hyacinthe...) et le semi-marathon !

Enfin, merci du fond du cœur à ma **famille** sans qui rien n'aurait été possible :

À **Pierre, Iane, Nathalie, Nicolas, Lucas** et bientôt **Bibou**, merci d'être là et de participer à créer ces beaux moments de famille à chaque fois que je rentre en France. Vivement que les frontières ré-ouvrent pour qu'on puisse se réunir à nouveau !

À mes **parents**, merci ne suffit pas pour vous exprimer toute ma gratitude pour votre soutien sans faille depuis qu'à l'âge de 6 ans j'ai décidé de devenir vétérinaire. Merci de m'avoir accompagnée à chaque étape, de m'avoir soutenue dans tous les moments et surtout dans les plus durs, et d'avoir respecté mes rêves, même s'ils m'emmenaient à des milliers de kilomètres de vous. Tout simplement, merci d'être les meilleurs parents au monde !

Une dernière pensée pour mes animaux, **Loufoc, Pom'pom, Gustave et Minion**. Merci pour votre tendresse et votre présence quotidienne, à différents moments de ma vie.

## Introduction

La première transfusion sanguine toutes espèces confondues a eu lieu en 1665 lorsque Richard Lower a transfusé avec succès un chien.<sup>1</sup> Cependant, il a fallu attendre les années 1950 pour que la transfusion sanguine prenne une place plus importante en médecine vétérinaire. La découverte des groupes sanguins et des anticoagulants, ainsi que le développement de différentes techniques de typage, des tests de compatibilité et de matériel adapté au prélèvement chez les animaux ont permis à la médecine transfusionnelle vétérinaire de progresser très rapidement. L'administration de sang entier collecté en urgence avec une investigation minimale du donneur et de la compatibilité pré-transfusionnelle laisse progressivement place à la préparation et au stockage de produits sanguins prélevés chez des donneurs préalablement sélectionnés selon des recommandations publiées, permettant ensuite de choisir un produit sanguin adapté pour un patient donné.<sup>2</sup> L'augmentation des connaissances et de la compréhension des bonnes pratiques transfusionnelles est illustrée par deux enquêtes sur la transfusion en médecine vétérinaire des petits animaux publiées à 20 ans d'intervalle. La première enquête publiée en 1992 rapportait qu'environ un tiers des 25 cliniques interrogées déterminait le groupe sanguin de leur donneur, qu'aucune ne réalisait de typage sanguin du receveur, et que seulement 40 % d'entre elles réalisaient des tests de compatibilité.<sup>3</sup> Dans la deuxième enquête publiée en 2016, 96 % des 73 cliniques interrogées réalisaient un typage sanguin et/ou un test de compatibilité pré-transfusionnel.<sup>4</sup>

Chez le chat, la médecine transfusionnelle a connu une croissance exponentielle au cours des dix dernières années. Ainsi, selon le moteur de recherche PubMed, entre 1967 et 2020, 197 études ont été écrites à propos de la médecine transfusionnelle féline, dont 89 ont été publiées dans les dix dernières années (recherche des mots clés « transfusion », « veterinary » et « cat »). Malgré cela, la transfusion sanguine chez le chat reste moins couramment pratiquée que chez le chien, et demeure un acte vétérinaire délicat. Les difficultés liées au prélèvement de sang chez le chat et l'absence de structure garantissant l'approvisionnement en produits sanguins félins dans de nombreux pays sont des facteurs limitant sa mise en pratique et ralentissant la recherche.

Les transfusions de produits sanguins comportent des risques aussi bien pour les donneurs que pour les receveurs. L'objectif principal de la médecine transfusionnelle féline est d'assurer une sécurité optimale afin que la transfusion reste un acte salvateur pour le receveur sans compromettre la santé du donneur. La sécurité d'une transfusion s'articule autour de trois axes principaux : 1) garantir la qualité du produit

sanguin grâce à une sélection appropriée du donneur, et une optimisation des conditions de prélèvement et de stockage ; 2) sélectionner un produit sanguin adapté pour le receveur, aussi bien en termes d'indications de la transfusion que de compatibilité sanguine ; 3) surveiller la transfusion pour contrôler l'absence de réactions transfusionnelles chez le receveur.

Notre travail s'intègre dans cette volonté d'augmenter la sécurité des transfusions sanguines chez le chat. Le sujet étant vaste, nous nous sommes principalement concentrés sur les points suivants: 1) l'optimisation du prélèvement de sang chez le chat afin de garantir un produit sanguin de qualité ; 2) la découverte de nouveaux antigènes érythrocytaires sanguins à l'origine d'incompatibilités donneur-receveur. La procédure de transfusion *sensu stricto*, son suivi et les réactions transfusionnelles autres que celles associées aux antigènes érythrocytaires ne seront donc pas abordés dans ce travail.

# Chapitre I – La collecte de sang chez le chat

## 1. Produits sanguins et indications de la transfusion chez le chat

### 1.1. Présentation des produits sanguins utilisés chez le chat

Le sang collecté d'un donneur peut être utilisé de plusieurs façons. Une unité de sang entier peut être transfusée immédiatement, stockée sans transformation après le prélèvement, ou encore séparée en plusieurs produits sanguins. Une enquête publiée en 2016 compile les pratiques de médecine transfusionnelle de 20 hôpitaux universitaires vétérinaires et de 53 centres de référence privés aux États-Unis, au Canada, en Europe et en Australie.<sup>4</sup> Cette enquête rapporte que les produits sanguins utilisés chez le chat sont : le sang entier frais, le sang entier stocké, le concentré de globules rouges et le plasma frais congelé. Chez le chien, le cryoprécipité, le cryo-surnageant, les concentrés plaquettaires et le plasma riche en plaquettes sont également utilisés.

#### 1.1.1. Sang entier

Le sang entier contient tous les composants du sang circulant : globules rouges, globules blancs, plaquettes, facteurs de coagulation, albumine, globulines, électrolytes, etc. Le sang entier frais est transfusé immédiatement ou dans les 8 heures suivant le prélèvement en étant stocké à température ambiante.<sup>5,6</sup>

Le sang entier peut également être stocké entre 1 et 6°C. Des études en médecine humaine ont décrit une diminution de l'agrégation plaquettaire et de la concentration en facteurs de coagulation V et VIII au cours du stockage du sang entier. Une diminution de 24 à 46 % de la capacité d'agrégation plaquettaire et une diminution de plus de 50 % de la concentration en facteur VIII ont ainsi été rapportées dans les premières 24 heures du stockage, dans les années 80 et 90.<sup>7,8</sup> Des études plus récentes semblent être en faveur d'un maintien *in vitro* des propriétés hémostatiques du sang entier, et notamment de l'agrégation plaquettaire, sur une plus longue période de stockage (jusqu'à 21 jours).<sup>9-11</sup>

Le sang entier frais peut être utilisé en cas d'anémie avec anomalie de la coagulation, thrombopathie ou thrombocytopénie concomitante. Les patients avec des lésions traumatiques sévères entraînant des hémorragies massives peuvent également bénéficier d'une transfusion de sang entier frais. De manière similaire, le sang entier stocké peut être utilisé pour les anémies associées à certaines anomalies de la coagulation, comme des intoxications aux antagonistes de la vitamine K; mais ce produit n'est

actuellement pas recommandé lors d'atteintes plaquettaires ou de déficits en facteurs V et VIII. Le sang entier frais ou stocké peut être administré à des patients atteints d'anémies sans anomalie de la coagulation, particulièrement lorsque la séparation des produits sanguins n'est pas possible.<sup>5, 6, 12-14</sup>

L'avantage principal de la transfusion de sang entier frais chez le chat est son accessibilité. En identifiant un donneur en bonne santé et en maîtrisant les techniques de ponction veineuse et d'asepsie, le prélèvement de sang entier frais peut être réalisé dans n'importe quelle clinique. Ses inconvénients sont reliés à la disponibilité d'un donneur au moment nécessaire d'une transfusion et le délai inhérent au prélèvement lorsque des patients ont besoin d'être transfusés en urgence. L'avantage du sang entier stocké est également son accessibilité, car il ne nécessite pas d'investissement dans du matériel spécifique à la séparation des produits sanguins. Les inconvénients partagés par le sang entier frais et le sang entier stocké sont un risque de surcharge chez les patients anémiques euvolemiques, et un risque de stimulation antigénique par administration de plasma.<sup>14, 15</sup>

Le sang entier peut être séparé en différents composés sanguins afin de mieux cibler les besoins du receveur.

#### *1.1.2. Concentré de globules rouges*

Une fois le sang collecté dans des conditions adéquates d'asepsie et dans un système de collecte approprié (voir paragraphe 3), le plasma peut être séparé du culot de globules rouges (pRBC- *packed red blood cells*). L'utilisation de pRBC est devenue plus fréquente chez le chat à partir des années 2000, avec de plus en plus d'études décrivant son emploi plutôt que celui du sang entier.<sup>4, 16-20</sup> Cette utilisation tardive des pRBC peut s'expliquer par la plus grande difficulté de séparation des produits sanguins chez le chat comparativement au chien. En effet, les unités félines sont trop petites pour les paniers des centrifugeuses standards. Les compagnies commercialisent maintenant des adaptateurs en plastique à ajouter dans le panier pour assurer la stabilité de l'unité au cours de la centrifugation. En utilisant ces adaptateurs, la centrifugation se réalise entre 10 et 20°C, pendant 12 à 15 minutes, à une vitesse variant de 2000 à 3800 tours par minute, dépendamment des auteurs.<sup>15, 16, 21</sup> Le sang félin ayant un taux de sédimentation des globules rouges fort, il est également possible de simplement laisser décanter le sang entier en maintenant l'unité en position verticale.<sup>1</sup> Lorsque la séparation entre le plasma et le culot de globules rouges est facilement visualisée, le plasma peut être récolté dans un sac satellite à l'aide d'un extracteur de plasma. Cette étape est un autre facteur limitant de la séparation des produits sanguins chez le chat, car peu de systèmes de collecte commercialisés possèdent un sac satellite. En l'absence de ce dernier, l'unité peut être soudée à un sac de transfert, ce qui demande une soudeuse spécifique. Lorsque le plasma a été

extrait, l'unité devient un pRBC. Les pRBC peuvent être utilisés lors d'anémie sans anomalie de coagulation concomitante. L'avantage de l'utilisation de pRBC repose sur un plus faible volume à administrer par rapport à une unité de sang entier, ce qui rend la transfusion plus sécuritaire chez des patients euvolémiques ou à risque de surcharge. Les chats étant très sensibles à la surcharge volémique, cet avantage est non négligeable en médecine transfusionnelle féline.<sup>1</sup> De plus, en évitant l'administration de larges volumes de plasma, la stimulation antigénique associée à l'exposition aux protéines plasmatiques est minimisée.<sup>6</sup>

### *1.1.3. Plasma*

Les données présentées dans ce paragraphe sont principalement issues de la médecine transfusionnelle humaine et parfois de la médecine transfusionnelle canine, considérant le manque de données dans la littérature sur le plasma félin.

Dépendamment des conditions de stockage, le plasma peut être du plasma frais congelé ou du plasma congelé. Selon l'American Association of Blood Banks (AABB), le plasma frais congelé correspond à du plasma qui a été séparé du pRBC et congelé à  $-18^{\circ}\text{C}$ , ou plus froid, dans les 8 heures suivant le prélèvement de sang. Il contient tous les facteurs de coagulation, le facteur de von Willebrand, du fibrinogène, de la fibronectine, de l'albumine, des globulines, de l'eau et des électrolytes et peut être stocké pendant 12 mois.<sup>22</sup> Le plasma congelé fait référence au plasma qui a été séparé du sang entier et congelé plus de 8 heures après le prélèvement. Il présente une activité diminuée du facteur VIII par rapport au plasma frais congelé. Il est à noter que le seuil des 8 heures est actuellement remis en question en médecine humaine et un seuil de 24 heures devient de plus en plus toléré pour différencier le plasma frais congelé du plasma congelé.<sup>23, 24</sup> En médecine vétérinaire, une étude a également rapporté l'absence de différence d'activité des facteurs de coagulation dans du sang entier de chien conservé pendant 8 heures ou 24 heures à température ambiante.<sup>25</sup> Le plasma congelé fait aussi référence au plasma frais congelé qui a été stocké pendant plus de 12 mois. Le plasma au cours de son stockage montre une diminution de l'activité des facteurs de coagulation labiles tels que le facteur V, le facteur VIII et le facteur de von Willebrand.<sup>22</sup> Les autres facteurs de coagulation, et notamment les facteurs dépendant de la vitamine K, restent stables pendant la période de 5 ans de stockage du plasma congelé.<sup>26</sup> Les recommandations de l'AABB et le seuil des 8 heures restent actuellement appliqués en médecine vétérinaire.

En médecine humaine, le plasma est utilisé lors de transfusion massive en cas de choc hypovolémique secondaire à une perte de sang et lors d'anomalie de la coagulation (acquise ou héréditaire). Les recommandations en médecine humaine découragent l'utilisation du plasma pour d'autres conditions

telles que les pancréatites ou l’hypo-albuminémie.<sup>27, 28</sup> En médecine vétérinaire, vers la fin des années 1990, l’utilisation du plasma était souvent rapportée pour ces deux dernières affections. Depuis, les recommandations pour les chiens et les chats calquent celles de médecine humaine, et le plasma est essentiellement utilisé lors de coagulopathie.<sup>6, 29</sup>

Les avantages du plasma frais congelé ou congelé sont la possibilité d’une conservation prolongée, sa stabilité, l’absence de sensibilisation aux antigènes érythrocytaires lors de son utilisation et son large spectre de facteurs de coagulation. L’administration de plasma à des patients présentant des déficits isolés en facteurs de coagulation a l’inconvénient d’exposer à des antigènes non nécessaires et d’administrer des volumes importants de produits sanguins.<sup>1</sup> En médecine humaine, des concentrés d’un facteur de coagulation unique sont disponibles.<sup>28</sup> Ce n’est pas encore le cas en médecine vétérinaire.

#### 1.1.4. Récapitulatif

Le tableau suivant (tableau 1) récapitule les différents produits sanguins utilisés chez le chat selon l’enquête de 2016 et les principales conditions dans lesquels ils peuvent être utilisés.<sup>4</sup>

Tableau 1. – **Résumé des produits sanguins utilisés chez le chat**

Produit	Composition	Indications principales
Sang entier frais	Globules rouges, globules blancs, plaquettes, facteurs de coagulation, albumine, globuline	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anémie avec coagulopathie ou désordre plaquettaire</li> <li>- Hémorragie sévère nécessitant une transfusion massive</li> </ul>
Sang entier stocké	Même composition que le sang entier mais diminution de l’activité en facteur V et VIII et diminution de l’agrégation plaquettaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anémie par perte de sang</li> <li>- Anémie quelle que soit la cause en l’absence d’autres produits disponibles</li> <li>- Transfusion massive</li> </ul>
pRBC	Globules rouges, globules blancs, petite quantité de plasma	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anémie</li> </ul>
Plasma frais congelé	Facteurs de coagulation, albumine, globulines	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coagulopathie héréditaire</li> <li>- Coagulopathie acquise</li> <li>- Transfusion massive</li> </ul>
Plasma congelé	Facteurs de coagulation sauf facteur V, facteur VIII et vW	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Coagulopathie exceptée maladie de vW et hémophilie A</li> <li>- Transfusion massive</li> </ul>

*CIVD : coagulation intravasculaire disséminée – vW : von Willebrand- pRBC : concentré de globules rouges*

## 1.2. Principales utilisations des produits sanguins chez le chat

### 1.2.1. Transfusions de globules rouges

L'anémie représente l'indication principale d'une transfusion chez le chat, tous produits sanguins confondus. Entre 65 et 95 % des transfusions sont administrées à des chats anémiques.<sup>16, 30</sup> Chez le chat, la principale cause d'anémie est un défaut de production des globules rouges avec 52,8 % de chats anémiques (sur 180 chats) présentant une anomalie de la moelle osseuse de nature inflammatoire, infectieuse, myélodysplasique, néoplasique, immunitaire ou encore métabolique (insuffisance rénale). L'hémorragie représente la deuxième cause d'anémie avec 20,6 % des cas, suivie d'une hémolyse dans 10,6 % des cas.<sup>31</sup> Logiquement, les indications d'une transfusion de globules rouges (sang entier ou pRBC) suivent la même tendance (tableau 2).<sup>17, 18, 20, 30, 32</sup> Les pertes sanguines représentent les indications principales d'une première et unique transfusion, tandis qu'un défaut de production est l'indication principale des transfusions multiples.<sup>17, 20</sup>

Tableau 2. – Indications majeures des transfusions de globules rouges chez le chat

Étude	Année de publication	Nombre de chats transfusés	Pertes sanguines	Défaut de production	Hémolyse
Weingart <i>et al.</i> <sup>30</sup>	2004	91	44 %	38 %	14 %
Klaser <i>et al.</i> <sup>32</sup>	2005	126	52 %	38 %	10 %
Sylvane <i>et al.</i> <sup>18*</sup>	2018	48	50 %	71 %	4 %
Martinez-Sogues <i>et al.</i> <sup>17**</sup>	2020	267	39 %	44 %	25 %
Moyenne globale***			44 %	44 %	18 %

\*Dans cette étude, les chats trop instables pour avoir un test de compatibilité pré-transfusion étaient exclus.

\*\*Dans cette étude, certains chats avaient une combinaison des différentes causes d'anémie

\*\*\* Pour une colonne, la moyenne globale été calculée en divisant la somme des effectifs de chaque étude pour une indication par la somme des effectifs totaux de chaque étude (532)

Il est à noter qu'en médecine vétérinaire, le seuil d'hémoglobine ou d'hématocrite à partir duquel un animal doit être transfusé n'a pas été établi.<sup>33</sup> Des études en médecine humaine ont montré que des pratiques transfusionnelles conservatrices (maintenir un taux d'hémoglobine entre 7-8 g/dL) conduisaient à des résultats équivalents à supérieurs en terme survie à des pratiques plus libérales (atteindre un taux d'hémoglobine supérieur à 10-12 g/dL).<sup>34, 35</sup> Une étude rétrospective chez le chien a également mis en évidence que la mortalité était associée à un hématocrite pré-transfusionnel plus élevé et à un volume

plus important de pRBC administré.<sup>36</sup> Une association entre le volume de pRBC transfusé et l'apparition de complications post-transfusionnelles était aussi rapportée dans cette espèce.<sup>37</sup> Bien que de telles études n'existent pas chez le chat, elles soulignent l'importance d'examiner attentivement et prudemment la nécessité d'une transfusion chez un patient. La décision finale repose sur l'opinion du clinicien, le caractère aigu ou chronique de l'anémie, et l'évaluation de critères qui reflètent l'oxygénation du patient, tels que la concentration en lactates, la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, le pouls, l'état mental et le niveau d'activité.<sup>14</sup>

Un dernier point intéressant sur les transfusions de globules rouges est d'observer l'évolution de l'utilisation des produits sanguins avec l'introduction de nouvelles modalités thérapeutiques. Par exemple, le développement des techniques d'hémodialyse est associé à une forte augmentation de l'utilisation de sang entier ou de pRBC chez les animaux de compagnie. Ainsi, une étude publiée en 2017 a montré que 87 % des chats traités avec un protocole d'hémodialyse intermittente (n = 83) nécessitaient l'administration de sang entier ou de pRBC.<sup>38</sup> Au Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) de l'Université de Montréal, le nombre de transfusions a augmenté progressivement chez le chat (46 transfusions en 2018 contre 23 en 2015) suite à la croissance de l'activité du service de médecine interventionnelle. Ce service opère notamment des chats avec obstruction urétérale qui présentent des degrés variables d'azotémie. Leur azotémie s'accompagne fréquemment d'une anémie non régénérative d'origine multifactorielle (défaut de production des globules rouges par diminution de l'érythropoïétine, inflammation et toxines urémiques; pertes digestives; diminution de la durée de vie des globules rouges). Une transfusion est alors nécessaire en période per- ou post-opératoire. Ainsi, en 2017, 46 % des 58 transfusions félines réalisées au CHUV étaient pour des patients azotémiques reçus par le service de médecine interventionnelle.

### *1.2.2. Transfusions de plasma*

L'administration de plasma frais congelé est beaucoup moins fréquemment rapportée chez le chat que chez le chien. Une étude menée dans un hôpital universitaire vétérinaire a décompté seulement 25 chats sur les 308 animaux de compagnie transfusés ayant reçu du plasma frais congelé. Cette étude illustre une tendance à l'augmentation de l'utilisation du plasma chez le chat, avec seulement 2 chats comptabilisés entre 1996 et 1998, et 23 chats entre 2006 et 2008.<sup>29</sup> Une autre étude rapporte l'utilisation de 54 transfusions de plasma frais congelé chez 36 chats entre 2014 et 2018, dont 34 chats avaient une anomalie de coagulation et deux chats avaient une hypo-albuminémie. En comparaison, au cours de la même période d'étude, 474 transfusions de pRBC et 76 transfusions de sang entier étaient enregistrées.<sup>39</sup>

## **2. Recrutement des donneurs**

La transfusion sanguine est une procédure risquée aussi bien pour le donneur que pour le receveur. Une sélection appropriée du donneur est donc indispensable pour limiter ces risques, et le recrutement de donneurs en urgence doit être évité.

### **2.1. Qualités d'un bon donneur**

Un chat doit remplir certains critères pour être considéré comme un potentiel futur donneur de sang. Une histoire complète, incluant les antécédents de voyage, doit être demandée avant l'admission dans un programme de donneurs de sang. Le chat doit être en apparente bonne santé, d'un tempérament coopératif, avoir un score corporel normal, un poids idéalement de plus de 4 à 5 kg, être âgé de 1 à 8 ans, être vacciné régulièrement (protocole variable selon la localisation géographique), ne pas recevoir de traitement sur le long terme ou avoir reçu de médication dans les deux semaines précédant la collecte, ne jamais avoir reçu de transfusion, et enfin être traité régulièrement contre les puces et les parasites (protocole variable selon la localisation géographique).<sup>40, 41</sup> Le profil idéal du donneur est d'ailleurs un chat gardé en intérieur strict. Cependant, considérant la demande croissante en produits sanguins félins, la disponibilité réduite des donneurs, et les questions de bien-être animal soulevées par cette restriction, certains programmes de donneurs de sang acceptent des chats ayant accès à l'extérieur.<sup>42</sup>

Les chats peuvent être gardés chez leurs propriétaires (externes ou employés de la structure vétérinaire) ou sur place dans une colonie dédiée aux donneurs de sang. Dans l'enquête sur les pratiques transfusionnelles citée précédemment, 73 % des structures vétérinaires utilisaient des chats appartenant à leurs employés, 40 % des structures possédaient une colonie de donneurs félins et 36 % utilisaient des chats appartenant à des clients. Environ 22 % des structures ne possédaient pas de programme de donneurs et achetaient les produits sanguins félins à des banques de sang commerciales.<sup>36</sup> Il est à noter qu'aucune banque de sang ne commercialise actuellement des produits sanguins félins au Canada.

Avant d'intégrer un programme de donneurs, chaque chat doit avoir un examen physique exhaustif. Un bilan hématologique et biochimique complet est réalisé. Toute anomalie devrait être investiguée et recontrôlée avant un prélèvement. Le bilan sanguin est répété annuellement pour des donneurs réguliers. Un futur donneur doit aussi être typé pour connaître son groupe sanguin.<sup>40, 41</sup> Les différents groupes sanguins du chat et les techniques de typage seront détaillés dans le chapitre II.

Une échocardiographie est recommandée chez tous les potentiels donneurs de sang, quelle que soit leur auscultation. Une étude a rapporté que 22 potentiels futurs donneurs de sang sur 103 (21 %) présentaient

un souffle cardiaque à l'auscultation, mais la présence d'un souffle n'est pas une raison suffisante d'exclusion d'un programme de donneurs de sang félin, car seulement la moitié des chats avec un souffle ont une cardiomyopathie sous-jacente.<sup>43-45</sup> Les chats peuvent également présenter une cardiomyopathie sans avoir de souffle audible à l'auscultation.<sup>45</sup> Un chat avec une anomalie cardiaque structurelle ne devrait pas être intégré dans un programme de donneurs.

## **2.2. Gestion du risque de transmission de maladies infectieuses**

La transmission de maladies infectieuses est un risque inhérent à la transfusion sanguine. Une évaluation appropriée des donneurs pour ce risque est donc indispensable. Il est à noter que le développement des techniques de diagnostic moléculaire, et notamment de la PCR (réaction de polymérisation en chaîne) au cours des dernières années a significativement augmenté la sensibilité des tests de dépistage et ainsi la sécurité reliée à la transmission de maladies infectieuses.<sup>41</sup>

Des recommandations concernant le dépistage des agents transmis par le sang ont été publiées par le collège américain de médecine interne vétérinaire (ACVIM – *American College of Veterinary Internal Medicine*) et l'association d'hématologie et de médecine transfusionnelle vétérinaire (AVHTM – *Association of Veterinary Haematology and Transfusion Medicine*) en 2005. Elles ont été mises à jour en 2016.<sup>2, 46</sup>

Un test de dépistage est recommandé si un agent infectieux répond à au moins trois des critères suivants :

- Une maladie clinique a été documentée chez un chat suite à une transmission de l'agent par le sang,
- Un portage asymptomatique de l'agent est documenté,
- L'agent entraîne une maladie sévère et difficile à traiter,
- L'agent peut être identifié par culture ou PCR à partir du sang collecté d'un animal infecté.

En appliquant cette règle, des tests de dépistage ont été recommandés pour certains pathogènes quelle que soit la situation géographique du donneur (recommandations minimales). Certains tests ont été décrits comme « à considérer » pour tout donneur (recommandations optimales). Certains tests ont été recommandés uniquement pour les chats vivant dans les régions endémiques pour l'agent infectieux considéré (tableaux 3 et 4).<sup>2</sup> L'ensemble des tests décrits dans les deux tableaux ci-dessous se réalise sur un échantillon de sang du donneur.

Tableau 3. – **Recommandations minimales et optimales de dépistage d'agents infectieux**

<b>Agents infectieux</b>	<b>Recommandation optimale</b>	<b>Recommandation minimale</b>
<b>Virus de la leucémie féline (FeLV)</b>	Test antigénique (p27) ET PCR pour l'ADN proviral	Test antigénique seul
<b>Virus de l'immunodéficience féline (FIV)</b>	Test sérologique (détection des anticorps)	
<b><i>Bartonella henselae</i></b>	Test sérologique (détection des anticorps) ET culture ou PCR	PCR
<b><i>Mycoplasma haemofelis</i></b>		PCR
<b><i>Candidatus Mycoplasma haemominutum</i></b>	PCR	Aucun dépistage
<b><i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i></b>	PCR	Aucun dépistage
<b>Autres espèces de <i>Bartonella</i></b>	PCR	Aucun dépistage

Tableau 4. – **Agents infectieux dont le dépistage doit être considéré dans les régions endémiques**

<b>Agents infectieux</b>	<b>Recommandation optimale</b>
<b><i>Cytauxzoon felis</i></b>	PCR
<b><i>Babesia sp.</i></b>	PCR
<b><i>Anaplasma phagocytophilum</i></b>	PCR OU test de détection des anticorps
<b><i>Anaplasma platys</i></b>	PCR
<b><i>Neorickettsia risticii</i></b>	PCR
<b><i>Leishmania infantum</i></b>	PCR
<b><i>Ehrlichia sp.</i></b>	PCR

Le protozoaire *Toxoplasma gondii* et le coronavirus félin ne rencontrent pas les critères définis par l'ACVIM et leur détection n'est pas recommandée chez un futur donneur. Un chat ayant un test de dépistage positif pour un agent infectieux ne devrait pas être intégré dans un programme de donneurs, même s'il reçoit un traitement médical adéquat.<sup>2</sup>

Environ 98 % des structures vétérinaires interrogées utilisent des tests de dépistage des maladies infectieuses chez leurs chats donneurs de sang.<sup>4</sup> Le type de dépistage utilisé est influencé par les coûts des tests. À l'image des pratiques en médecine humaine, certains auteurs recommandent de définir un profil de risques du donneur, basé sur un questionnaire complété par le propriétaire, afin de juger de la nécessité de certains tests de dépistage et limiter les frais.<sup>42</sup>

### **3. Prélèvement du sang**

Dans certains pays comme les États-Unis, des banques de sang commercialisent des produits sanguins félins. Pour beaucoup de pays, et notamment le Canada, cette commodité n'est pas encore disponible et une collecte de sang doit être réalisée en clinique. Le prélèvement de sang n'est pas un acte anodin et comporte des risques pour le donneur (sédation, hypotension, choc vagal, etc.). Le matériel et les étapes du prélèvement doivent être adaptés pour maximiser la sécurité et le bien-être du chat donneur, mais aussi pour limiter une potentielle contamination ou dégradation du produit sanguin.

#### **3.1. Systèmes de collecte chez le chat**

Deux types de systèmes de collecte sont classiquement définis en médecine transfusionnelle : le système fermé et le système ouvert. Pour le chat, un troisième système, le système semi-fermé, est également décrit.<sup>1</sup>

##### *3.1.1. Systèmes ouverts*

Le système ouvert est constitué d'éléments individuels qui sont assemblés au moment du don. Pour le chat, ce système est souvent composé de seringues connectées à une valve à trois voies et à une aiguille au moment du prélèvement (figure 1).<sup>15, 16, 30, 41, 47-50</sup> En 2016, 44 % des structures vétérinaires interrogées utilisaient un tel système pour prélever le sang chez les chats.<sup>4</sup>



**Figure 1 - Exemple des éléments pouvant constituer un système ouvert**  
*Deux seringues de 30 mL pré-remplies d'anticoagulant, une valve à trois voies et un cathéter papillon*

Chaque étape d'assemblage représente un point potentiel de contamination bactérienne. La manipulation des éléments et leur connexion nécessitent donc d'être réalisées le plus stérilement possible. Il est habituellement recommandé de ne pas stocker le sang collecté par un système ouvert plus de 24 heures entre 1 et 6 °C, à cause de ce risque accru de contamination bactérienne.<sup>1</sup> De nombreux auteurs

rapportent toutefois la conservation du sang réfrigéré après transfert du contenu des seringues dans un sac de collecte, bien que ceci ajoute une étape supplémentaire à risque de contamination bactérienne.<sup>16, 30, 47, 48, 50</sup>

### 3.1.2. Systèmes semi-fermés

La majorité des systèmes commercialisés pour la collecte de sang chez le chat sont des systèmes appelés « semi-fermés ». Ces systèmes sont composés d'éléments déjà assemblés, comme dans un système fermé, mais qui ne contiennent pas d'anticoagulant. L'anticoagulant doit être ajouté au moment du prélèvement, ce qui ouvre le système. De plus, ces systèmes, bien que vendus déjà assemblés, sont constitués d'éléments qui peuvent être déconnectés les uns des autres (figure 2).



**Figure 2 - Exemple de deux systèmes semi-fermés constitués d'éléments séparables**

*À gauche : un système composé d'un sac, d'une seringue de prélèvement et d'un cathéter papillon. À droite : un système composé d'un sac et d'un cathéter papillon. Un anticoagulant doit être ajouté dans chaque système au moment du prélèvement. Les systèmes sont commercialisés par l'Animal Blood Ressources International ([www.abrint.net](http://www.abrint.net)).*

### 3.1.3. Systèmes fermés

Les systèmes fermés sont constitués d'éléments scellés assurant une continuité parfaite entre le donneur et l'unité de prélèvement et sont classiquement utilisés en médecine humaine et chez le chien. Les systèmes fermés sont préférés car ils diminuent le risque de contamination bactérienne en limitant les manipulations du système. Un risque faible de contamination autorise ensuite le stockage des produits sanguins dans des conditions adaptées.<sup>1</sup> Chez le chat, ce type de système est encore peu utilisé car les systèmes de médecine humaine (utilisés chez le chien) ne sont pas adaptés au petit volume de sang prélevé chez le chat. Un laboratoire italien (FuturLab Srl, Padoue, Italie) commercialise un système déjà pré-rempli d'un anticoagulant (citrate-phosphate-dextrose-adénine [CPDA-1]), et composé de deux seringues reliées entre elles et à un sac de prélèvement par des robinets trois voies.<sup>51</sup> Bien que considéré

comme fermé, ce système est composé d'éléments qui peuvent être déconnectés les uns des autres, ce qui est moins sécuritaire qu'une aiguille soudée à une tubulure, elle-même soudée à un sac de prélèvement. Très récemment, un laboratoire vétérinaire (Jorgensen, Colorado, USA) a commercialisé un système comparable à celui utilisé chez l'humain ou le chien, composé d'un sac de 50 ou 100 mL pré-rempli d'un anticoagulant (Acide-Citrate-Dextrose [ACD]), soudé à une tubulure de 75 cm, elle-même soudée à une aiguille.

Dans le chapitre III, nous décrivons la fabrication d'un système fermé adapté au volume de sang prélevé chez le chat, et nous le comparerons à un système ouvert.

### **3.2. Réalisation pratique du prélèvement de sang**

#### *3.2.1. Examen du donneur*

Avant un prélèvement de sang et si le chat donneur est gardé chez son propriétaire, l'obtention d'un historique complet est nécessaire afin de s'assurer de l'absence de signe clinique, de voyage, de traitement récent ou de vaccination dans le dernier mois. Le donneur est ensuite examiné juste avant le prélèvement pour s'assurer de sa bonne santé. Il est également pesé afin de permettre de calculer le volume de sang pouvant être prélevé sécuritairement.<sup>14</sup> Un volume de 10 à 15 mL/kg est souvent recommandé, ce qui représente moins de 20 % du volume sanguin total d'un chat (66 mL/kg en moyenne).<sup>14, 52</sup> L'hématocrite est mesuré et il doit être d'au moins 30 à 35 % pour limiter le risque de développement d'une anémie secondaire au prélèvement.<sup>40</sup> Si l'examen et l'hématocrite du donneur sont adéquats, le prélèvement peut avoir lieu.

#### *3.2.2. Préparation du prélèvement*

Habituellement, trois personnes sont nécessaires lors du prélèvement sanguin : une personne qui effectue la contention du chat, un phlébotomiste (i.e. personne en charge de la compression et la ponction veineuse), et une personne qui s'occupe du prélèvement. Tout le matériel indispensable au prélèvement doit être préparé à l'avance afin d'assurer un prélèvement réussi et rapide (figure 3).



Médicaments injectables pour sédation

Matériels pour préparation aseptique de la peau

Deux seringues de prélèvement avec anti-coagulant

Cathéter papillon de 19G ou 21G avec valve à trois voies

Un sac de fluides isotoniques

Gants stériles pour le prélèvement

Lubrifiant oculaire (non montré)

**Figure 3 - Exemple de matériel préparé pour un prélèvement avec un système ouvert**

### 3.2.3. Sédation du donneur

Dans la majorité des cas, une sédation ou une anesthésie sont utilisées pour le prélèvement de sang chez un chat.<sup>4</sup> Différents protocoles de sédation sont décrits: association kétamine – benzodiazépine +/- butorphanol, association tilétamine – zolazepam, association dexmédétomidine – butorphanol +/- kétamine, association alfaxolone – midazolam – butorphanol, par voie intraveineuse ou intramusculaire.<sup>48, 51, 53-56</sup> L'utilisation d'une anesthésie gazeuse avec du sévoflurane a également été décrite comme sécuritaire et menant à un réveil plus rapide que les protocoles de sédation injectable.<sup>52, 56-58</sup> L'ensemble de ces protocoles peut avoir des effets secondaires sur le donneur, dépendamment des molécules utilisées, de leurs doses et de leurs voies d'administration. Par exemple, une étude a comparé quatre protocoles de sédation intramusculaire et a montré que l'association midazolam-butorphanol n'entraînait pas de sédation chez un chat en santé, tandis que l'association midazolam-butorphanol-kétamine entraînait une sédation adéquate avec des effets cardiovasculaires minimes. L'ajout de dexmédétomidine entraînait une dépression cardiovasculaire plus importante.<sup>59</sup> Des changements de température corporelle (hypothermie ou hyperthermie) sont également rapportés avec différents protocoles de sédation injectable.<sup>53, 57</sup>

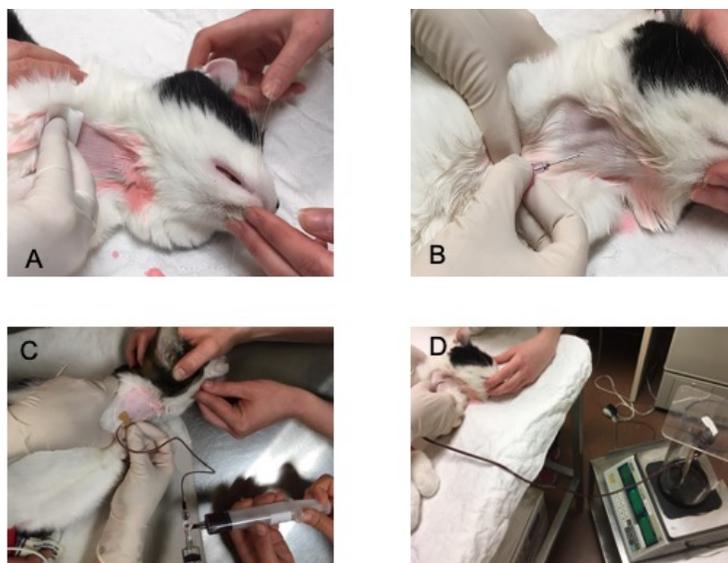
Certains auteurs recommandent d'éviter l'utilisation de l'acépromazine qui pourrait interférer avec le fonctionnement des plaquettes, bien que les preuves soient négligeables et qu'il n'y ait aucune donnée chez le chat.<sup>55</sup> De même, le propofol est souvent déconseillé sachant qu'il peut conduire à une dépression respiratoire sévère et à des dommages oxydatifs des globules rouges, lors d'utilisations répétées.<sup>60, 61</sup> Il n'y a pas de donnée disponible dans la littérature sur la persistance des différentes molécules utilisées pour

la sédation dans les produits sanguins frais ou conservés, ni sur leurs effets potentiels chez le receveur, ni sur l'existence d'interactions avec les anticoagulants et agents de conservation présents dans les produits sanguins. La biodisponibilité des molécules dans les produits sanguins pourrait être modifiée suite à leur dégradation, leur liaison aux protéines plasmatiques, leur liaison aux globules rouges, ou encore leur absorption par les globules rouges. Des études seraient nécessaires pour évaluer la concentration des différents agents anesthésiques utilisés chez les donneurs dans les produits sanguins félins juste après le prélèvement puis au cours du stockage.

Avec le développement de recommandations pour mieux manipuler les chats et reconnaître leurs signes d'anxiété, un prélèvement sans sédation par du personnel entraîné peut être envisagé.<sup>62</sup> Dans une étude sur 32 chats prélevés 115 fois (70 fois sans sédation et 45 fois avec sédation), des mouvements et des signes d'anxiété étaient plus fréquemment observés chez les chats non sédatisés, mais sans impact sur le succès du prélèvement. L'étude concluait que le prélèvement sur chats vigiles était une alternative à considérer lorsque le donneur était préalablement sélectionné pour son caractère conciliant et que le manipulateur était formé à reconnaître les signes de nervosité du chat. Une bonne évaluation du niveau de stress est essentielle pour éviter des manipulations inutiles qui pourraient conduire à des comportements d'agressivité et à des effets secondaires indésirables chez le donneur (i.e., détresse respiratoire et collapse).<sup>54</sup> Le prélèvement sur chat vigile offre l'avantage d'éviter les potentiels effets secondaires d'une sédation et d'être ainsi plus attrayante pour des propriétaires lors du recrutement de donneurs félins.

#### *3.2.4. Prélèvement*

Lorsque tout est prêt pour le prélèvement, le chat est placé en décubitus latéral ou sternal. La zone en regard des jugulaires est rasée puis désinfectée, habituellement avec une solution de Chlorhexidine diluée à 2 % et de l'alcool isopropylique à 70 %.<sup>1</sup> Une crème anesthésique locale à base de lidocaïne peut être appliquée au niveau de la zone de prélèvement chez les chats n'ayant pas reçu de sédation. Ce type d'anesthésiant doit être laissé au contact de la peau pendant au moins 20 à 60 minutes avant le prélèvement pour avoir un effet.<sup>63, 64</sup> La personne qui réalise la ponction veineuse met des gants stériles. Après ponction avec une aiguille, de 19 ou 21 gauges, généralement, le sang est soit aspiré lentement et de manière continue dans des seringues, soit collecté dans un sac par gravité ou succion à l'aide d'une chambre à vide. Le dispositif est alors placé sur une balance de précision afin de mesurer le volume collecté, en considérant que la densité du sang est de 1.053 (figure 4).



**Figure 4 - Les étapes du prélèvement de sang chez un chat sédaté**  
*A : désinfection de la peau; B : compression de la veine en vue de la ponction; C : prélèvement par un système ouvert composé de deux seringues; D : prélèvement par un système fermé avec un sac.*

La durée moyenne d'un prélèvement avec un système ouvert chez le chat est d'environ 8 à 9 minutes, ce qui correspond à un débit de 1.2 à 1.5 mL/kg/min pour un donneur standard (de 4 à 5 kg) et un volume prélevé de 50 mL.<sup>52, 57</sup> Aucune donnée n'a été publiée pour le système fermé chez le chat, mais une étude chez le chien rapporte un temps de prélèvement d'environ 4 minutes, ce qui correspond à un débit de 3,7 mL/kg/min pour un donneur de 30 kg et un volume prélevé de 450 mL.<sup>65</sup>

Après le prélèvement, le sang est mélangé doucement avec l'anticoagulant. Si un système ouvert a été utilisé, le sang doit idéalement être immédiatement transfusé. Si le sang a été prélevé dans un système fermé, le sang entier peut être séparé en différents composés sanguins ou stocké. L'unité de sang doit être scellée par des clips en aluminium ou par thermoscellage. Le sang ne peut pas, et ne doit pas, être stocké dans des seringues placées au réfrigérateur, car les seringues sont des contenants non adaptés pour éviter une contamination bactérienne et assurer la viabilité des globules rouges.<sup>1</sup>

### 3.2.5. Effets secondaires sur le donneur

Les effets secondaires sévères d'un prélèvement chez le chat sont rares, dépendent du protocole de sédation utilisé, de la sélection préalable du donneur et du bon déroulement du prélèvement. Une étude rapporte un collapse post-prélèvement chez un chat non sédaté, suspecté être d'origine vaso-vagale.<sup>54</sup> Une autre étude rapporte le décès, deux jours après le prélèvement, d'un chat avec une cardiomyopathie dilatée occulte découverte à la nécropsie.<sup>30</sup>

Des effets cardio-vasculaires transitoires sont par contre souvent décrits au moment et juste après le prélèvement : diminution ou augmentation de la pression artérielle systolique, diminution de la fréquence cardiaque. Ces effets ne nécessitent pas forcément d'intervention spécifique, exceptée une surveillance du donneur.<sup>52, 53</sup> Une autre étude rapporte toutefois que 84 % des donneurs anesthésiés avec du sévoflurane et 42 % des donneurs sédatisés avec une combinaison de kétamine-midazolam-butorphanol présentaient une hypotension post-prélèvement nécessitant l'administration d'une fluidothérapie (pression artérielle < 70 mmHg au Doppler).<sup>57</sup> Au CHUV, entre 50 et 60 mL de fluides isotoniques sont administrés par voie sous-cutanée à tous les donneurs immédiatement après le prélèvement.

Les autres effets secondaires possibles sont reliés à la ponction veineuse *sensu stricto* et incluent notamment l'apparition d'un hématome. Ces effets secondaires sont notés chez 20 % des donneurs en médecine humaine.<sup>66</sup> Une seule étude décrit une fréquence de 11 % d'hématome post prélèvement chez le chat (sur 115 prélèvements), sans différence entre les chats sédatisés et les chats vigiles.<sup>54</sup> De tels effets secondaires sont importants à considérer, car, bien que ne mettant pas en danger la vie du donneur, ils ont un possible impact négatif sur la perception du propriétaire.

#### **4. Conservation des produits sanguins**

Les objectifs de la conservation des produits sanguins sont de garder intact les composants sanguins (intégrité physique et fonctionnelle) et d'éviter la prolifération bactérienne. Dans cette partie, nous traiterons uniquement de la conservation du sang entier et des pRBC, le stockage du plasma étant facilité par l'absence de cellules et sa conservation congelée (voir paragraphe 1.1.3).

##### **4.1. Différents anticoagulants et agents de conservation**

Le sang doit être prélevé avec des anticoagulants pour éviter la formation de caillots. Lorsque le produit sanguin est destiné à être stocké ou séparé en différents composants sanguins, des agents de conservation sont ajoutés afin de minimiser les effets du stockage sur la viabilité des globules rouges. Différents anticoagulants et agents de conservation sont utilisés en médecine vétérinaire.

###### *4.1.1. Anticoagulants sans agent de conservation*

L'héparine bloque la coagulation en se combinant avec l'antithrombine III. Ce complexe est un puissant inhibiteur des protéases impliquées dans la cascade de coagulation (thrombine et facteurs IXa, Xa, XIa et XIIa). L'héparine peut être utilisée si le sang est transfusé immédiatement après le prélèvement. Une dose de 5 à 10 UI par millilitre de sang est recommandée. L'héparine n'est pas une solution de préservation et

ne permet donc pas le stockage du produit sanguin. De plus, elle est contre-indiquée si la transfusion vise à traiter un trouble de la coagulation.<sup>67</sup>

Le citrate de sodium (3,8 %) inhibe la coagulation en chélatant le calcium indispensable pour de nombreuses étapes de la coagulation. Il ne possède pas de propriétés conservatrices et est utilisé pour les transfusions à usage immédiat. Généralement, un ratio de 1 mL pour 9 mL de sang est recommandé.<sup>67</sup>

#### 4.1.2. Anticoagulants avec agents de conservation

Les agents de conservation sont formulés pour limiter les effets du stockage sur les globules rouges. Une attention particulière est apportée à leurs capacités à maintenir les concentrations en adénosine triphosphate (ATP), et dans une moindre mesure en 2,3-diphosphoglycérate (2,3-DPG). En effet, les globules rouges ont besoin d'ATP pour maintenir leur forme normale et leur déformabilité. Cette énergie dérive presque entièrement de la glycolyse anaérobie qui métabolise une molécule de glucose et libère deux molécules d'ATP. La glycolyse conduit également à la formation de 2,3-DPG qui se lie à la sous-unité bêta de la désoxyhémoglobine afin de diminuer son affinité pour l'oxygène et en favoriser la libération. Les globules rouges des chats possèdent des concentrations faibles en 2,3-DPG comparativement aux autres espèces. Le 2,3-DPG n'apparaît donc pas indispensable à la libération de l'oxygène par l'hémoglobine féline.<sup>51, 67, 68</sup>

Le citrate-phosphate-dextrose (CPD) et le citrate-phosphate-dextrose-adénine-1 (CPDA-1) sont les solutions de conservation utilisées en médecine humaine. Le citrate est l'anticoagulant; le dextrose la source de glucose nécessaire pour la glycolyse; le phosphate sert de tampon pour favoriser la survie des globules rouges et de substrat à la formation d'ATP et de 2,3-DPG; finalement, l'adénine sert de substrat à la synthèse d'ATP. Un ratio de 1 mL de CPD ou CPDA-1 pour 7 à 9 mL de sang est recommandé.<sup>67</sup> La présence d'adénine et d'une plus grande concentration en dextrose dans le CPDA-1 semble autoriser une durée de conservation plus longue des produits sanguins, comparativement au CPD.<sup>69</sup>

L'acide-citrate-dextrose (ACD) existe sous deux formes : A et B, qui diffèrent uniquement par leur concentration en citrate. Elle est moins coûteuse que le CPD et le CPDA-1. Un ratio de 1 mL d'ACD (A) pour 7 mL de sang et 1 mL d'ACD (B) pour 4 mL de sang sont habituellement utilisés.<sup>67</sup>

Lors de la séparation des composés sanguins, une solution additive (AS; *additive solution*) peut être utilisée en plus pour favoriser la conservation des pRBC. Les solutions AS-1 (Adsol), AS-3 (Nutricel), AS-5 (Optisol) et SAGM sont utilisées en médecine humaine et certaines (AS-1, AS-3, et AS-5) ont été étudiées chez le chien.<sup>70-72</sup> Toutes ces solutions contiennent du chlorure de sodium, de l'adénine, du dextrose et du

mannitol à des concentrations différentes, exceptée l'AS-3 qui ne contient pas de mannitol mais du phosphate trisodique et de l'acide citrique. Les AS sont encore peu utilisées en médecine transfusionnelle féline, avec seulement une étude rapportant l'utilisation d'AS-3 pour la conservation de pRBC chez le chat et une autre celle de SAGM.<sup>21, 73</sup>

#### 4.2. Conditions de stockage du sang entier et des concentrés de globules rouges

Lors de leur stockage, les unités sont rigoureusement identifiées avec, à minima, le groupe sanguin du donneur, la date de prélèvement, la date d'expiration, et le type de produit sanguin (figure 5).



**Figure 5- Exemple d'une unité de sang entier félin**

*L'unité est identifiée avec le groupe sanguin du donneur, l'identité du donneur, la date de prélèvement et la date d'expiration*

Les produits sanguins sont stockés dans un réfrigérateur qui leur est dédié exclusivement pour limiter une possible contamination chimique ou biologique. Le réfrigérateur doit être équipé d'un dispositif de surveillance continue de la température avec une alarme.<sup>1</sup> Les conditions réfrigérées doivent être respectées pour limiter la croissance des bactéries et le développement de lésions de stockage des globules rouges. En médecine humaine, l'AABB recommande que le sang ne dépasse pas une température de 10°C lors de son transport ou entreposage.<sup>74</sup> Certains pays, dont le Canada, appliquent la règle des « 30 minutes » qui recommande d'éliminer les pRBC non utilisés et exposés à des températures non contrôlées pendant plus de 30 minutes. Cette règle rejoint les recommandations de l'AABB puisqu'elle est fondée sur des études ayant démontré que des unités de pRBC de 270 à 300 mL pouvaient atteindre des températures supérieures à 10°C en 20 à 60 minutes à température ambiante.<sup>75</sup> Cette règle des 30 minutes ne semble pas s'adapter aux unités de pRBC d'un plus petit volume (75 mL) qui atteignent une température supérieure à 10°C en 15 minutes lorsqu'elles sont conservées à température ambiante.<sup>76</sup>

Il y a peu de rapports pour appuyer ces limites fixées de 10°C et 30 minutes. Des études en médecine humaine les remettent en question en démontrant l'absence de croissance significative de bactéries ou

de dégradation de la qualité *in vitro* des unités exposées à des températures ambiantes pendant au moins 30 minutes.<sup>77-79</sup> Cependant, il n'y a actuellement pas suffisamment de preuves pour ne pas les appliquer, surtout en médecine vétérinaire. Les unités de sang entier et de pRBC doivent donc être maintenues à une température située entre 1 et 6°C et ne doivent être sorties du réfrigérateur que lorsqu'elles sont utilisées pour une transfusion.<sup>1</sup>

### **4.3. Qualité des produits sanguins conservés**

Outre l'absence de contamination bactérienne, les globules rouges stockés doivent survivre en circulation et apporter suffisamment d'oxygène aux tissus pour être utiles au receveur.

#### *4.3.1. Estimation in vivo de la viabilité des globules rouges*

L'évaluation du pourcentage de globules rouges qui survivent chez le receveur dans les premières 24 heures post-transfusion permet de prédire la survie de la population globale des globules rouges transfusés. Les standards de la Food and Drug Administration (FDA) requièrent ainsi qu'au moins 75 % des globules rouges transfusés soient viables 24 heures après la transfusion pour considérer la conservation du produit (sang entier ou pRBC) satisfaisante.<sup>67</sup>

Le suivi des globules rouges transfusés peut être accompli par radio-marquage, habituellement avec du chrome-51 (<sup>51</sup>Cr). Les globules rouges radio-marqués sont transfusés à un patient, l'activité du <sup>51</sup>Cr est mesurée en circulation 24 heures après la transfusion et est exprimée en pourcentage de l'activité initiale.<sup>67</sup><sup>80</sup> Des techniques utilisant la biotine ont également été décrites afin de limiter l'utilisation de marqueurs radioactifs. La biotine se fixe aux groupements d'acides aminés libres des protéines membranaires des érythrocytes. Après transfusion de globules rouges marqués par la biotine, la biotinylation peut être mesurée par cytométrie en flux pour mesurer le pourcentage de globules rouges transfusés encore en circulation.<sup>81-85</sup>

#### *4.3.2. Estimation in vitro de la viabilité des globules rouges*

Les indicateurs habituels de la survie des globules rouges *in vitro* sont leurs concentrations en ATP, en 2,3-DPG, le pH et le pourcentage d'hémolyse. Les concentrations en sodium, potassium et glucose du surnageant ainsi que les modifications morphologiques des globules rouges peuvent aussi être déterminés. Plusieurs études se sont intéressées à ces changements appelés « lésions de stockage » dans le sang entier ou les pRBC félins (tableaux 5 et 6).<sup>21, 47, 51, 73, 86, 87</sup>

Tableau 5. – Comparaison des changements biochimiques et hématologiques observés au cours du stockage de sang entier

Études	Conditions de stockage	Changements biochimiques	Changements hématologiques
Wong <i>et al.</i> <sup>86</sup>	Sang entier CPDA-1 35 jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↔ du chlore</li> </ul>	NE
Cummings <i>et al.</i> <sup>87</sup>	Sang entier CPDA 28 jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ ammoniac : 48 à 417 <math>\mu\text{mol/L}</math></li> </ul>	NE
Spada <i>et al.</i> <sup>47</sup>	Sang entier CPDA-1 35 jours	NE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ échinocytes</li> <li>• ↑ sphérocytes</li> <li>• ↑ macrocytes</li> <li>• ↓ globules blancs</li> <li>• ↓ plaquettes</li> </ul>
Crestani <i>et al.</i> <sup>51</sup>	Sang entier CPDA-1 35 jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ ATP : 1,45 à 0,62 <math>\mu\text{mol/g d'Hb}</math></li> <li>• ↓ 2,3-DPG : forte variabilité individuelle</li> <li>• ↓ pH : 7,21 à 7,05</li> <li>• ↓ glucose : 30,11 à 22,91 <math>\text{mmol/L}</math></li> <li>• ↑ potassium : 3,10 à 4,12 <math>\text{mmol/L}</math></li> <li>• ↑ lactates 3,30 à 13,36 <math>\text{mmol/L}</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ échinocytes</li> <li>• ↑ hémolyse : 0,11 à 0,84 %</li> <li>• ↔ hématocrite</li> </ul>

↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; ↔ : stabilité ; Hb : hémoglobine ; NE : non évalué

Tableau 6. – **Comparaison des changements biochimiques et hématologiques observés au cours du stockage de pRBC**

Études	Conditions de stockage	Changements biochimiques	Changements hématologiques
Heinz <i>et al.</i> <sup>73</sup>	pRBC ACD-A AS-3 35 jours	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↓ pH</li> <li>• ↓ glucose : 19,50 à 1,90 mmol/L</li> <li>• ↑ sodium : 139,40 à 158,20 mmol/L</li> <li>• ↑ chlore : 93,15 à 131,00 mmol/L</li> <li>• ↓ potassium : 2,91 à 2,38 mmol/L</li> <li>• ↑ lactates : 2,38 à 19,18 mmol/L</li> <li>• ↑ ammoniac : 85,31 à 891,00 <math>\mu</math>mol/L</li> </ul>	NE
Blasi Brugué <i>et al.</i> <sup>21</sup>	pRBC CPD SAGM 42 jours	NE	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ↑ hémolyse : 0,07 à 0,81 %</li> <li>• ↓ hématokrite 52,2 à 49,34 %</li> </ul>

↑ : augmentation ; ↓ : diminution ; NE : non évalué

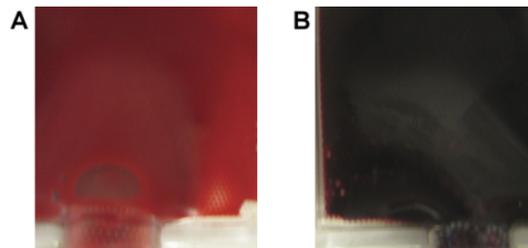
Ces quelques études montrent globalement les mêmes changements avec une diminution du pH, du glucose et une augmentation de l'ammoniac, des lactates et de l'hémolyse. Les changements électrolytiques sont quant à eux variables. Une seule étude a décrit une diminution de la concentration en ATP et en 2,3-DPG.<sup>51</sup> En médecine humaine, des concentrations minimales en ATP de 2,3 à 2,7  $\mu$ mol/g Hb sont recommandées dans les unités de pRBC car elles ont été corrélées à une survie de 75 % des globules rouges transfusés pendant les premières 24 heures suivant la transfusion.<sup>88, 89</sup> L'hémolyse peut également être utilisée comme un signe indirect de lésions de stockage car elle est associée à une rupture des globules rouges. De plus, l'hémolyse conduit à une libération d'hémoglobine dans le produit sanguin qui peut être délétère pour le receveur lors de la transfusion (toxicité rénale). Un pourcentage maximum d'hémolyse de 0,8 à 1 % est recommandé à la fin de la période de stockage des pRBC pour autoriser la transfusion (selon le conseil européen et la FDA, respectivement). De telles valeurs seuil ne sont pas publiées pour les produits sanguins chez le chat. Les analyses *in vitro* chez le chat ne peuvent donc pas être utilisées à l'heure actuelle pour prédire de manière précise la survie des globules rouges transfusés chez le receveur.

#### 4.3.3. Contamination et prolifération bactérienne

La contamination bactérienne des produits sanguins est un problème majeur en médecine transfusionnelle. Une contamination peut se produire à différents moments : au cours du prélèvement, au cours de la transformation ou du stockage des composés sanguins, au cours de la fabrication du système

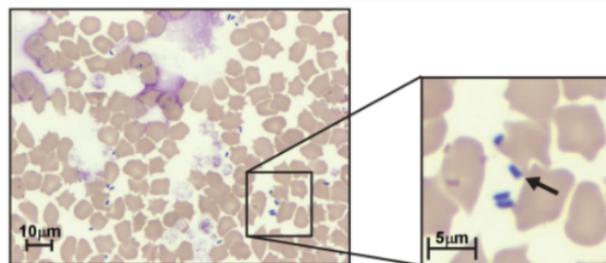
de collecte, ou encore par le donneur (par le sang ou la peau).<sup>90</sup> Il est rarement possible de déterminer l'origine de la contamination.

Il existe différentes méthodes de détection des bactéries dans les produits sanguins (tableau 7). Une évaluation macroscopique de la couleur peut alerter sur la contamination éventuelle du produit sanguin (figure 6).<sup>91 92</sup> Il est suspecté que le changement de couleur soit secondaire à une diminution de la pression partielle en oxygène combinée à une hémolyse des globules rouges. L'observation d'un tel changement doit mener à la réalisation d'autres tests pour identifier le microorganisme en cause.



**Figure 6 - Changement de couleur d'une unité de pRBC suite à une contamination bactérienne**  
(A) unité de pRBC féline régulière; (B) unité de pRBC contaminée par *Pseudomonas fluorescens* à 22 jours de stockage; d'après<sup>91</sup>; ©2009 American Society for Veterinary Clinical Pathology; avec permission

Un examen microscopique par coloration de Gram d'un frottis de l'unité sanguine est une méthode simple mais peu sensible pour identifier des bactéries (figure 7).



**Figure 7 - Bâtonnets libres visualisés sur le frottis issu d'une unité de pRBC féline contaminée**  
La flèche montre un organisme de *Pseudomonas fluorescens* sur les 4 visibles dans le champ; d'après<sup>91</sup>; ©2009 American Society for Veterinary Clinical Pathology; avec permission

La culture est considérée comme le « gold standard » en médecine humaine.<sup>93</sup> C'est une technique plus sensible que la coloration de Gram et qui a l'avantage de permettre d'identifier la bactérie isolée et également de réaliser un antibiogramme. Ses inconvénients sont qu'elle est plus coûteuse et plus longue qu'une coloration de Gram. De plus, certaines bactéries, comme *Pseudomonas fluorescens* nécessitent un milieu de culture spécifique pour croître et ne sont pas isolées sur des milieux standards.

Récemment, des études rapportent l'utilisation de la PCR « universelle » ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S (ARN ribosomal 16S). Ce gène étant composé de régions conservées présentes chez toutes les espèces bactériennes, cette technique permet de détecter n'importe quelle bactérie dans un échantillon. Elle permet également d'identifier la bactérie isolée par séquençage. Cette technique a l'avantage de détecter rapidement des espèces bactériennes fastidieuses (24 à 48 heures).<sup>90</sup> En médecine humaine, la sensibilité et la spécificité de la PCR 16S pour la détection de bactéries dans le sang sont de 87 % et 94 %, respectivement.<sup>94</sup> Son inconvénient principal repose sur la détection d'ADN de bactéries mortes ou dégradées, conduisant à des résultats faussement positifs.

Aux États-Unis, moins de 0,2 % des pRBC humains stockés à 4°C sont contaminés avec des bactéries. Les bactéries fréquemment isolées sont des streptocoques, des staphylocoques et des bactéries gram négatives comme *Serratia liquifaciens*, *Serratia marcescens*, *Yersinia enterocolitica*, *Acinetobacter* spp. et *Pseudomonas* spp.<sup>90, 95, 96</sup> En médecine transfusionnelle féline, quelques études ont investigué la contamination bactérienne sur un nombre parfois limité d'unités de sang entier ou de pRBC (tableau 7). Trois études rapportent des contaminations bactériennes isolées d'un seul produit sanguin par *Pseudomonas fluorescens* ou *Serratia marcescens*.<sup>51, 92, 97</sup> Une étude a également décrit la contamination à *Serratia marcescens* de 29 unités de sang entier félin, suite à l'utilisation d'une solution saline contaminée pour tranquilliser les chats donateurs.<sup>98</sup>

Tableau 7. – **Résumé des études sur la contamination bactérienne des unités de sang entier ou de pRBC félins stockées entre 1 et 6°C**

Étude	Produit sanguin et système de collecte utilisé	Méthode de détection	Bactérie
Hohemhaus <i>et al.</i> <sup>98</sup>	29 unités de sang entier ND	ND	<i>Serratia marcescens</i>
Kessler <i>et al.</i> <sup>92</sup>	1 unité pRBC Système fermé	Changement de couleur (J22) Coloration Gram de frottis Culture PCR 16 S	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Stefanetti <i>et al.</i> <sup>97</sup>	1 unité de sang entier Système ouvert	Changement de couleur (J32) Coloration Gram de frottis Culture PCR 16 S	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Spada <i>et al.</i> <sup>99</sup>	15 unités de sang entier 2 pRBC Système ouvert	Culture aérobie (J1, J35, J42)	Pas de bactérie détectée
Heinz <i>et al.</i> <sup>73</sup>	10 pRBC Système de collecte non spécifié	Culture aérobie et anaérobie (J35)	Pas de bactérie détectée
Blasi-Brugué <i>et al.</i> <sup>21</sup>	489 pRBC Système semi-fermé	Culture aérobie (J1)	Pas de bactérie détectée
Crestani <i>et al.</i> <sup>51</sup>	8 unités de sang entier Système fermé	Culture aérobie et anérobie (J0, J7, J14, J21, J28 et J35)	<i>Serratia marcescens</i> dans 1 unité à J35

ND : non disponible; J : jour post-prélèvement

#### 4.4. Durée de conservation

Comme indiqué à plusieurs reprises, si un système ouvert est utilisé, une conservation pendant maximum 24 heures entre 1 et 6°C est recommandée. Si un système semi-fermé ou fermé est utilisé, une conservation pendant plusieurs semaines entre 1 et 6°C peut être envisagée. La durée de stockage va dépendre de l'anticoagulant, de l'agent de conservation et de l'utilisation ou non d'une solution additive. Il est important de noter que la survie des globules rouges dans une solution de conservation donnée diffère d'une espèce à l'autre et que les durées de stockage utilisées en médecine humaine ou chez le chien ne devraient pas être appliquées aveuglement au chat. Malheureusement, peu d'études se sont intéressées à la viabilité des globules rouges transfusés chez le chat. Les tableaux 8 et 9 résument les différentes durées de stockage des produits sanguins félins trouvés dans la littérature en fonction du type d'étude (étude clinique ou étude de la viabilité des globules rouges) et démontrent la grande variabilité de pratique en fonction des différents auteurs. En prenant en compte ces données, il semble raisonnable de conclure qu'une durée de conservation entre 28 et 35 jours est sécuritaire, aussi bien pour le sang entier félin avec CPDA-1 ou ACD, que pour les pRBC avec CPDA-1 ou ACD et solution additive. Une période de conservation supérieure à 35 jours n'est actuellement pas recommandée.

Tableau 8. – Comparaison des durées de stockage du sang entier félin entre 1 et 6°C dans différentes solutions de conservation

Études	Type d'études	Anticoagulant/ conservateur/ solution additive	Durée du stockage décrite
Marion <sup>80</sup>	Étude de viabilité <i>in vivo</i>	ACD-B	28 jours
Bucheler <sup>100</sup>	Étude de viabilité <i>in vivo</i>	CPDA-1	35 jours
Crestani <i>et al.</i> <sup>51</sup>	Étude de viabilité <i>in vitro</i>	CPDA-1	35 jours
Spada <i>et al.</i> <sup>47</sup>	Étude de la morphologie des GR au cours du stockage	CPDA-1	35 jours
Castellanos <i>et al.</i> <sup>16</sup>	Étude clinique rétrospective	ACD-A	21 jours
Weingart <i>et al.</i> <sup>30</sup>	Étude clinique rétrospective	CPDA-1	20 jours
Stefanetti <i>et al.</i> <sup>97</sup>	Cas clinique rétrospectif	CPDA-1	30-35 jours
Hourani <i>et al.</i> <sup>48</sup>	Étude clinique prospective	CPDA-1	21 jours

Tableau 9. – Comparaison des durées de stockage du pRBC félines entre 1 et 6°C dans différentes solutions de conservation

Études	Type d'études	Anticoagulant/ conservateur/ solution additive	Durée du stockage décrite
Heinz <i>et al.</i> <sup>73</sup>	Étude de viabilité <i>in vitro</i>	ACD-A AS-3	35 jours
Blasi Brugué <i>et al.</i> <sup>21</sup>	Étude de viabilité <i>in vitro</i>	CPD SAGM	28 jours
Weltman <i>et al.</i> <sup>101</sup>	Étude clinique rétrospective	CPD	30 jours
Martinez <i>et al.</i> <sup>17</sup>	Étude clinique rétrospective	CPDA-1 AS-5	35 jours

#### 4.5. Impact possible du stockage sur le receveur

L'administration de sang entier ou de pRBC stockés pourraient être associée à des risques pour le receveur pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, des conditions inappropriées de stockage et notamment un contrôle inadéquat de la température peuvent entraîner une altération des globules rouges et conduire à leur lyse. Un rapport de cas décrit quatre réactions transfusionnelles hémolytiques aiguës, non médiées par le système immunitaire, chez des chiens ayant reçu des pRBC hémolysés suite à des conditions de réfrigération inappropriées.<sup>102</sup> Ces réactions hémolytiques peuvent entraîner une activation de l'hémostase avec initiation d'une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), une hypotension, un état de choc, une insuffisance rénale aiguë, voire le décès de l'animal (voir chapitre 2, paragraphe 8.2) Il est donc recommandé de contrôler visuellement l'hémolyse d'une unité sanguine avant de la transfuser.

Une température de stockage trop élevée peut aussi augmenter le risque de prolifération bactérienne. L'impact d'une unité contaminée sur le receveur dépend de la qualité, la quantité et les propriétés pathogènes de la bactérie contaminante, ainsi que du statut clinique du receveur. Des signes cliniques tels que de la fièvre, une tachycardie, une tachypnée, des vomissements, voire un choc endotoxique sont possibles. Une étude rapporte le décès de 4 chats transfusés avec du sang entier contaminé par *Serratia marcescens*.<sup>98</sup> Il reste difficile en médecine vétérinaire de connaître la morbidité et la mortalité associée à

la transfusion de produits sanguins contaminés par des bactéries car les études rétrospectives s'intéressant aux réactions transfusionnelles chez les chiens ou les chats ne décrivent pas la recherche de bactéries dans les unités transfusés.<sup>17, 36, 37</sup>

Enfin, malgré des conditions de stockage considérées adéquates, le vieillissement du produit sanguin et l'apparition de lésions de stockage pourraient avoir un effet délétère sur le receveur. En médecine humaine, un stockage prolongé des globules rouges avant transfusion a été associé avec une augmentation de la mortalité, mais des résultats contradictoires sont publiés.<sup>103-106</sup> En médecine vétérinaire, des résultats contradictoires existent aussi. Une étude menée chez 211 chiens n'a pas démontré d'association entre l'âge des pRBC transfusés et le développement de complications post-transfusionnelles ou la mortalité, mais cette étude manquait de puissance statistique.<sup>36</sup> Une deuxième étude sur une large cohorte de chiens (3095) a confirmé l'absence d'association entre l'âge des pRBC et la mortalité, dans la population en général. Par contre, un stockage prolongé des pRBC était associé à une diminution de la survie chez les chiens atteints d'anémie hémolytique.<sup>107</sup> Une troisième étude a montré que l'âge des pRBC transfusés était associé avec une augmentation des complications post-transfusionnelles et plus spécifiquement avec une augmentation des réactions hémolytiques, sans pour autant affecter la mortalité.<sup>37</sup> À notre connaissance, de telles études n'existent pas encore chez le chat.

# Chapitre II – Les antigènes érythrocytaires du chat

## 1. Découverte du système AB chez le chat

### 1.1. Définition générale

Les groupes sanguins sont définis par des déterminants antigéniques exprimés à la surface des globules rouges, généralement des carbohydrates portés par des glycoprotéines ou des glycolipides, et qui possèdent des fonctions indépendantes de leur statut antigénique. Les antigènes des groupes sanguins sont des allo-antigènes, c'est-à-dire des marqueurs du « soi » qui sont exprimés par un groupe d'individus au sein d'une même espèce. Contrairement aux antigènes d'un agent pathogène qui conduisent au développement d'une réponse immunitaire chez tous les individus exposés, les allo-antigènes peuvent induire une réponse immunitaire uniquement chez les individus de l'espèce qui ne les expriment pas. Ces réactions immunitaires sont généralement liées à la production d'anticorps et ont mené à la découverte des groupes sanguins, aussi bien en médecine humaine qu'en médecine vétérinaire.<sup>108</sup>

Un système de groupes sanguins se définit par des antigènes érythrocytaires qui sont produits par différents allèles d'un même gène ou de gènes étroitement liés. Lorsqu'il existe plusieurs systèmes de groupe sanguin dans une espèce donnée, ils sont génétiquement indépendants.<sup>108</sup> Contrairement à d'autres espèces, comme le chien, le cochon, le mouton, la vache ou le cheval, qui possèdent de nombreux systèmes de groupes sanguins, un seul système est actuellement défini chez le chat : le système AB qui comprend les groupes A, B et AB (parfois appelé C).

### 1.2. Histoire du système AB

La découverte du système AB remonte au début du 20<sup>ème</sup> siècle. En 1912 dans la région de New-York, Ingebrigsten démontre l'existence d'isoagglutinines sériques qui réagissent avec les globules rouges chez deux chats (sur une population de 40).<sup>109</sup> En 1915, de nouveau dans la région de New-York, Ottenberg et Thalhimer confirment la présence d'isoagglutinines et démontrent l'existence de réactions transfusionnelles chez le chat.<sup>110</sup>

En 1950, Holmes définit pour la première fois un système de groupes sanguins chez le chat en étudiant 447 chats de la région de Manchester (Angleterre). Il décrit un groupe "EF" présentant un « isoagglutinogène » à la surface des globules rouges, qui représente 97 % de la population étudiée, et un groupe "O" ne présentant pas l' « isoagglutinogène » mais ayant l'isoagglutinine correspondante et qui

représente 3 % de la population.<sup>111</sup> En 1953, Holmes ajoute au système précédent un troisième groupe appelé « F », avec 95 % des chats de groupe « EF », 4 % des chats de groupe « O » et 1 % des chats de groupe « F », sur une population de 103 chats.<sup>112</sup>

La nomenclature actuelle du système AB est définie un peu plus tard, en 1962. Les groupes A et B correspondent aux groupes décrits précédemment par Holmes : A étant le groupe "EF" et B étant le groupe "O". À ce moment, aucun chat de groupe AB n'était observé dans une population de 350 chats en France.<sup>113</sup>

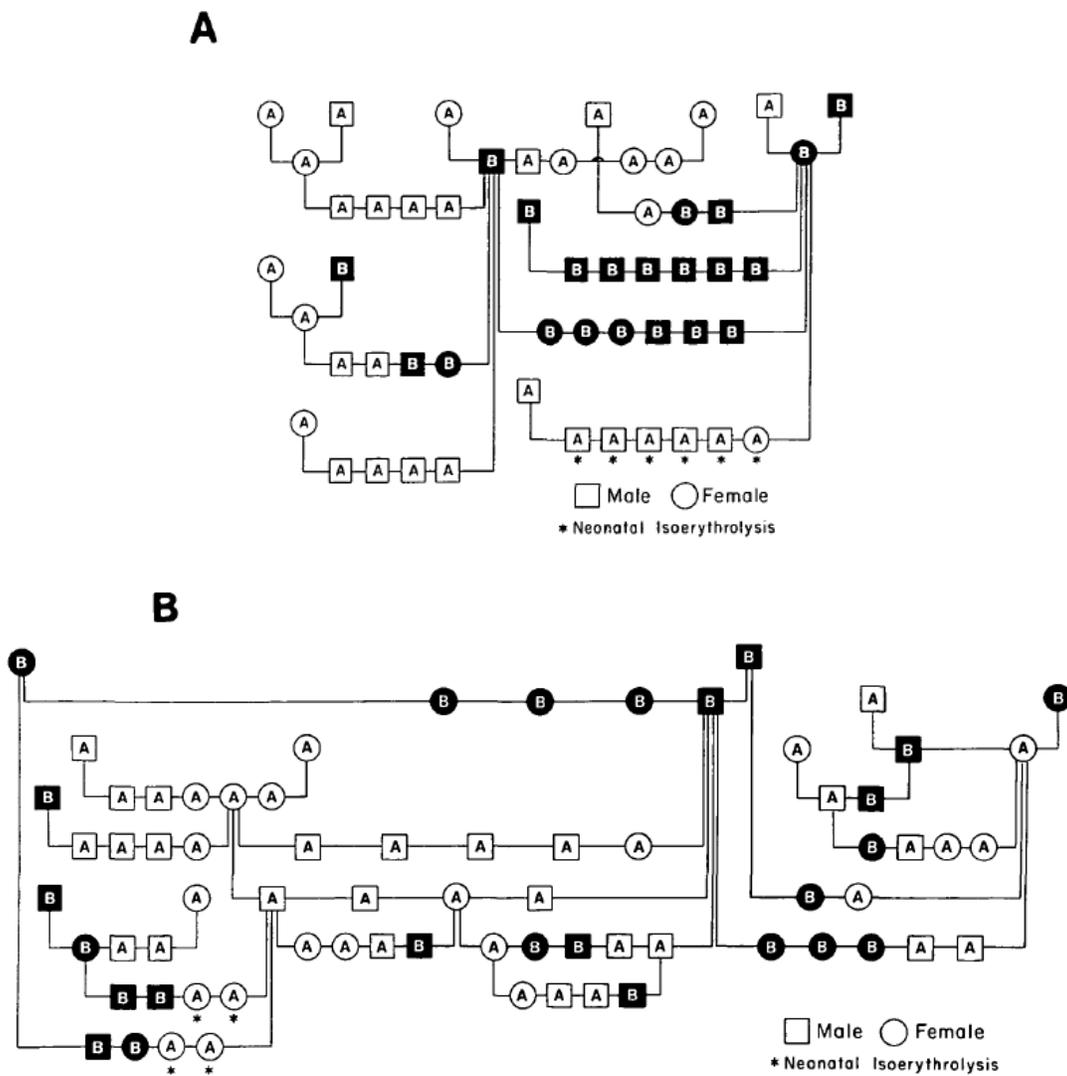
En 1981, l'existence des groupes A et B est confirmée et le groupe AB (ancien groupe « F ») est identifié dans une population de 1895 chats de la région de Brisbane en Australie. Cette étude montre également que le système AB du chat est parfaitement indépendant du système ABO de l'humain, et que les antigènes A et B félines sont détectables chez le fœtus à partir du 38<sup>ème</sup> jour de gestation. Des croisements de chats de groupe sanguin connu ont également été réalisés et, bien que les données étaient insuffisantes pour conclure définitivement sur le mode de transmission des groupes sanguins, il apparaissait déjà que deux allèles du même gène existaient, codant pour les antigènes A et B. L'allèle A semblait dominant par rapport à l'allèle B. Une codominance des allèles A et B était exclue puisque le croisement d'individus de groupe A avec des individus de groupe B n'avait donné aucun descendant de groupe AB.<sup>114</sup>

### **1.3. Hérité dans le système AB**

#### *1.3.1. Mode de transmission des groupes A et B*

Suite aux travaux de 1981, une analyse d'un plus grand nombre de pedigrees de chats de différentes races a été conduite afin de confirmer le mode de transmission des groupes sanguins du système AB. Les pedigrees d'une famille d'Abyssin et d'une famille de Birman montraient les résultats suivants (figure 8) :<sup>115</sup>

- Le croisement de deux individus de groupe B donne uniquement des descendants de groupe B
- Le croisement de deux individus de groupe A donne des descendants de groupe A et de groupe B
- Le croisement d'un individu A avec un individu B donne des descendants de groupe A en majorité et quelques descendants de groupe B (21.5 % sur 311 descendants)
- Aucun individu AB n'a été observé suite au croisement d'individus A et d'individus B



**Figure 8 - Pedigree de deux familles de chats**

(A) une famille d'Abyssin; (B) une famille de Birman; d'après<sup>115</sup>; © 1991 The American Genetic Association; avec permission

Ces résultats sont en faveur d'une hérédité monogénique ou mendélienne, c'est-à-dire que les groupes A et B sont liés à deux allèles situés sur le même locus. L'allèle *b* est récessif par rapport à l'allèle *A*, c'est-à-dire que les individus de groupe B sont homozygotes *bb* tandis que les individus de groupe A sont soit homozygotes *AA*, soit hétérozygotes *Ab*.<sup>115</sup>

### 1.3.2. Cas du groupe AB

Pendant longtemps le mode de transmission du groupe AB est resté hypothétique. Les observations obtenues de différentes études de pedigree montraient que le groupe AB était détecté uniquement chez les races dans lesquelles le groupe B était présent. Les chats AB étaient produits suite à un accouplement de chats AB avec des chats B ; le croisement d'un chat AB avec un chat A ne donnant que des descendants

de groupe A.<sup>114, 115, 116</sup> Ces observations avaient conduit à l'hypothèse de l'existence d'une troisième version allélique du même gène avec un allèle AB récessif par rapport à l'allèle A et dominant par rapport à l'allèle b.<sup>116</sup>

En 2007, cette hypothèse a été confirmée grâce à l'identification d'une mutation caractérisant l'allèle AB ( $a^{ab}$ ). Le mode de transmission des groupes sanguins félines a ainsi pu être établi.<sup>117</sup> (voir le paragraphe 3 pour plus de détails)

## 2. Épidémiologie des groupes A, B et AB

### 2.1. Distribution en fonction de la localisation géographique

Depuis la découverte du système AB, de nombreuses études ont évalué la fréquence de chaque groupe chez les chats domestiques en fonction de leur localisation géographique, en utilisant différentes techniques de typage sanguin. Dans la plupart des pays, la fréquence du groupe A est élevée et varie entre 85 et 100 %. Le groupe B est très peu représenté dans certains pays comme les États-Unis, la Hongrie ou la Suisse ; mais sa fréquence peut atteindre 25 % à 36 % dans d'autres pays comme l'Australie, la Grèce ou la Turquie. Le groupe AB reste le groupe le moins représenté, avec une fréquence souvent inférieure à 1 %. Des différences entre régions au sein d'un même pays sont également notées. Par exemple, aux États-Unis, la fréquence du groupe B augmente du Nord-Est vers la côte Ouest (tableau 10).

Tableau 10. – Fréquence des groupes sanguins chez les chats domestiques en fonction des différents pays et des années

Pays	Année de publication (Région)	Nombre de chats	Type A (%)	Type B (%)	Type AB (%)
Allemagne <sup>118</sup>	2006 (Berlin)	372	98.7	5.4	0.7
Angleterre <sup>119-122</sup>	1992	477	97.0	3.0	0.0
	1999 (Nord)	139	87.1	7.9	5.0
	2007 (Londres)	156	72.4	25.0	2.6
	2014 (Bristol)	82	79.3	12.2	8.5
Argentine <sup>123</sup>	1997	76	96.1	2.6	1.3

	(Buenos Aires)				
Australie <sup>114, 124</sup>	1981	1895	73.3	26.3	0.4
	2005 (Sydney)	187	62.0	36.0	1.6
Autriche <sup>125</sup>	1993	101	97.0	3.0	0.0
Brésil <sup>126</sup>	2008 (Rio de Janeiro)	172	94.8	2.9	2.3
Canada <sup>127, 128</sup>	2014 (Montréal)	178	94.4	5.0	0.6
	2020 (Saskatoon et Calgary)	400	96.0	4.0	0.0
Chine <sup>129</sup>	2011	262	88.2	11.4	0.4
Danemark <sup>130</sup>	1994 (Copenhague)	105	98.1	1.9	0.0
Écosse <sup>119</sup>	1992	70	97.1	2.9	0.0
Espagne <sup>131, 132</sup>	2004 (Barcelone)	100	94.0	5.0	1.0
	2017	56	91.1	8.9	0.0
États-Unis <sup>115, 133, 134</sup>	1989	280	99.0	1.0	0.0
	1991	1072	99.7	0.3	0.0
	1991 (Nord-Est)	1450	99.7	0.3	0.0
	1991 (Montagne Rocheuse)	506	99.4	0.4	0.2
	1991 (Sud-Est)	534	98.5	1.5	0.0
	1991 (Sud-Ouest)	483	97.5	2.5	0.0
	1991 (côte ouest)	812	94.8	4.7	0.5

France <sup>135, 136</sup>	2017 (Rhône Alpes)	231	89.6	10.0	0.4
	2019	320	83.7	14.4	1.9
Grèce <sup>137</sup>	2001	207	78.3	20.3	1.4
Hongrie <sup>138</sup>	2001 (Budapest)	73	100	0.0	0.0
Îles Canaries <sup>139</sup>	2004	97	88.7	7.2	4.1
Irlande <sup>140</sup>	2011 (Dublin)	137	84.7	14.6	0.7
Israël <sup>141</sup>	2011	242	72.7	14.5	12.8
Italie <sup>142, 143</sup>	2011 (Nord)	140	90.7	7.1	2.1
	2014 (Milan)	195	92.3	5.1	2.6
Japon <sup>144</sup>	1986 (Tokyo)	238	90.0	1.0	9.0
Nouvelle-Zélande <sup>145</sup>	2015	245	85.3	13.9	0.8
Pays-Bas <sup>119</sup>	1992	103	96.0	4.0	0.0
Portugal <sup>132, 146, 147</sup>	2004 (Nord)	147	89.1	4.1	6.8
	2011 (Lisbonne)	515	97.5	2.1	0.4
	2017	771	97.3	2.7	0.0
Turquie <sup>148, 149</sup>	2005 (Istanbul)	312	72.8	25.0	2.2
	2006	301	73.1	24.6	2.3
Suisse <sup>150</sup>	1993	1014	99.6	0.4	0.0
Suède <sup>151</sup>	2013	54	98.1	0.0	1.9

## 2.2. Distribution en fonction de la race

Les variations géographiques ne sont pas aussi prononcées pour les chats de race, mais de grandes variations entre races sont observées. Le groupe A est le groupe le plus fréquent chez la plupart des races. Cependant, la fréquence du type B peut atteindre 25 à 60 % dans certaines races telles que le Turc de Van, l'Angora Turc, le British Shorthair et le Devon Rex. Dans certaines races comme le Siamois, le groupe B n'a

presque jamais été rapporté. Le groupe AB est rare chez toutes les races, à l'exception du Ragdoll en Italie chez qui la fréquence du groupe AB atteint 18 % (tableau 11).

Tableau 11. – Fréquences des groupes sanguins chez les chats de race classés par année et pays

Race*	Année	Nombre de chats	Type A (%)	Type B (%)	Type AB (%)	Pays
Abyssin <sup>124</sup> , 130, 134, 152	1991	194	80.0	20.0	0.0	USA
	1994	20	100	0.0	0.0	Danemark
	2005	16	89.0	11.0	0.0	Australie
	2009	36	100	0.0	0.0	Australie
Angora turc <sup>153</sup>	2003	28	53.6	46.4	0.0	Turquie
Bengal <sup>154</sup>	2009	100	100	0.0	0.0	Angleterre
Birman <sup>120, 134</sup>	1991	216	82.4	17.6	0.0	USA
	1999	24	62.5	29.2	8.3	Royaume-Uni
British Shorthair <sup>118</sup> , 120, 125, 132, 134	1991	85	41.2	58.8	0.0	USA
	1993	30	70.0	30.0	0.0	Autriche
	1999	121	39.7	58.7	1.6	Royaume-Uni
	2006	35	71.4	28.6	0.0	Allemagne
	2017	12	83.3	16.7	0.0	Péninsule Ibérique
Burmese <sup>120</sup> , 124, 134	1991	25	100	0.0	0.0	USA
	1999	10	90.0	10.0	0.0	Royaume-Uni
	2005	71	93.4	3.3	3.3	Australie
Chartreux <sup>118</sup>	2006	27	77.8	18.5	3.7	Allemagne
Devon Rex <sup>124</sup> , 134	1991	100	57.0	43.0	0.0	USA
	2005	71	45.1	53.5	1.4	Australie
Himalayen <sup>134</sup>	1991	35	80.0	20.0	0.0	USA

Main Coon <sup>118</sup> , 132, 140, 143	2006	25	96.0	4.0	0.0	Allemagne
	2011	11	100	0.0	0.0	Irlande
	2014	75	100	0.0	0.0	Italie
	2017	32	93.8	6.3	0.0	Péninsule ibérique
Norvégien <sup>132</sup> , 134	1991	20	100	0.0	0.0	USA
	2017	47	100	0.0	0.0	Portugal
Persan <sup>118, 125</sup> , 130, 132, 134, 141	1991	170	75.9	24.1	0.0	USA
	1993	71	81.7	18.3	0.0	Autriche
	1994	56	96.4	3.6	0.0	Danemark
	1999	24	71.4	28.6	0.0	Royaume-Uni
	2006	22	95.5	0.0	4.5	Allemagne
	2011	15	100	0.0	0.0	Israël
	2017	84	91.7	8.3	0.0	Péninsule Ibérique
Ragdoll <sup>120, 143</sup> , 155	1999	24	71.4	28.6	0.0	Royaume-Uni
	2013	61	77.1	4.9	18.0	Italie
	2014	25	68.0	8.0	24.0	Italie
Scottish Fold <sup>134</sup>	1991	27	85.0	15.0	0.0	USA
Siamois <sup>121</sup> , 124, 125, 132, 134, 146	1993	11	100	0.0	0.0	Autriche
	1999	99	100	0.0	0.0	USA
	2004	19	100	0.0	0.0	Portugal
	2005	12	100	0.0	0.0	Australie
	2007	13	100	0.0	0.0	Angleterre
	2017	53	100	0.0	0.0	Portugal
Somali <sup>118, 134</sup> , 152	1991	27	77.8	22.2	0.0	USA
	2006	35	71.4	23.8	4.8	Allemagne
	2009	24	100	0.0	0.0	Australie
Tonkinois <sup>134</sup>	1991	31	100	0.0	0.0	USA
Turc Van <sup>153</sup> , 156	2004	78	42.3	57.7	0.0	Turquie
	2003	85	40.0	60.0	0.0	Turquie

\*(> 10 chats par race)

En comparant ces différentes études, il est important de prendre en compte certains facteurs ayant pu influencer la fréquence des groupes sanguins. Tout d'abord, les études ont chacune inclus et combiné un nombre variable de chats provenant de colonie, de chats en santé, de chats d'élevage testés pour le risque d'isoérythrolyse néonatale (INF), de chats testés en vue de devenir donneurs de sang, ou encore de chats malades hospitalisés. L'échantillon de chats inclus dans certaines études peut donc ne pas être représentatif de la population féline générale. De plus, certaines études ont plus de 30 ans d'écart. L'importation de chats, de race ou domestiques, suite à la mondialisation, ainsi que le croisement des chats au fil des années peuvent avoir contribué à un changement de la distribution des groupes sanguins entre les années 90 et aujourd'hui. De même, une sélection des chats de type A par les éleveurs pour limiter le risque d'INF a pu conduire à une diminution de la prévalence du groupe B chez certaines races.

De nombreuses études ont calculé le risque de réactions transfusionnelles basées sur la prévalence estimée des différents groupes sanguins.<sup>124, 126-128, 136</sup> Bien que le risque soit faible dans certaines régions (inférieur à 10 %), les conséquences d'une incompatibilité A-B peuvent être fatales. C'est pourquoi, il est toujours recommandé de réaliser un typage sanguin avant une première transfusion chez le chat.

### **3. Caractéristiques biologiques du système AB**

#### **3.1. Biochimie des antigènes sanguins du système AB**

##### *3.1.1. Identification moléculaire*

Comme indiqué précédemment, les antigènes des groupes sanguins sont généralement des glycoprotéines ou glycolipides situés à la surface des globules rouges. Les gangliosides représentent les glycolipides majoritaires de la membrane érythrocytaire du chat. Leur structure de base est constituée d'une céramide qui porte des oligosaccharides présentant un ou plusieurs résidus d'acide sialique.<sup>157</sup>

En 1991, une étude comparant la réactivité de différentes lectines envers les érythrocytes félines avait mis en évidence que la lectine de *Triticum vulgare* permettait d'agglutiner les érythrocytes des chats de type B, mais pas les érythrocytes des chats de type A ; or la lectine de *Triticum vulgare* est connue pour réagir uniquement avec les acides sialiques suivants: acide N-acétylneuraminique (NeuAc) et acide N-acétyl-D-glucosamine. Cette observation avait donc conduit à l'hypothèse que l'élément déterminant des antigènes des groupes sanguins du système AB chez le chat était probablement un résidu d'acide sialique.<sup>158</sup>

La même hypothèse était formulée dans une deuxième étude ayant isolé la membrane érythrocytaire de chats de groupe sanguin connu et l'ayant traitée avec du chloroforme et du méthanol pour en extraire les

glycolipides puis les analyser par chromatographie sur couche mince. Les profils de chromatographie montraient une différence dans la composition des érythrocytes des chats en fonction de leur groupe sanguin : les érythrocytes des chats A possédaient principalement le ganglioside [NeuGc-NeuGc]-Galactose-Glucose-Ceramide ( $[\text{NeuGc}]_2\text{G}_{\text{D3}}$ ) avec NeuGc représentant l'acide N-glycolylneuraminique; les érythrocytes des chats B possédaient majoritairement le ganglioside [NeuAc-NeuAc]-Galactose-Glucose-Ceramide ( $[\text{NeuAc}]_2\text{G}_{\text{D3}}$ ).<sup>159</sup>

Un an plus tard, des résultats supplémentaires orientent à nouveau vers un déterminisme antigénique associé à la forme d'acide sialique porté par les gangliosides. Dans cette étude, les glycolipides des membranes érythrocytaires de chats typés ont été examinés par chromatographie sur couche mince et immuno-marquage à l'aide d'anticorps monoclonaux anti-NeuAc et anti-NeuGc, et de sérum félin groupé. Les résultats ont confirmé que le NeuGc, sous la forme du ganglioside ( $[\text{NeuGc}]_2\text{G}_{\text{D3}}$ ), est le déterminant antigénique majeur du groupe A. Les érythrocytes des chats A peuvent aussi contenir une faible quantité d'autres disialogangliosides : le  $[\text{NeuAc}]_2\text{G}_{\text{D3}}$ , le NeuAc-NeuGc- $\text{G}_{\text{D3}}$ , le  $[\text{NeuGc}]_2$ -disialylparagloboside et le [NeuAc-NeuGc]-disialylparagloboside. Le NeuAc est le déterminant unique du groupe B et est retrouvé principalement sous forme de  $[\text{NeuAc}]_2\text{G}_{\text{D3}}$ . Les érythrocytes des chats AB possèdent le  $[\text{NeuGc}]_2\text{G}_{\text{D3}}$ , le  $[\text{NeuAc}]_2\text{G}_{\text{D3}}$ , et [NeuAc-NeuGc]- $\text{G}_{\text{D3}}$ ; ils expriment moins de  $[\text{NeuGc}]_2\text{G}_{\text{D3}}$  que les érythrocytes A et moins de  $[\text{NeuAc}]_2\text{G}_{\text{D3}}$  que les érythrocytes B, pris séparément.<sup>160</sup> Par la suite, l'utilisation de la cytométrie en flux et de la chromatographie sur couche mince haute performance a permis de confirmer l'ensemble de ces résultats.<sup>161, 162</sup>

En résumé, l'antigène A est donc déterminé par le NeuGc et l'antigène B par le NeuAc. Les érythrocytes A peuvent exprimer en faible quantité le NeuAc. Les érythrocytes AB portent les deux formes d'acide sialique.

### 3.1.2. Cytidine monophospho-acide- N-acétylneuraminique hydroxylase

La connaissance de la nature biochimique des antigènes A et B a conduit rapidement à l'étude de l'enzyme cytidine monophospho-acide N-acétylneuraminique hydroxylase (CMAH) qui joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression de NeuGc en convertissant le NeuAc en NeuGc par hydroxylation du résidu N-acétyl.<sup>163</sup>

L'étude génomique de l'enzyme CMAH féline a montré qu'elle était codée par une séquence de 1734 nucléotides répartis en 15 exons, située sur le chromosome B2, qui conduit à une protéine de 578 acides aminés.<sup>117, 164</sup> La CMAH est une enzyme fortement conservée entre espèces. En effet, la CMAH féline possède une structure génomique similaire aux CMAH canine, murine et humaine; avec, respectivement,

91,7 %, 83,7 % et 84,5 % de similitude dans les séquences du gène codant, et 92,9 %, 89,6 % et 87,7 % de similitude dans les séquences d'acides aminés.<sup>117</sup>

Le NeuGc est exprimé chez presque tous les mammifères, mais n'est pas détecté chez l'humain, chez qui il est même extrêmement immunogène. Cette absence de NeuGc est expliquée par un défaut dans l'activité enzymatique de la CMAH suite à une délétion de 92 paires de bases dans l'exon 6 de sa séquence codante.<sup>165</sup> Il a donc été suspecté que, à l'instar de la CMAH de l'humain, une ou plusieurs mutations dans le gène codant pour la CMAH féline réduirai(en)t la fonction de la CMAH et préviendrait(en)t la conversion de NeuAc en NeuGc à la surface des globules rouges, ce qui conduirait aux groupes sanguins AB et B.<sup>117</sup>

Il est à noter que l'entièreté de la séquence du gène de la CMAH féline peut être trouvée sur NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100750220>).

### **3.2. Bases génétiques du système AB**

Dans cette partie, le terme phénotype fera référence au groupe sanguin d'un individu.

#### *3.2.1. Découverte du polymorphisme du gène de la CMAH*

En 2007, l'analyse des séquences génomiques de la CMAH a été menée chez huit chats de groupes sanguins différents. Cette analyse a permis d'identifier plusieurs mutations dont deux mutations en amont du codon de démarrage (-217G>A et -371C>T), un indel de 18 paires de bases en position 53 ( $\Delta$ -53) dans la région non codante 5' UTR (*Untranslated Region*) de l'exon 1, et trois mutations faux sens dans la région codante (exon 2 : 139G>A, exon 3 : 265T>A et exon 13 : 1600G>A). Ces six mutations formaient des haplotypes (combinaison de polymorphismes sur le même brin d'ADN qui ont tendance à être hérités ensemble) concordant avec les phénotypes A et B (tableau 12).<sup>117</sup>

Tableau 12. – Mutations caractérisant les haplotypes A et B

Région du gène	Position de la mutation	Haplotype du phénotype A	Haplotype du phénotype B
5' UTR	217	A	G
	371	C	T
	53	Indel non présent	Indel présent
Exon 2	142	G	A
Exon 3	268	T	A
Exon 13	1603	G	A

Toutes les mutations sont présentées avec les abréviations des nucléotides (A = adénine, C = cytosine, G = guanine, T = thymidine) – la numérotation des mutations est présentée avec la mise à jour de 2016.

Les chats de phénotype B étaient homozygotes (*bb*) pour les six mutations tandis que les chats de phénotype A ne présentaient pas les mutations (homozygote *AA*) ou étaient hétérozygotes et porteurs de l'allèle *b* (*Ab*). Les chats de phénotype AB n'étaient jamais homozygotes pour les six mutations; ils étaient homozygotes (*AA*) ou hétérozygotes (*Ab*), exactement comme les chats de phénotype A. Le phénotype AB ne pouvait donc pas être différencié génotypiquement du phénotype A selon les résultats de cette étude. Les analyses d'ADN complémentaires laissaient suspecter que les mutations identifiées pouvaient conduire à une altération de la structure et de la fonction de la CMAH.<sup>117</sup> Il est important de noter que, dans cette étude de 2007, la numérotation originale des nucléotides de la région codante était mal-alignée de trois paires de bases. Les positions des différentes mutations présentées ci-dessus ont donc été mises à jour à partir de 2016. Par exemple, la mutation originale 139G>A est en réalité en position 142 (142G>A).<sup>164, 166</sup>

### 3.2.2. Identification de nouvelles mutations

Par la suite, d'autres mutations dans le gène de la CMAH ont été identifiées. Par exemple, la mutation 327A>C a été identifiée chez les chats de phénotype B.<sup>166</sup> Une autre étude a identifié 19 mutations, dont quatre jamais rapportées auparavant, réparties dans tous les exons du gène de la CMAH, exceptés les exons 1a, 5, 6, 7, 8 et 15.<sup>164</sup> Parmi ces quatre nouvelles mutations, la mutation 179G>T a été associée à l'allèle *b*, notamment chez l'Angora Turc et le Turc de Van.<sup>167</sup> Un total de 13 nouvelles mutations ont été découvertes en 2018 dont la mutation 1322delT associée au groupe B chez les Ragdolls.<sup>167</sup>

En 2016, une étude d'association pangénomique menée chez 37 chats de race Ragdoll (22 chats de phénotype AB et 15 chats contrôle de phénotype A ou B) a permis de détecter la mutation 364C>T dans l'exon 4 du gène de la CMAH chez les Ragdolls AB. Cette mutation entraîne une substitution de l'acide aminé proline en sérine très probablement à l'origine d'une diminution de l'activité de la CMAH. Suite à une analyse génomique menée chez 280 chats de groupe sanguin connu, la mutation 364C>T a été retrouvée chez 89 des 115 chats AB et a été fortement associée au phénotype AB chez les Ragdolls.<sup>166</sup> Cette mutation 364C>T a également été trouvée chez d'autres races comme le Bengal, le Maine Coon, le Scottish Fold et le British Shorthair.<sup>168</sup> Cette mutation n'a par contre pas été identifiée chez des Devon Rex de phénotype AB, laissant supposer l'existence d'autres mutations à l'origine de ce phénotype.<sup>166</sup>

Au fur et à mesure de la découverte de nouvelles mutations, la meilleure association de mutations a été recherchée afin d'offrir un test génétique capable de prédire avec précision le phénotype des chats.

### 3.2.3. Tests génétiques

Plusieurs laboratoires proposent un test génétique basé sur la recherche des mutations 142G>A (ancien 139G>A) et  $\Delta$ -53 à l'origine de l'allèle *b*. Ces tests sont réalisés à partir d'un écouvillon de salive par : Genomia Genetic Laboratory (République Tchèque), VetoGene (Milan), Langford Veterinary Services (Royaume-Uni), et Veterinary Genetics Laboratory (Davis, USA).

Dans une étude de 2014, ce test de génotypage associé à une autre PCR ciblant une mutation rare située dans l'exon 2 (136C>T qui devient 139C>T à partir de 2016) a été réalisé chez 112 chats de phénotype connu. Les résultats du génotypage étaient en accord avec le phénotype chez 96 % des chats. Cinq chats de phénotype B présentaient un génotype discordant (soit *Ab* soit *AA*). Si la mutation 136C>T n'avait pas été incluse dans le génotypage, cinq chats supplémentaires auraient été incorrectement génotypés dont quatre chats de génotype *bb* qui auraient été génotypés *Ab* et donc classés en phénotype A ou AB. Les principales limites de ce test génétique étaient les erreurs de génotypages secondaires à l'existence de mutations non identifiées et non testées, et, bien sûr, l'impossibilité de différencier un phénotype A d'un phénotype AB.<sup>122</sup>

Suite à la découverte de nombreuses autres mutations dans le gène de la CMAH, une étude de 2018 a utilisé le logiciel PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) afin d'identifier les mutations ayant un réel impact sur la fonction enzymatique de la CMAH et ainsi mieux cibler les mutations à tester. Cette étude a trouvé que la mutation 142G>A, précédemment utilisée pour le test génétique, conduisait en réalité à un changement neutre sur la fonction enzymatique de la CMAH et ne pouvait donc pas être associée spécifiquement à l'allèle *b*. Par contre les trois mutations 179G>T, 268T>A et 1322delT semblaient être

principalement à l'origine du défaut de l'activité de la CMAH et étaient associées à l'allèle *b* chez les chats domestiques et de race.<sup>167</sup>

En utilisant ce panel 179G>T, 268T>A, 1322delT associé à la mutation 364C>T rapportée chez les chats AB, une corrélation presque parfaite génotype-phénotype a été trouvée chez 421 chats (99 %) et 37 chats (100 %).<sup>167, 168</sup> L'intérêt de ce nouveau panel de mutations comparativement à l'ancien panel comprenant les mutations 142G>A et  $\Delta$ -53 a été étudié chez 2145 chats de 31 races différentes. En utilisant l'ancien panel de mutations, 105 chats (5 %) ne pouvaient être assignés à un phénotype alors que tous les chats étaient attribués à un phénotype avec le nouveau panel. Le nouveau panel (179G>T, 268T>A, 364C>T et 1322delT) est donc supérieur à l'ancien panel (142G>A et  $\Delta$ -53) car il permet la détection des génotypes  $a^{ab}/a^{ab}$ ,  $a^{ab}/b$  et  $b/b$  liés aux mutations homozygotes 179G>T et 1322delT, ou aux mutations hétérozygotes 268T>A (tableau 13).<sup>168</sup> Ce panel est disponible via le laboratoire Laboklin (Allemagne).

Tableau 13. – **Combinaison de génotypes et de phénotypes prédits en fonction des mutations identifiées par le nouveau panel de PCR**

Génotype	c.179G>T	c.268T>A	c.364C>T	c.1322delT	Phénotype
<i>A/A</i>	GG	TT	CC	TT	A
<i>A/b</i>	GG	TA	CC	TT	
	GT	TT	CC	TT	
	GG	TT	CC	T*	
<i>A/a<sup>ab</sup></i>	GG	TT	CT	TT	AB
<i>a<sup>ab</sup>/b</i>	GG	TA	CT	TT	
	GG	TT	CT	T*	
	GT	TT	CT	TT	
<i>a<sup>ab</sup>/a<sup>ab</sup></i>	GG	TT	TT	TT	B
<i>b/b</i>	GG	AA	CC	TT	
	TT	TT	CC	TT	
	GG	TT	CC	**	
	GT	TA	CC	TT	
	GG	TA	CC	T*	

\* : un allèle avec une délétion; \*\* : deux allèles avec une délétion

Bien que les tests génétiques ne puissent pas remplacer les tests immuno-hématologiques en pratique courante, le nouveau panel de génotypage représente une étape supplémentaire pour s'assurer de la compatibilité sanguine; et également un outil pour les éleveurs souhaitant identifier les chats porteurs de l'allèle *b*. Ces tests génétiques pourraient aussi être utilisés chez les chats montrant des résultats incohérents aux tests de groupage immuno-hématologiques. Il est à noter que de nouvelles mutations pourraient encore être découvertes dans d'autres races et d'autres régions géographiques.

### 3.3. Résumé des caractéristiques biologiques du système AB

Le tableau 14 résume les points importants à retenir sur les particularités biologiques des antigènes des groupes sanguins du système AB.

Tableau 14. – Résumé des caractéristiques biologiques du système AB du chat

Phénotype	A	B	AB
Génotype	<i>A/A</i> <i>A/b</i> <i>A/a<sup>ab</sup></i>	<i>b/b</i>	<i>a<sup>ab</sup>/a<sup>ab</sup></i> <i>a<sup>ab</sup>/b</i>
Activité CMAH	++	-	+
Motifs antigéniques	NeuGc 	NeuAc 	NeuGc NeuAc 

## 4. Allo-anticorps naturels dans le système AB

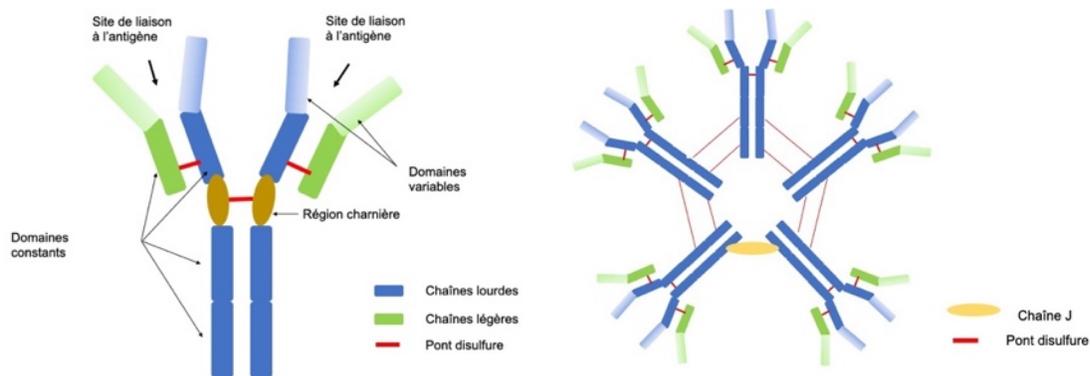
### 4.1. Rappel sur les anticorps

#### 4.1.1. Structure des anticorps

Les anticorps sont des glycoprotéines de la superfamille des immunoglobulines produites par les plasmocytes et sécrétées dans le plasma/sérum. Chaque anticorps est composé d'une structure de base comportant quatre chaînes polypeptidiques : deux chaînes lourdes et deux chaînes légères, qui sont reliées entre elles par des ponts disulfures. Chaque chaîne légère est constituée d'un domaine constant et d'un domaine variable. Les chaînes lourdes sont constituées d'un domaine variable et de trois à quatre domaines constants. Pour un anticorps donné, les deux chaînes lourdes sont identiques, de même que les deux chaînes légères. Cette organisation protéique particulière est à l'origine de la structure de base en

forme de « Y » (monomère) des anticorps. Les domaines constants ne sont pas impliqués dans la liaison à l'antigène mais ils participent, par exemple, à l'activation du système du complément et à l'élimination des complexes immuns en se fixant aux récepteurs aux fragments constants (Fc) des macrophages. L'association du domaine variable de la chaîne lourde et du domaine variable de la chaîne légère constitue le site de liaison à un antigène. Les séquences et l'organisation spatiale des domaines variables sont responsables de la spécificité d'un anticorps pour un épitope sur un antigène donné.<sup>108</sup>

Chez le chat, il existe quatre classes différentes d'anticorps, qui diffèrent selon la structure des domaines constants de leurs chaînes lourdes. Les anticorps d'importance clinique en médecine transfusionnelle sont les IgG et les IgM.<sup>108, 169</sup> (figure 9) Les IgG représentent entre 70 et 80 % des anticorps circulants. Les IgM représentent la deuxième classe d'anticorps la plus abondante dans le sérum/plasma. La classe et les propriétés des anticorps déterminent leurs effets sur la réponse immunitaire.



**Figure 9 - Structure d'une IgG et d'une IgM**

*À gauche : structure d'une IgG en monomère; à droite : structure d'une IgM en pentamère avec une chaîne lourde à quatre domaines constants*

#### *4.1.2. Notion d'allo-anticorps naturels*

Les allo-anticorps sont des anticorps produits chez un individu et dirigés contre un antigène qu'il ne possède pas mais qui est exprimé par des individus de la même espèce.<sup>170</sup>

Les allo-anticorps naturels se développent sans aucune sensibilisation préalable par une transfusion. Leur formation s'explique vraisemblablement par l'exposition à des épitopes présents dans l'environnement et de structure similaire à celle des antigènes érythrocytaires. L'exposition à ces épitopes conduit à la formation d'anticorps uniquement chez les individus qui ne possèdent pas l'antigène de structure similaire. Ces épitopes pourraient provenir d'antigènes de nature végétale, bactérienne ou parasitaire. Par exemple, chez l'humain, des antigènes bactériens de la flore intestinale seraient responsables de la

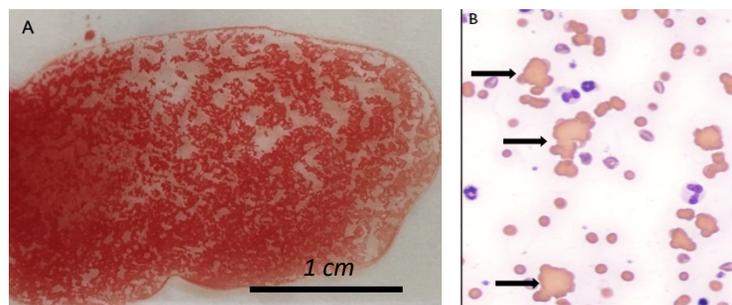
synthèse des allo-anticorps naturels dirigés contre les antigènes du système A/B/ABO. Chez le chat, l'origine de ces épitopes n'a pas été déterminée.<sup>108, 170</sup>

#### 4.2. Réactions anticorps-antigènes érythrocytaires

La combinaison anticorps-antigènes peut conduire à différentes réactions. En médecine transfusionnelle, les réactions les plus fréquemment observées sont l'agglutination et l'hémolyse.<sup>169</sup>

##### 4.2.1. Agglutination

Une agglutination reflète l'agrégation des globules rouges sous l'action d'allo-anticorps, appelés « agglutinines », reconnaissant des antigènes érythrocytaires. L'agglutination est une réaction chimique réversible qui se produit en deux étapes : 1) la fixation des anticorps aux antigènes érythrocytaires, 2) la formation de ponts entre les érythrocytes recouverts d'anticorps pour former un réseau d'érythrocytes (figure 10).<sup>108, 171</sup>



**Figure 10- Exemples de réaction d'agglutination chez le chien**

(A) Agglutination macroscopique; (B) agglutination microscopique visible au microscope (x 500) avec coloration de Wright-Giemsa; © eClinPath Cornell University College of Veterinary Medicine (pour la figure 10B)

L'apparition d'une agglutination est influencée par le type de liaisons anticorps-antigène et par des conditions physiques telles que la température, le pH, la concentration relative anticorps-antigène, et la force ionique du milieu réactionnel. Ainsi, les IgG peuvent former uniquement des ponts de courte longueur (15 à 25 nm) entre les cellules. Elles ne peuvent donc pas contrer les forces de répulsion entre érythrocytes et n'entraînent spontanément pas ou peu d'agglutination. Les IgG ont principalement un pouvoir revêtant. Au contraire, les IgM forment des ponts plus grands (30 à 50 nm) et réussissent à agglutiner les érythrocytes malgré les forces de répulsion.<sup>108, 171</sup> De plus, certains anticorps, appelés « agglutinines chaudes », vont réagir à température corporelle (37°C), tandis que d'autres, appelés « agglutinines froides », conduisent à des réactions d'agglutination uniquement à des températures

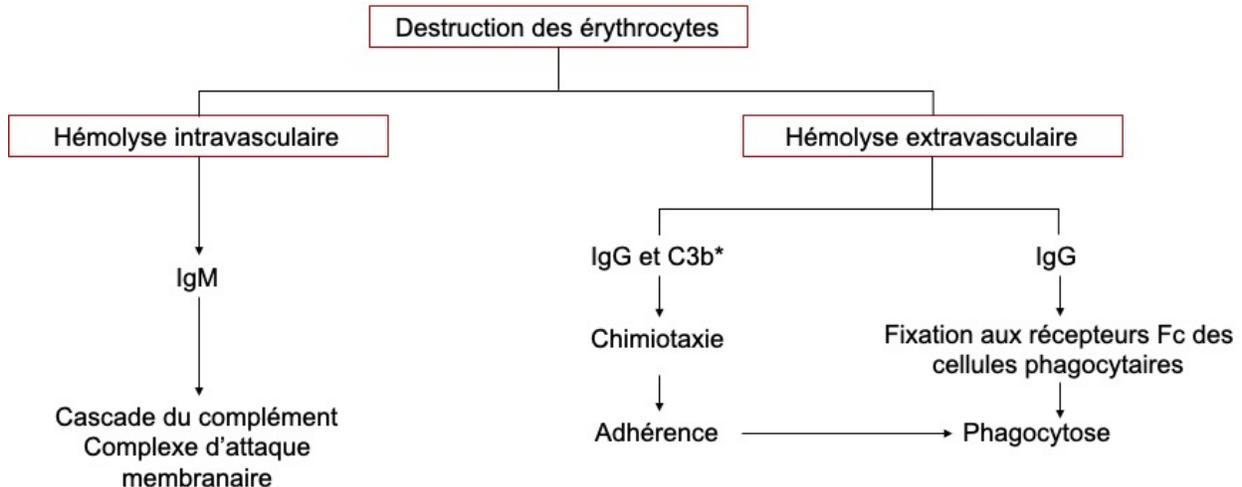
inférieures à 25°C. Les agglutinines froides sont souvent considérées d'importance clinique négligeable.<sup>169,</sup>

171

#### 4.2.2. Hémolyse

Une hémolyse résulte de la fixation d'anticorps, appelées « hémolysines », à la surface des globules rouges, entraînant leur destruction prématurée par un mécanisme d'hypersensibilité de type II. La sévérité et l'apparition des réactions hémolytiques dépendent du type d'anticorps impliqués, de la température à laquelle les anticorps se fixent à l'antigène et leur capacité à activer le complément.

La destruction a lieu soit dans la circulation (hémolyse intravasculaire), soit en dehors de la circulation (hémolyse extravasculaire). L'hémolyse intravasculaire se produit lorsque le système du complément est activé et forme un complexe d'attaque membranaire. L'intégrité de la membrane érythrocytaire est alors interrompue et l'hémoglobine est libérée dans le plasma. L'activation du système du complément est médiée principalement par les IgM. Lors d'une hémolyse extravasculaire, les érythrocytes recouverts d'IgG, seules ou en association avec le fragment C3b du complément, sont phagocytés par les cellules qui possèdent des récepteurs au fragment Fc des IgG (figure 11). La phagocytose a habituellement lieu dans la rate et le foie, et est médiée par des neutrophiles et des macrophages.<sup>108, 169, 171, 172</sup>



**Figure 11 - Résumé des mécanismes d'hémolyse intravasculaire et extravasculaire**

*\* Grâce au pouvoir chimiotactique du fragment C3b, la destruction extravasculaire est augmentée lorsque des IgG et le C3b sont présents ensemble à la surface des globules rouges*

#### 4.2.3. Étude *in vitro*

Les réactions entre allo-anticorps et allo-antigènes peuvent être utilisées *in vitro* dans les tests immuno-hématologiques (voir partie 5 et 6) ou pour mieux caractériser les allo-anticorps en déterminant leur titre et la classe d'immunoglobuline.

Le titre d'anticorps est défini comme la plus grande dilution de sérum ou de plasma à laquelle une réaction positive (i.e., une agglutination ou une hémolyse) est observée. Il est déterminé à la suite de dilutions en série par un facteur de deux du sérum ou du plasma à tester qui est ensuite mis au contact des globules rouges exprimant l'antigène correspondant.<sup>173, 174</sup>

La classe d'immunoglobuline peut être identifiée en traitant le plasma ou le sérum avec du 2-mercaptoéthanol et du dithiothreitol. Ces composés sulfhydrés abolissent l'activité des IgM en brisant leurs ponts disulfures. L'observation et la quantification des réactions d'agglutination ou d'hémolyse avant et après traitement avec des composés sulfhydrés permet de confirmer ou d'infirmer la présence et l'implication des IgM dans ces réactions. Une immuno-précipitation à l'aide d'anticorps anti-IgG et anti-IgM peut également être utilisée pour déterminer la classe des immunoglobulines.<sup>173</sup>

### 4.3. Caractérisation des allo-anticorps naturels dans le système AB

Le chat possède des allo-anticorps naturels dirigés contre les antigènes érythrocytaires qu'ils ne possèdent pas. Autrement dit, les chats de groupe A ont naturellement des allo-anticorps anti-B et les chats de groupe B ont naturellement des allo-anticorps anti-A. Les chats AB ne possèdent pas d'allo-anticorps naturels anti-A ou anti-B.

#### 4.3.1. Allo-anticorps des chats de groupe B

En 1981, la présence d'agglutinines et d'hémolysines a été mise en évidence chez 96 % chats de groupe B.<sup>114</sup> Par la suite, il a été démontré que tous les chats de groupe B sans exception possèdent des allo-anticorps anti-A. Les chats B ont des titres en anticorps souvent supérieurs à 1 : 8 et qui peuvent varier entre 1 : 2 et 1 : 1600 en fonction des études. La distribution du titre en anticorps anti-A au sein d'un échantillon de chats apparaît habituellement gaussienne avec un pic variable entre 1 : 16 et 1 : 64 (figure 12A).<sup>139, 148, 173, 174</sup>

Les anticorps anti-A des chats de groupe B sont principalement des IgM ayant une activité agglutinante et hémolysante forte. La présence d'IgG ayant une faible activité agglutinante a également été rapportée.<sup>173,</sup>

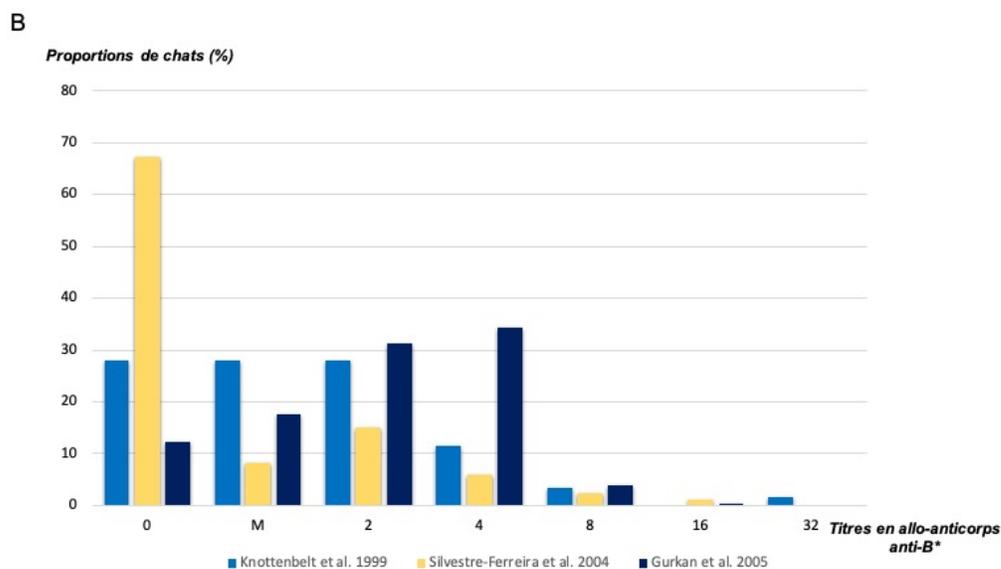
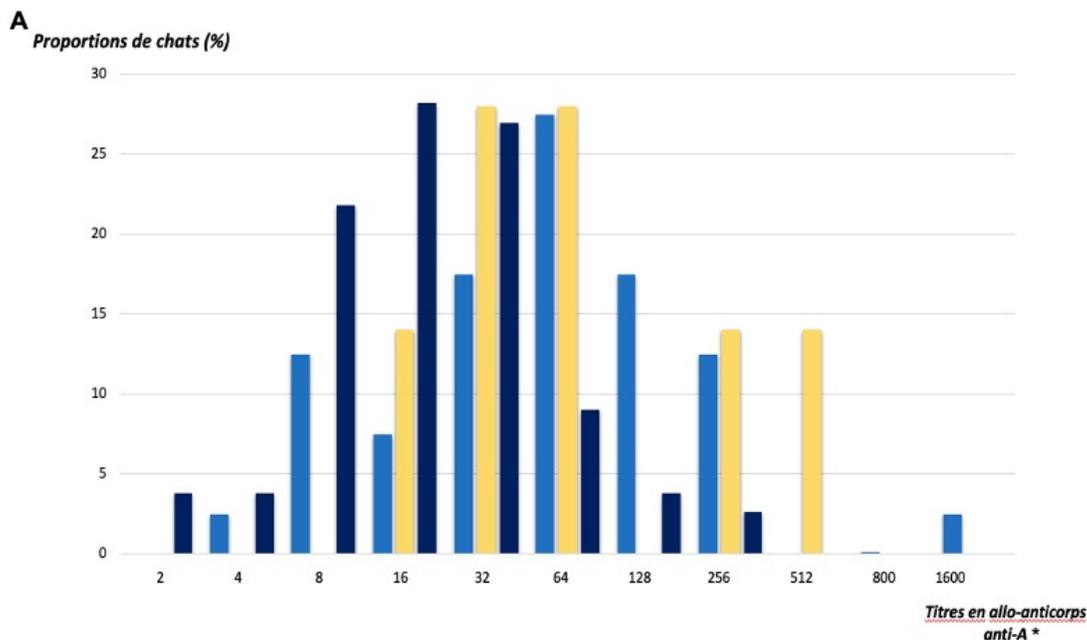
<sup>175</sup>

Les chatons de type B nés de mères de type A ou de type B ne présentent pas d'anticorps anti-A à la naissance. Si la mère est de type B, l'ingestion de colostrum entraîne une augmentation progressive des titres en anticorps maternels anti-A, anticorps qui ont une demi-vie d'environ huit jours et dont le titre diminue ensuite progressivement. Entre 6 et 8 semaines d'âge, tous les chatons de type B vont produire leurs propres allo-anticorps anti-A. Le titre en anticorps devient maximal vers l'âge de 12 semaines.<sup>173</sup>

#### *4.3.2. Allo-anticorps des chats de groupe A*

Les allo-anticorps anti-B ne semblent pas être présents chez tous les individus de groupe A. Dès 1981, une prévalence de 35 % d'individus A porteurs d'allo-anticorps anti-B est rapportée avec un titre rarement supérieur à 2.<sup>114</sup> En 1993, une étude rapporte la présence d'anticorps anti-B conduisant à une réaction macroscopiquement visible chez 38 % des chats de groupe A et une agglutination microscopique observée chez tous les chats.<sup>173</sup> Depuis, d'autres études ont décrit un pourcentage variable de chats de groupe A (30 à 76 %) ne présentant aucune agglutination macroscopique ou microscopique, et donc aucun allo-anticorps anti-B détectable. Lorsque présents, les anticorps ont des titres habituellement faibles et inférieurs à 1 : 16 (figure 12 B).<sup>139, 148, 173, 174</sup> Il est important de noter que les protocoles de recherche de ces études ne permettent pas de confirmer que les anticorps détectés sont réellement des anticorps anti-B pour tous les individus. Il est possible que certaines réactions soient liées à la présence d'anticorps dirigés contre des antigènes érythrocytaires extérieurs au système AB.

Les anticorps anti-B des chats de groupe A sont des IgG et des IgM, avec une plus forte proportion d'IgG. Elles possèdent une activité faible hémolysante et agglutinante.<sup>173</sup> Les titres en anticorps anti-B détectés chez les chatons de type A sont faibles (1 : 2 à l'âge de 12 semaines) et semblent se développer plus tardivement que les anticorps anti-A des chatons de type B.<sup>114</sup> Aucun anticorps anti-A n'a été détecté dans le plasma de chatons de type A nés de mères de type B et ne recevant pas de colostrum.



**Figure 12 - Distribution des chats en fonction de leur titre en anticorps naturels**

*A : distribution des chats de groupe B selon le titre en anticorps anti-A; B : distribution des chats de groupe A selon le titre en anticorps anti-B; d'après<sup>148, 173, 174</sup>*

*\* Les échelles des deux graphiques ne sont pas identiques*

*M : agglutination uniquement microscopique*

#### 4.3.3. Résumé

Les variations observées au sein d'un même groupe peuvent être liées à l'influence de différents facteurs, comme une variabilité géographique et des différences dans les populations étudiées. Il ne semble pas

exister de corrélation entre le titre en allo-anticorps et la race ou le sexe.<sup>174</sup> Des fluctuations saisonnières du titre en allo-anticorps pour un même individu ont été rapportées mais sans qu'une cinétique précise ait pu être établie.<sup>110</sup> L'influence de l'âge ou de maladies sur le titre en allo-anticorps n'a pas été explorée.

Le tableau suivant (tableau 15) résume les caractéristiques des allo-anticorps naturels félines dans le système AB.

Tableau 15. – **Résumé des caractéristiques des allo-anticorps dans le système AB**

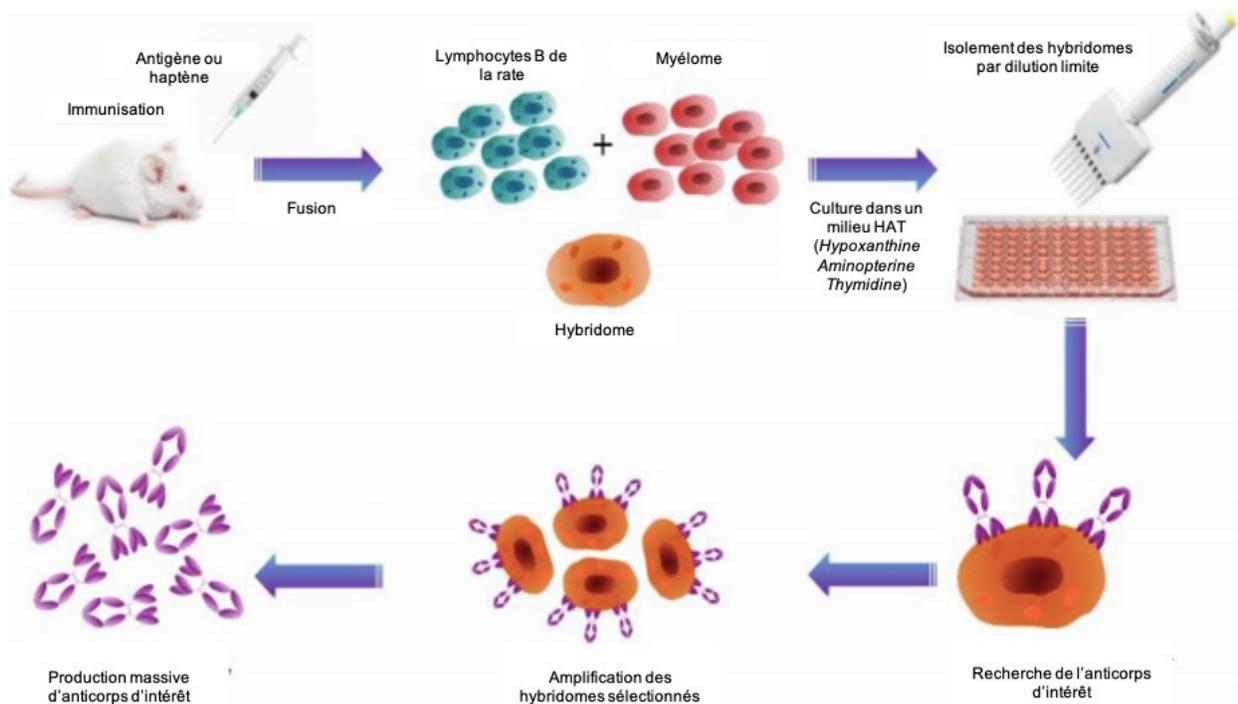
Groupe sanguin	A	B	AB
Pourcentage de chats avec des allo-anticorps (%)	24 – 70	100	0
Allo-anticorps	Anti-B	Anti-A	-
Titres en allo-anticorps	Faible (< 1 :16)	Élevé (> 1 :8)	0
Classe principale des allo-anticorps	IgG	IgM	-

#### 4.4. Anticorps polyclonaux versus monoclonaux

Les allo-anticorps naturels sont des anticorps polyclonaux, c'est-à-dire un mélange d'anticorps reconnaissant différents épitopes sur un antigène donné et produits par des plasmocytes différents. Ces allo-anticorps naturels peuvent être utilisés comme réactifs pour des tests immuno-hématologiques et notamment le typage sanguin. Les inconvénients des anticorps naturels polyclonaux sont qu'ils peuvent avoir des concentrations variables, une affinité différente pour différents épitopes et, parfois, peuvent contenir d'autres anticorps d'une spécificité non souhaitée. L'hétérogénéité des allo-anticorps polyclonaux en fait des réactifs imparfaits pour les tests d'immunohématologie. Par exemple, le sérum de chats de groupe A est difficilement utilisable comme réactif anti-B car tous les chats A n'ont pas d'anticorps anti-B et leurs titres en anticorps sont souvent faibles. De plus, la disponibilité de tels réactifs peut être limitée puisqu'ils correspondent à du sérum/plasma prélevés chez des individus possédant des allo-anticorps.<sup>171</sup>

Au contraire, les anticorps monoclonaux (MoAbs- *monoclonal antibodies*) sont des anticorps ne reconnaissant qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné. Ils sont tous identiques et produits par un seul clone de plasmocytes.<sup>176</sup> Les MoAbs sont produits en laboratoire à partir de cellules hybrides résultant de la fusion entre des lymphocytes B, généralement murins, et un myélome de la même espèce. Chaque

clone cellulaire hybride, une fois isolé, produit le même anticorps monoclonal. Les différentes étapes de la production de MoAbs sont présentées dans la figure 13.<sup>177, 178</sup>



**Figure 13- Étape de production des anticorps monoclonaux**

*d'après<sup>178</sup>; © 2017 Saeed, Wang, Ling and Wang*

Des MoAbs dirigés contre les antigènes érythrocytaires A et B du chat ont été produits pour la première fois en 2000, afin de remplacer les réactifs constitués d'allo-anticorps naturels. Pour cela, les lipides de la membrane érythrocytaire de chats de groupe sanguin connu ont été extraits grâce à un mélange de chloroforme et méthanol, puis le  $[\text{NeuGc}]_2\text{G}_{\text{D}3}$  et le  $[\text{NeuAc}]_2\text{G}_{\text{D}3}$  ont été isolés par chromatographie sur couche mince. Les deux gangliosides ont ensuite été injectés à une souris sous forme de liposome afin de produire des MoAbs (voir la figure 14 pour les étapes de production).<sup>179</sup>

La production de MoAb pour les tests sérologiques est une étape importante en médecine transfusionnelle. Le premier avantage d'une suspension de MoAbs est sa forte concentration en immunoglobulines uniformément réactives, hautement spécifiques et très bien caractérisées qui conduit à des réactions constantes et homogènes. Son second avantage non négligeable est la capacité de stocker des quantités massives de MoAbs et ainsi d'assurer une pérennité du typage sanguin, en s'affranchissant de la nécessité d'avoir un chat comme source de réactifs polyclonaux. Bien qu'étant majoritairement un avantage, la haute spécificité des MoAbs peut parfois représenter un inconvénient. En effet, un anticorps

qui réagit de manière forte et spécifique contre un unique épitope d'un antigène multivalent peut ne pas réagir contre les cellules qui expriment une configuration différente du même antigène.<sup>171</sup> Cette limite est illustrée par les MoAbs anti-A, produits en 2000 pour le chat, qui reconnaissaient l'antigène A sur tous les érythrocytes des chats de groupe A mais pas sur tous les érythrocytes des chats de groupe AB.<sup>179</sup>

## **5. Méthodes de détermination des groupes sanguins du système AB**

### **5.1. Principe général**

Le typage sanguin repose sur l'identification de la présence d'antigènes A et/ou B à la surface des globules rouges par agglutination avec des anticorps ou des lectines (réactifs).

Initialement, du sérum contenant de hauts titres d'allo-anticorps polyclonaux anti-A, naturels ou acquis suite à une sensibilisation de chats A avec du sang de chat B, était utilisé comme réactif anti-A.<sup>114, 133, 160</sup> Les titres en allo-anticorps étant suffisamment élevés pour conduire à des agglutinations macroscopiques; ces réactifs polyclonaux peuvent toujours être utilisés dans certains tests de typage. Depuis la première étude rapportant le succès de leur production, des MoAbs murins anti-A ont été produits par plusieurs laboratoires et ont remplacé les anticorps polyclonaux dans la plupart des tests de typage.<sup>179</sup>

Des allo-anticorps polyclonaux naturels étaient utilisés originellement comme réactif anti-B. Les titres peu élevés en anticorps anti-B entraînaient des réactions macroscopiquement faibles voire visibles uniquement au microscope.<sup>114, 133, 160</sup> Ces allo-anticorps polyclonaux anti-B ont ensuite été remplacés par la lectine de *Triticum vulgare* qui agglutine spécifiquement les érythrocytes félines de groupe B en se liant au NeuAc.<sup>158</sup> Récemment, des MoAbs anti-B ont également été produits et sont utilisés dans différents tests de typage.

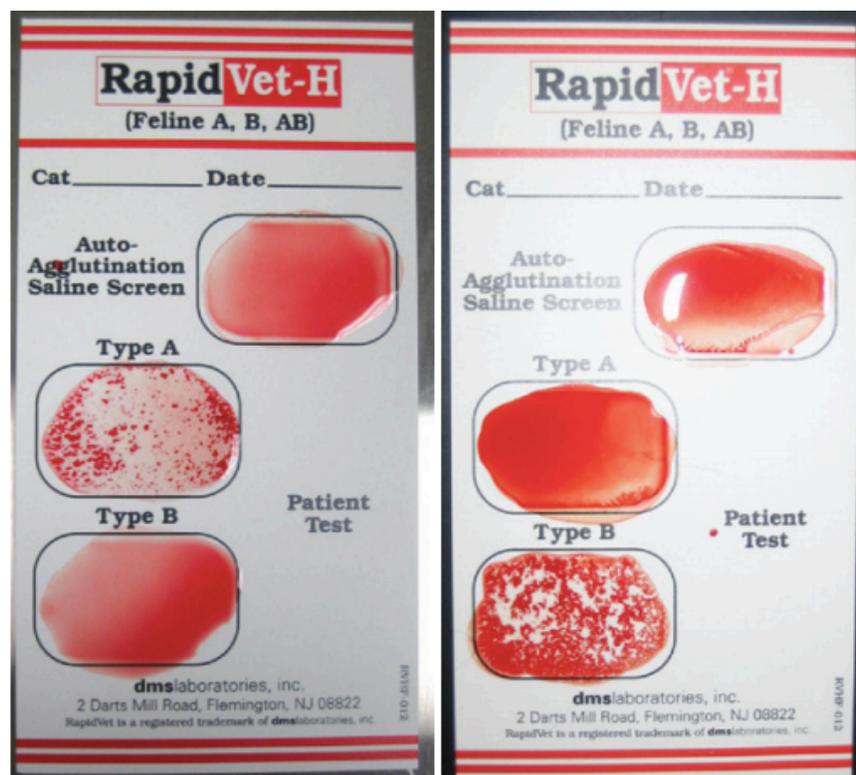
Les méthodes de typage sanguin sont variées et incluent des tests rapides réalisés au chevet du patient et des tests réalisés en laboratoire.

### **5.2. Méthodes de typage sanguin au chevet du patient**

#### *5.2.1. Cartes d'agglutination*

Elles sont proposées par les laboratoires DMS (RapidVet®-H, DMS Flemington, New-Jersey) et permettent l'observation directe de la réaction d'agglutination. Les premières cartes ont été commercialisées en 1995 et contenaient des anticorps polyclonaux comme réactif anti-A et de la lectine de *Triticum vulgare* comme réactif anti-B. En 2002, le format des cartes a été modifié et des MoAbs murins anti-A lyophilisés ont remplacé les anticorps polyclonaux anti-A.<sup>180</sup>

Les cartes actuelles sont divisées en trois zones distinctes: une première zone contrôle ne contenant aucun réactif, une deuxième zone imprégnée de MoAbs anti-A lyophilisés, et une troisième zone imprégnée de lectine anti-B lyophilisée (figure 15). Concernant la technique, une goutte de solution saline tamponnée (PBS) est déposée dans la zone contrôle avec une goutte de l'échantillon du sang anti-coagulé à tester. Les deux gouttes sont ensuite mélangées. Si de l'agglutination est observée, les globules rouges doivent être lavés trois fois avant de recommencer le test. Lorsque le contrôle est négatif (aucune auto-agglutination), une à deux gouttes de PBS sont déposées dans la zone B et dans la zone A, respectivement; suivi par une goutte de sang dans chaque zone. Si l'antigène est présent (i.e., le patient est positif pour le groupe sanguin testé), une agglutination des globules rouges sera visible sur la carte (figure 14). L'agglutination peut être gradée selon différentes échelles en fonction des auteurs : 0 : pas d'agglutination ; 1+ : plusieurs petits agglutinats OU petits agglutinats observés après 30 secondes; 2+ : quelques larges agglutinats et nombreux petits agglutinats OU petits agglutinats observés après 15 secondes; 3+ : quelques larges agglutinats dans une suspension claire OU larges agglutinats observés après 10 secondes; 4+ : un seul large agglutinat dans une suspension claire OU larges agglutinats observés après 5 secondes.<sup>181</sup>



**Figure 14 - Typage sanguin avec des cartes d'agglutination RapidVet®-H**  
*Chat de groupe A à gauche; chat de groupe B à droite. Les contrôles négatifs (auto-agglutination saline screen) autorisent l'interprétation du test; d'après<sup>41</sup>; © Sage Publications, avec permission.*

Les cartes ont été comparées à différentes méthodes de typage dans plusieurs études.<sup>120, 142, 154, 180, 181</sup> Elles identifient avec précision les antigènes A et B chez les chats sains de groupe A ou B, avec des réactions habituellement fortes (2+ à 3+). Les antigènes A et B ont par contre été mal-identifiés chez certains chats de groupe AB. Des réactions absentes à faibles dans la zone contenant le réactif anti-A ont conduit à une mauvaise classification des chats AB comme étant de groupe B.<sup>142, 152, 181</sup> Plus rarement, des chats de type A ont été classés comme type B ou AB avec les cartes.<sup>154, 181</sup> Ainsi, bien que les cartes soient raisonnablement précises, elles démontrent une sensibilité faible pour la détection du groupe AB (61 %) et une spécificité inférieure à 95 % pour la détection du groupe B.<sup>142</sup>

### 5.2.2. Immunochromatographie

Les tests d'immunochromatographie sont fondés sur la détection des réactions d'agglutination grâce à l'hémoglobine contenu dans les globules rouges. Les globules rouges dilués dans une solution tampon vont migrer par capillarité et se fixer sur les anticorps monoclonaux anti-A et anti-B incorporés sur un papier de chromatographie. L'hémoglobine va créer une ligne rouge sombre à l'endroit où les globules rouges se sont fixés, indiquant un résultat positif. Deux sociétés proposent actuellement des tests par immunochromatographie : Alvedia (Limonest, France) et le Laboratoire DMS (RapidVet®-H IC). Le test d'Alvedia se compose d'une bandelette de papier de chromatographie imprégnée en trois niveaux distincts avec des MoAb anti-A, des MoAb anti-B et une lectine de contrôle. Le sang anti-coagulé du receveur est mélangé avec trois gouttes d'une solution tampon. La bandelette d'immunochromatographie est placée au contact du mélange pendant environ 2 minutes jusqu'à ce que la suspension des globules rouges diffuse tout le long de la bandelette. La bandelette est ensuite placée dans un portant pour faciliter l'interprétation du résultat (figure 15).

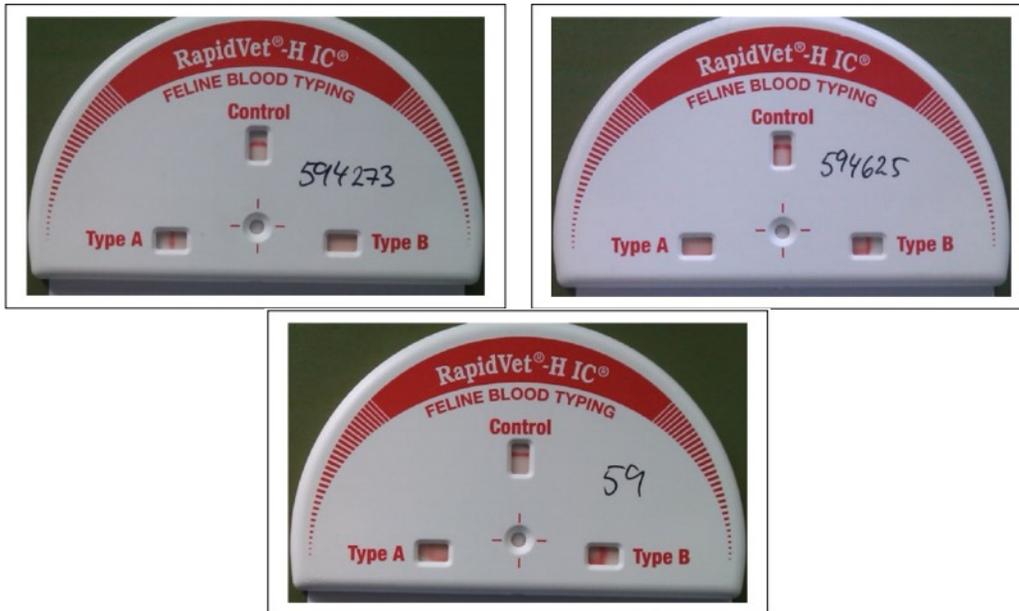


**Figure 15- Typage sanguin par IC avec le QuickTEST A+B (Alvedia)**

*Exemple d'un chat de groupe A, indiqué par la présence d'une ligne rouge dans l'espace « A » (tête de flèche noire) et une absence de ligne dans l'espace « B » (tête de flèche ouverte). Une ligne rouge solide doit être visualisée dans l'espace contrôle (noté « C ») pour que le test soit valide.*

Le RapidVet®-H IC se présente sous la forme d'un demi-cercle avec trois fenêtres et un puit. Une goutte de l'échantillon de sang est mélangée avec un diluant, puis trois gouttes du mélange sont déposées dans

le puit, associées à trois gouttes d'une solution tampon. Le mélange peut alors migrer sur trois bandelettes de chromatographie distinctes disposées en T inversé, la première contenant des MoAbs anti-A, la deuxième des MoAbs anti-B et la dernière contenant une « substance », probablement une lectine, qui se lie à tous les globules rouges (contrôle). Le résultat peut être interprété en 5 à 10 minutes (figure 16).



**Figure 16 - Typage sanguin par IC avec le RapidVet-H IC®**

*Exemple d'un chat de groupe A (en haut à gauche), d'un chat de groupe B (en haut à droite) et d'un chat de groupe AB (en bas au milieu), indiqué par la présence d'une ligne rouge dans les fenêtres A ou B. Une ligne rouge doit être visualisée dans l'espace contrôle pour que le test soit valide; d'après<sup>183</sup>; © Sage Publications, avec permission*

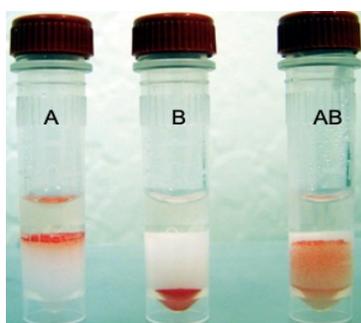
Dans plusieurs études, les tests d'immunochromatographie du laboratoire Alvedia montraient une meilleure précision pour le typage sanguin que les cartes d'agglutination. En fonction des études, la sensibilité et la spécificité de ces tests variaient de 97,7 à 100 % pour la détection de l'antigène A, et de 95,7 % à 100 % pour la détection de l'antigène B. Certaines erreurs de typage (type A en type AB, et type AB en type A ou B) étaient décrites.<sup>181, 182</sup> Les résultats obtenus paraissent répétables et reproductibles en utilisant différents types d'échantillons de sang : sang avec EDTA, sang avec CPDA-1, échantillons stockés jusqu'à 1 mois à température ambiante ou réfrigérés. De plus l'hémolyse de l'échantillon ou la présence d'une auto-agglutination ne semblent pas affecter les résultats.<sup>182</sup>

Le RapidVet®-H IC a montré un pourcentage d'accord de 96,1 % avec une technique en tube et une technique en gel chez 105 chats. Une sensibilité de 100 % pour la détection des antigènes A et B était rapportée. La spécificité était de 100 % pour la détection de l'antigène A et de 95 % pour la détection de

l'antigène B. Ainsi, quatre chats de type A étaient mal-classifiés en type AB et un chat AB avait un résultat de typage ininterprétable avec le test d'immunochromatographie.<sup>183</sup>

### 5.2.3. Tube de gel

Une technique sur tube de gel RapidVet®-H GEL est disponible auprès du laboratoire DMS. Les tubes utilisés contiennent un gel de composition inconnue et imprégné d'anticorps ayant un degré de réactivité différent pour les antigènes des groupes A, B et AB. Un échantillon de 50 µL de sang anti-coagulé et dilué est placé dans un tube pour le typage et dans un tube de contrôle positif. Les tubes sont ensuite centrifugés. Ce test nécessite une centrifugeuse avec un rotor à angle fixe pour permettre une bonne interprétation des résultats. Le contrôle doit être positif, c'est-à-dire les globules rouges retenus à la surface du gel, pour autoriser l'interprétation du test. Trois résultats distincts sont obtenus basés sur le degré d'agglutination (figure 17). Une précision globale de 98,5 % est rapportée par le laboratoire (tableau 16). Aucune étude externe au laboratoire n'a comparé cette technique aux autres techniques de typage.



**Figure 17- Interprétation du RapidVet®-H GEL**  
©DMS Laboratories, [www.rapidvet.com](http://www.rapidvet.com)

Tableau 16. – **Caractéristiques du test RapidVet®-H GEL**

Caractéristique du test	Type A	Type B	Type AB
Sensibilité	98,0	100,0	94,8
Spécificité	97,4	100,0	98,7
Précision	97,7	100,0	97,7

©DMS Laboratories, [www.rapidvet.com](http://www.rapidvet.com)

Les mêmes précautions s'appliquent pour l'interprétation des tests par carte, immunochromatographie ou tube de gel. Un résultat non concluant ou difficilement interprétable doit absolument mener à un deuxième test. Les contrôles doivent être adéquats (positifs pour les tests d'immunochromatographie et

la technique en tube, négatifs pour les cartes). Lorsque le typage doit être réalisé dans des conditions non urgentes, comme le recrutement de futur donneur ou le typage de chatte reproductrice, des tests en laboratoire sont recommandés.<sup>142, 181-183</sup>

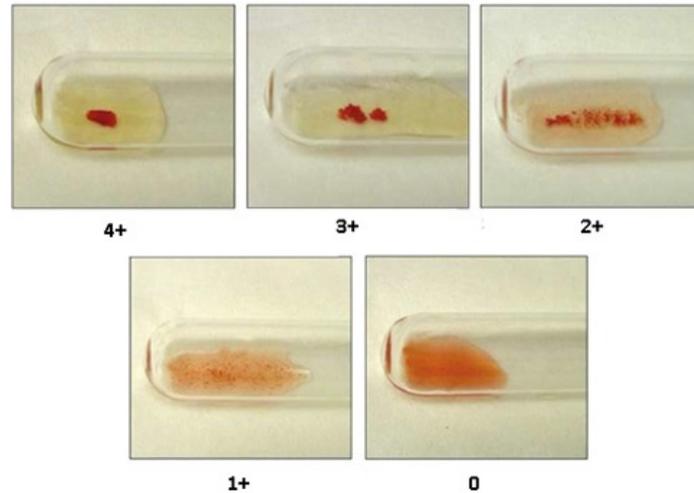
### **5.3. Méthodes de typage sanguin en laboratoire**

#### *5.3.1. Méthode en tube ou sur lame*

La méthode en tube est encore considérée aujourd'hui comme le « gold standard » des méthodes de typage. La méthode sur lame est très similaire. Ces méthodes utilisent habituellement du sérum d'un chat de groupe B, qui peut être chauffé (56°C pendant 30 minutes) pour inactiver le complément, comme réactif anti-A. La lectine de *Triticum vulgare* diluée (64 µg/mL pour la technique sur lame et 8 µg/mL pour la technique en tube) est utilisée comme réactif anti-B. Un test sur tube utilisant des MoAb anti-A et anti-B a été commercialisé dans les années 2000 par l'entreprise Shigeta Animal Pharmaceuticals (Oyabe City, Japan), mais il n'est plus disponible actuellement.<sup>180, 181, 183</sup>

Pour la méthode sur lame, 50 µL de réactif anti-A sont placés sur une lame, 50 µL de réactif anti-B sur une deuxième lame et une solution PBS sur une troisième lame (auto-contrôle). Ensuite 25 µL de sang entier anti-coagulé du chat à tester sont ajoutés sur chaque lame. Les lames sont agitées pendant deux minutes et le degré d'agglutination est estimé avec la même échelle que celle utilisée pour les cartes d'agglutination. Une évaluation microscopique est conseillée afin d'apprécier la présence de rouleaux ou d'une agglutination non visible macroscopiquement.<sup>180, 181</sup>

Pour la méthode en tube, 25 µL d'une suspension de 2 à 5 % des globules rouges du chat à tester sont mélangés dans trois tubes différents avec 50 µL du réactif anti-A, 50 µL de la lectine anti-B diluée à 8 µg/L et 50 µL de PBS (contrôle). Le mélange est laissé à incuber pendant 15 minutes à température ambiante puis les tubes sont centrifugés pendant 15 secondes. Les tubes sont ensuite agités doucement pour mettre en suspension les globules rouges non agglutinés. La même échelle que celle des cartes est utilisée pour évaluer l'agglutination (figure 18). Lorsqu'aucune agglutination n'est détectée macroscopiquement, une évaluation microscopique des globules rouges re-suspendus est conseillée.<sup>180, 181, 183</sup>



**Figure 18 - Échelle d'évaluation de l'agglutination pour la technique en tube**  
*4+ : un seul large agglutinat dans une suspension claire; 3+ : quelques larges agglutinats dans une suspension claire; 2+ : quelques larges agglutinats et nombreux petits agglutinats; 1+ : plusieurs petits agglutinats; 0 : pas d'agglutination ; ©PennVet, University of Pennsylvania*

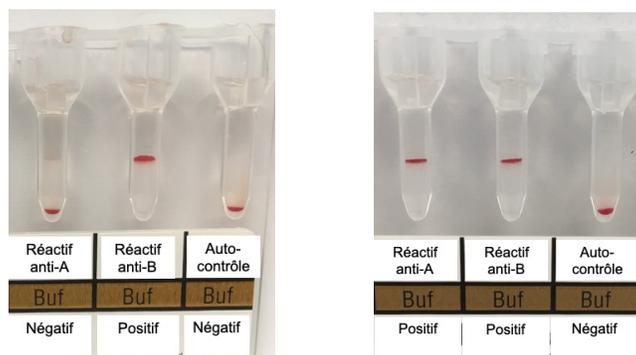
Les inconvénients de ces techniques sont, d'une part qu'elles nécessitent une certaine expertise, qu'elles manquent de standardisation et que l'appréciation du degré d'agglutination peut être subjectif, surtout lors d'agglutination faible. D'autre part, chez le chat, la formation de rouleaux secondaire à des conditions comme l'hyperglobulinémie, une inflammation ou la lipémie peuvent entraîner des résultats faussement positifs (confusion avec des agrégats) ou faussement négatifs (petits agrégats masqués par les rouleaux).<sup>180, 181, 183</sup>

### 5.3.2. Technique sur colonne de gel

Une technique sur colonne de gel était commercialisée par le laboratoire Diamed (Vet ID Card A+B GEL<sup>®</sup> test, Diamed, Cressier sur Morat, Suisse). Cette technique de typage présentait un accord presque parfait (> 99 %) avec la technique en tube et avait l'avantage d'identifier précisément le groupe AB comparativement aux tests utilisés au chevet du patient. Le ID Card A+B Gel<sup>®</sup> test ne sera pas détaillé ici, car il n'est actuellement plus commercialisé.<sup>142, 181</sup>

Bien que le test du laboratoire Diamed ne soit plus disponible, il reste possible d'utiliser une technique sur colonne de gel pour le typage sanguin des chats. Pour cela des plaques de six micro-colonnes de gel non imprégné de réactif disponibles en médecine humaine peuvent être utilisées. Une suspension de 0,8 % des globules rouges du chat à tester est incubée dans trois colonnes séparées avec du réactif anti-A (sérum de chat de type B), du réactif anti-B (lectine de *Triticum Vulgaris* dilué à 8 µg/L) et son propre sérum/plasma (contrôle). La technique est exactement la même que pour un test de compatibilité et sera

présentée plus en détails dans le paragraphe 6. Cette technique présente l'avantage d'être rapide, sensible et de mener à des résultats facilement interprétables (figure 19). Au contraire des réactions obtenues avec la technique en tube, les réactions de la technique sur colonne de gel sont stables, peuvent être interprétées jusqu'à 72 heures après la réalisation du test, et peuvent aussi être facilement photographiées pour une interprétation par un tiers (figure 19).



**Figure 19 - Résultats d'un test de typage avec colonne de gel**  
*Les résultats peuvent être interprétés car les autocontrôles sont négatifs. Les globules restent pris au sommet ou dans la colonne de gel lorsqu'une réaction d'agglutination est présente (i.e., typage positif); chat de type B à gauche; chat de type AB à droite*

### 5.3.3. La cytométrie en flux

La cytométrie en flux a été rarement utilisée pour le typage sanguin en médecine vétérinaire.<sup>116, 184-187</sup> Des études en médecine humaine et une étude chez le chien ont montré une meilleure précision du typage par cytométrie en flux (99,1 % à 100 %) comparativement à la méthode standard en tube (93 à 95 %).<sup>185, 188</sup> Une étude en médecine humaine a également démontré une meilleure précision de la cytométrie en flux par rapport à la technique sur colonne de gel.<sup>189</sup> La cytométrie en flux semble ainsi capable de détecter des quantités d'antigènes érythrocytaires trop faibles pour conduire à une agglutination avec la technique en tube ou en gel. Une étude récente rapporte l'utilisation de la cytométrie en flux pour le typage sanguin chez 49 chats et la compare à une technique d'immunochromatographie. Concernant la méthode, une solution de globules rouges lavés à 10 % était incubée avec un MoAb anti-A ou un MoAb anti-B pendant 30 minutes à 37°C. Les MoAb anti-A et anti-B étaient les mêmes que ceux utilisés dans le test d'immunochromatographie. Ensuite, un anticorps anti-MoAb murin marqués par de l'isothiocyanate de fluorescéine était ajouté au culot de globules rouges. La suspension était de nouveau incubée pendant 30 minutes à 37°C puis lavée avec du PBS avant l'analyse cytométrique. Une moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) était calculée. La surface des érythrocytes était considérée comme négative pour l'expression de l'antigène testé si la MFI était inférieure à 10. Au contraire, une MFI supérieure ou égale à

10 indiquait la présence de l'antigène testé à la surface érythrocytaire. Les résultats montraient une concordance parfaite entre la cytométrie en flux et l'immunochromatographie.<sup>190</sup>

#### **5.4. Erreur de classification et « back typing »**

##### *5.4.1. Les erreurs de typage*

Des discordances et erreurs de typages sont décrites chez le chat avec différentes techniques de typage, et sont souvent associées au groupe AB. Outre des erreurs liées au manque de précision de certains tests, comme les cartes de typage, une mauvaise classification est également décrite dans certaines conditions pathologiques. Par exemple, des chats de type A ont été mal classifiés en type AB dans des cas d'anémie hémolytique à médiation immunitaire, lors de statut positif au FeLV, lors d'inflammation sévère, ou encore lors d'anémie secondaire à une infestation par des puces.<sup>181, 191</sup> Un typage AB transitoire a également été décrit chez un chaton de type B ayant démontré une réaction hémolytique transfusionnelle suite à une transfusion réalisée sans typage sanguin ni test de compatibilité préalables.<sup>192</sup>

Une mauvaise classification de chat A en AB n'a pas de conséquence sérieuse, car les chats AB sont habituellement transfusés avec du sang de type A. Dans la situation très improbable d'avoir un donneur de type AB et que le chat receveur de type A possède des anticorps anti-B, la réaction anti-B ne serait pas sévère. Une mauvaise classification d'un chat B en AB peut par contre conduire à des réactions plus intenses si du sang de type A ou AB lui est transfusé, car ses anticorps anti-A peuvent détruire les globules rouges A ou AB du donneur. De même, une mauvaise classification de chats AB en B peut avoir des conséquences si du sang entier d'un donneur B est transfusé, car les anticorps anti-A contenu dans le plasma du donneur B pourraient attaquer les globules rouges du receveur AB. Ainsi, les typages AB doivent être confirmés. De même, un typage B chez un chat d'une race pour laquelle le groupe B est peu fréquent devrait conduire à une contre-vérification. Idéalement une des méthodes de laboratoire décrites ci-dessus ou un test de génotypage sont recommandés pour confirmer le résultat. La méthode du « back-typing » peut également être utilisée pour obtenir une confirmation rapide.

##### *5.4.2. « Back-typing »*

Cette technique permet de confirmer rapidement les résultats obtenus lors du typage en mettant en évidence la présence d'allo-anticorps naturels dans le sérum/plasma des chats. Cette technique utilise le principe que les chats de type A ont de faibles allo-anticorps naturels anti-B, les chats de type B ont de forts allo-anticorps naturels anti-A, et les chats de type AB ne possèdent pas d'allo-anticorps naturels. Pour réaliser le test, du sérum/plasma du chat à tester est mis au contact de globules rouges d'un groupe connu. Une technique sur lame ou en tube peut être utilisée. Une réaction d'agglutination intense est observée

lorsque le sérum/plasma de chats de groupe B est mis au contact de globules rouges de groupe A. Aucune réaction ou une faible agglutination sont observées lorsque le sérum/plasma de chats de groupe A est mis au contact avec des globules rouges de groupe B. Aucune agglutination n'est observée lorsque le sérum/plasma de chats AB est mis au contact de globules rouges A ou B. La limite principale de cette méthode repose sur le fait qu'elle ne permet pas de distinguer un chat de groupe A sans allo-anticorps naturels d'un chat de groupe AB. D'autre part, cette technique ne prend pas en compte l'existence possible d'autres allo-anticorps naturels n'appartenant pas au système AB ou d'allo-anticorps acquis secondairement à une transfusion qui pourraient gêner l'interprétation des résultats.<sup>142, 155, 180, 182, 192</sup>

## **6. Tests de compatibilité : cross-match**

Les cross-matches sont des méthodes sérologiques *in vitro* utilisées pour détecter des incompatibilités entre un donneur et un receveur. À la différence du typage sanguin qui détermine la présence d'un allo-antigène connu, le cross-match détermine s'il y a une réaction anticorps-antigène sans identifier quel anticorps réagit avec quel antigène. Ils sont recommandés avant une première transfusion chez le chat du fait de la présence d'antigènes érythrocytaires en dehors du système AB associés à des anticorps naturels. Ils sont également nécessaires chez un chat ayant un antécédent transfusionnel de plus de 4 jours, considérant le risque d'allo-immunisation.

### **6.1. Principe général des cross-matches majeur et mineur**

#### *6.1.1. Échantillons nécessaires*

Les cross-matches nécessitent l'utilisation de globules rouges lavés pour retirer tout auto-anticorps non reliés à la surface des globules rouges. Du sérum ou du plasma peuvent être utilisés sans préférence. Des recommandations publiées par l'ASVCP (*American Society for Veterinary Clinical Pathology*) en 2012 conseillent, si possible, l'utilisation d'échantillon de moins de 24 heures chez les mammifères.<sup>193</sup> Cependant, en médecine humaine et en médecine des petits animaux, les cross-matches sont souvent réalisés en utilisant du sang du donneur stocké au réfrigérateur dans des segments gardés avec l'unité à transfuser. Ces segments peuvent être stockés jusqu'à 42 jours en médecine humaine, et jusqu'à 35 jours pour les chiens et les chats. Il est difficile de caractériser l'effet de l'âge de l'échantillon sur les résultats des cross-matches car peu d'études s'y intéressent. Une étude en médecine humaine a démontré que des suspensions de globules rouges 3 à 5 % conservées jusqu'à 10 jours au réfrigérateur pouvaient être utilisées.<sup>194</sup> En médecine équine, l'utilisation d'échantillons de sang réfrigérés pendant 1 mois avait plus de risque de conduire à des incompatibilités artéfactuelles.<sup>195</sup> Chez le chat, une étude a montré l'absence d'association entre l'âge des échantillons de sang (plus ou moins 10 jours) et le nombre ou le degré

d'incompatibilité, mais cette étude n'était pas conçue spécifiquement pour évaluer l'effet du stockage sur les résultats de cross-match.<sup>19</sup>

### 6.1.2. Cross-match majeur et mineur

Dans le cross-match majeur, les globules rouges du donneur sont mélangés au plasma/sérum du receveur afin d'évaluer la présence d'anticorps chez le receveur qui pourrait se lier aux globules rouges du donneur et entraîner une hémolyse ou une agglutination. Le cross-match mineur mélange le plasma/sérum du donneur avec les globules rouges lavés du receveur pour détecter des anticorps chez le donneur qui se fixeraient à des antigènes sur les globules rouges du receveur. Il est à considérer pour les chats qui reçoivent du sang entier.<sup>169, 196</sup> Pour les deux cross-matches, des autocontrôles sont nécessaires pour pouvoir interpréter les résultats. Lors de l'autocontrôle, les globules rouges lavés du receveur sont mis au contact de son propre plasma/sérum afin d'identifier une possible auto-agglutination qui gênerait l'interprétation des tests de compatibilité. L'objectif des cross-matches est d'éviter une réaction transfusionnelle à médiation immunitaire. Un cross-match majeur incompatible est une contre-indication à la transfusion car les globules rouges du donneur sont à risques d'être détruits par le système immunitaire du receveur. Un cross-match mineur incompatible est une contre-indication relative car les réactions occasionnées sont souvent moins graves grâce à la dilution des anticorps du donneur dans le sang du receveur. Idéalement les deux cross-matches devraient être compatibles pour limiter le risque de réactions transfusionnelles. Cependant, il est important de comprendre les limites des cross-matches. Bien qu'ils permettent de détecter la présence d'allo-anticorps entraînant une agglutination *in vitro*, ils ne peuvent pas déterminer si ces anticorps ont une importance clinique *in vivo*. De plus, même avec un cross-match compatible, une survie appropriée des globules rouges ou une absence complète de réaction transfusionnelle ne sont pas garanties. Des réactions transfusionnelles retardées peuvent se produire secondairement à la production d'anticorps après transfusion de l'allo-antigène correspondant, ou encore si des anticorps étaient présents avant la transfusion en trop faible quantité pour être détectés par les techniques de cross-match.<sup>196</sup>

Des méthodes de laboratoire sur lame, en tube, en microplaques de titration, sur colonne de gel existent. Des kits commerciaux de tubes de gel et de chromatographie sont également disponibles pour être utilisés au chevet du patient.

### 6.2. Différentes techniques de cross-match

Les techniques sur lame et sur tube ont déjà été discutées dans la partie du typage sanguin et leurs méthodes restent identiques pour les tests de compatibilité, en remplaçant les réactifs anti-A et anti-B par

le sérum du receveur pour le cross-match majeur, et le sérum du donneur pour le cross-match mineur. À noter, qu'une technique sur lame utilisant des globules rouges non dilués est également décrite pour mieux différencier une agglutination macroscopique de rouleaux.

### 6.2.1. Micro-titration

La technique de cross-match sur plaque de micro-titrage est plus rarement décrite mais a été utilisée chez le chat dans une étude. Pour cette technique le plasma/sérum non dilué est incubé à 37°C avec une suspension de 2,5 % de globules rouges lavés, dans trois puits d'une plaque de micro-titrage. Lorsqu'une réaction d'agglutination se produit, les globules rouges se dispersent au-dessus de la base du puit. Lorsqu'aucune agglutination n'est présente, un « bouton » se forme à la base du puit.<sup>122</sup>

### 6.2.2. Colonne de gel neutre

La technique sur colonne de gel a été développée à la fin des années 1980 dans l'optique d'obtenir une réaction d'agglutination plus stable et reproductible comparée à la technique en tube.<sup>197</sup> Cette technique utilise une carte de six micro-colonnes contenant un gel neutre de dextran-acrylamide sans réactif. De telles cartes sont disponibles par les laboratoires Ortho Clinical Diagnostics et DiaMed.<sup>198</sup>

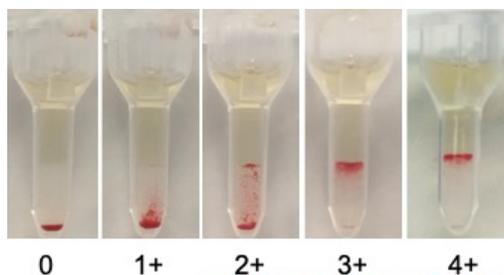
Cinquante microlitres d'une suspension de 0,8 % de globules rouges lavés préparée dans une solution LISS (*Low Ionic Strength Saline*) sont placés dans une micro-colonne avec 25 µL de sérum/plasma. La carte est ensuite incubée (15 minutes à 37°C ou 10 minutes à 22°C en fonction des études), puis centrifugée pendant 10 minutes à 80 g (figure 20).<sup>190, 199, 200</sup>



**Figure 20 - Matériel nécessaire pour la technique sur colonne de gel**

*De gauche à droite : la carte contenant les six micro-colonnes de gel, l'incubateur, la centrifugeuse; © Stéphanie Goulet, avec permission*

L'agglutination se produit dans le gel qui agit comme un tamis lors de la centrifugation en laissant passer les globules rouges non agglutinés qui vont former un culot au fond de la colonne, tandis que les globules rouges agglutinés sont piégés dans, ou au-dessus du gel. L'échelle suivante permet d'évaluer le degré d'agglutination (figure 21) :



**Figure 21 - Échelle permettant l'évaluation de l'agglutination sur colonne de gel**  
*0 : culot de globules rouges au fond de la colonne (négatif), 1+ : quelques globules rouges sont agglutinés dans la moitié inférieure du gel avec la majorité des globules rouges dans un culot au fond de la colonne, 2+ : les globules rouges sont dispersés à travers toute la colonne de gel ou majoritairement dans la moitié supérieure, 3+ : les globules rouges sont majoritairement dans la moitié supérieure et certains sont à la surface du gel, 4+ : tous les globules rouges sont retenus à la surface du gel*

Deux études ont montré des résultats de compatibilité globalement comparables entre la technique sur colonne de gel et la technique standard en tube chez un nombre limité de chats (n= 66 et n=10). Un chat présentait par contre une agglutination 4+ avec la technique sur colonne de gel et un test compatible avec la technique en tube; le désaccord semblait être secondaire à la présence de nombreux rouleaux.<sup>19, 199</sup> La technique sur colonnes de gel a l'avantage d'être rapide, très facile d'interprétation et de ne pas demander d'expertise particulière, comme l'ont décrit plusieurs études vétérinaires.<sup>190, 199, 201-204</sup> Son inconvénient principal est lié à l'augmentation des dépenses, car cette technique nécessite du matériel spécialisé.

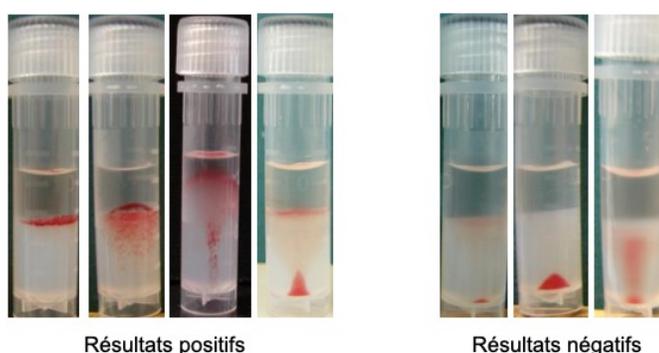
### 6.2.3. Colonne de gel avec anti-globulines

Une technique sur colonne de gel contenant des anti-globulines dirigées contre les anticorps et le complément félin a également été décrite.<sup>190</sup> Les anti-globulines vont se fixer aux IgM, IgG et/ou au fragment C3 du complément fixés à la surface des érythrocytes félins. Les étapes de la réalisation et l'interprétation du cross-match sont similaires à celles de la technique sur colonne de gel neutre. En médecine humaine, des études rapportent une meilleure sensibilité des techniques utilisant du gel avec anti-globulines pour détecter des anticorps fixés à la surface des érythrocytes, comparativement à la méthode standard en tube.<sup>205, 206</sup> Une étude chez le chat a comparé cette technique aux cross-matches sur colonne de gel neutre. Une corrélation forte était rapportée entre les deux techniques avec seulement 4 % de réactions discordantes (sur 446) associées à des incompatibilités uniquement révélées par la technique avec anti-globulines, ce qui supporte une plus grande sensibilité du gel avec anti-globulines chez le chat également.<sup>190</sup> La société Alvedia a commercialisé un kit de cross-match majeur et mineur basée sur

cette technique (Gel Test Major /Minor XM feline) et qui nécessite une centrifugeuse spécifique pour être réalisé en clinique.

#### 6.2.4. Tube de gel

La technique sur tube de gel RapidVet®-H Crossmatch commercialisée par le laboratoire DMS peut être utilisée en clinique pour les chiens et les chats. Cette technique est recommandée en urgence ou lorsque les laboratoires externes ne sont pas accessibles. Les tubes sont pré-remplis avec une matrice de gel de dextran-acrylamide non imprégnée de réactifs. Comme pour la technique de colonne de gel, le gel de dextran-acrylamide sert de tamis lors de la centrifugation. Des tubes de contrôle positif et négatif sont inclus avec le kit pour permettre l'interprétation des résultats (figure 22).



**Figure 22 - Interprétation du RapidVet®-H Crossmatch**  
*Les globules rouges doivent former une ligne au sommet ou dans la moitié supérieure du gel pour que le résultat soit considéré incompatible (résultat positif) et la transfusion non recommandée; [www.rapidvet.com](http://www.rapidvet.com)*

Une étude préliminaire a comparé les résultats de cross-matches obtenus par le RapidVet®-H Crossmatch aux résultats obtenus par la technique standard sur tube, chez le chien. Les résultats indiquaient un accord modéré entre ces deux techniques et une difficulté d'interprétation des résultats pour 50 % des cross-matches obtenus avec le RapidVet®-H.<sup>207</sup> Une étude chez le chat a comparé le RapidVet®-H Crossmatch à une technique en tube (n = 71), et a montré un accord très faible pour les cross-matches majeurs, et faible pour les cross-matches mineurs. Le RapidVet®-H Crossmatch mettait en évidence trois incompatibilités par cross-match majeur contre 26 avec la technique en tube. À la différence de l'étude réalisée chez le chien, aucune difficulté d'interprétation n'était rapportée chez le chat.<sup>208</sup>

#### 6.2.5. Immunochromatographie

Une technique d'immunochromatographie est disponible pour les chats via la société Alvedia (LabTest®XM). Dans cette technique une bande de chromatographie est imprégnée avec deux anticorps

différents à deux niveaux distants d'environ 1 cm : un anticorps qui fixe tous les globules rouges (C pour contrôle) et une anti-globuline anti-IgG, IgM et C3 félins qui fixe uniquement les globules rouges recouverts d'anticorps (marqué « XM »). La présence d'une bande au niveau « XM » représente un résultat incompatible, quelle que soit l'intensité de la bande (figure 23).

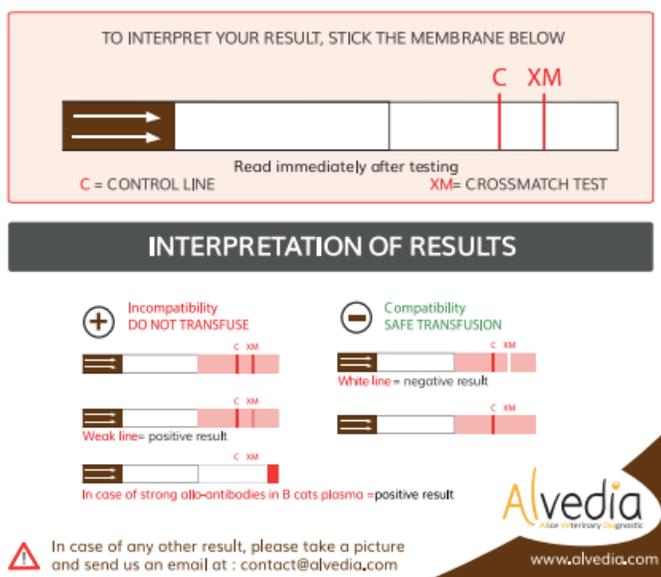


Figure 23 - Notice pour l'interprétation du test LabTest®XM d'Alvedia [www.alvedia.com](http://www.alvedia.com)

À notre connaissance, aucune étude a comparé cette technique de cross-match aux techniques précédemment décrites.

## 7. D'autres systèmes de groupe sanguin

### 7.1. Incompatibilités en dehors du système AB

Bien que le système AB soit le système de groupes sanguins prédominant chez le chat, plusieurs études appuient l'hypothèse de l'existence d'antigènes érythrocytaires extérieurs au système AB. Ces études ont réalisé des tests de compatibilité sur un nombre variable de chats et en utilisant des techniques différentes. Elles ont rapporté entre 0 et 29 % de chats naïfs de transfusion présentant, *in vitro*, des incompatibilités non expliquées par le système AB.<sup>18, 19, 30, 48, 122, 190, 208</sup> Le tableau suivant (tableau 17) résume les résultats de ces différentes études.

Tableau 17. – **Résumé des différentes études sur l'existence d'incompatibilités extérieures au système AB**

Études	Localisation géographique	Nombre de chats avec incompatibilité / nombre total de chats	Nombre de XM incompatibles / nombre total de XM	Méthode de XM
Sylvane <i>et al.</i> <sup>18</sup>	États-Unis	7 / 24	10 / 52	Tube
McClowsky <i>et al.</i> <sup>19</sup>	États-Unis	23 / 154	39 / 462	Tube
Weingart <i>et al.</i> <sup>48</sup>	Allemagne	0 / 20	ND	Tube
Tasker <i>et al.</i> <sup>122</sup>	Angleterre	0 / 112	0 / 112	Plaquette de micro-titration
Humm <i>et al.</i> <sup>208</sup>	Angleterre	26 / 98	26 / 98	Lame
		3 / 71	3 / 71	Tube de gel
Goy-Thollot <i>et al.</i> <sup>190</sup>	France	3 / 30	14 / 630	Colonne de gel avec anti-globulines
		0 / 30	0 / 446	Colonne de gel

*XM = test de compatibilité = cross-match, ND = données non disponibles*

Ces incompatibilités, mises en évidence par différentes techniques et dans différents pays, sont en faveur de l'existence d'allo-antigènes érythrocytaires non identifiés actuellement et indépendants du système AB. Les antigènes érythrocytaires inconnus sont potentiellement associés à des anticorps naturels qui peuvent conduire à des incompatibilités *in vitro* mais également à des réactions transfusionnelles *in vivo*. Ceci appuie la recommandation actuelle de réaliser un test de compatibilité sanguine avant une première transfusion chez un chat.

## 7.2. Découverte de l'antigène Mik

En 2007, une étude décrit la découverte d'un nouvel antigène érythrocytaire félin indépendant du système AB. Dans cette étude, 71 chats dont 66 de type A, trois de type B et deux de type AB, ont fait l'objet de tests de compatibilité sanguine (majeurs et mineurs) sur tubes standards et sur colonnes en gel. La mise en contact du sérum de trois chats donateurs de groupe A (appelés donneur 1 (nommé *Mike*), donneur 2, donneur 3) avec les globules rouges de 25 à 55 chats, de groupe A également, a conduit à des agglutinations. Ces agglutinations traduisaient la présence d'une incompatibilité sanguine entre ces chats pourtant de même groupe sanguin selon le système AB. Des réactions d'agglutination étaient également observées lorsque le sérum des chats donneur 1, 2 et 3 était mis au contact des érythrocytes de chats de groupe B et AB. Le plasma et les érythrocytes des donateurs 1, 2 et 3 étaient par contre compatibles entre

eux. De plus, un quatrième chat, de type A et ayant subi une transplantation rénale, a montré une réaction transfusionnelle hémolytique suite à trois transfusions (avant, pendant et après sa chirurgie de greffe rénale). Des tests de compatibilité ont montré que ce chat possédait déjà des anticorps dans son plasma avant sa première transfusion et qu'il était incompatible avec les trois chats de type A dont il avait reçu les globules rouges. Par contre, il était compatible avec les chats donneurs 1, 2 et 3.

L'ensemble de ces résultats indiquaient que les chats donneurs 1, 2 et 3 et le quatrième chat avec greffe rénale possédaient un allo-anticorps naturel contre un antigène érythrocytaire indépendant du système AB, antigène qu'ils ne possédaient pas eux-mêmes. Cet antigène a été nommé *Mik*, en référence au prénom (Mike) du donneur 1. Ainsi, il existe des chats *Mik* négatifs qui ne possèdent pas l'antigène *Mik* et qui ont des allo-anticorps naturels anti-*Mik*. Ces allo-anticorps semblent être un mélange d'IgG et d'IgM avec des titres variables (entre 1 : 1 et 1 : 64) et peuvent entraîner des réactions transfusionnelles. La majorité des chats sont *Mik* positifs (93 % dans l'étude), c'est-à-dire qu'ils possèdent l'antigène *Mik* et n'ont pas d'allo-anticorps anti-*Mik*.<sup>199</sup>

De nombreuses inconnues persistent sur cet antigène *Mik*, telles que sa nature biochimique, sa distribution géographique, son mode de transmission, son antigénicité, etc. La quantité restreinte d'antisérum anti-*Mik*, voire l'absence actuelle d'antisérum anti-*Mik*, limite la poursuite des investigations. Il n'existe pas de test de typage commercial pour détecter cet antigène.

## **8. Importance clinique des antigènes érythrocytaires et de leurs allo-anticorps**

### **8.1. Isoérythrolyse néonatale**

Les premiers cas d'INF ont été décrits en 1985 en Angleterre.<sup>209</sup> Une étude menée également en Angleterre entre 1986 et 2000 a rapporté que l'INF était la première cause de mortalité des chatons âgés de moins de 1 jour.<sup>210</sup> L'INF fait référence à une réaction hémolytique chez les nouveau-nés secondaire à l'ingestion de colostrum et associée à une incompatibilité entre la mère et ses chatons dans le système AB. Cette affection a également été décrite chez l'humain et les chevaux.<sup>211</sup>

#### *8.1.1. Pathophysiologie*

La placentation dans l'espèce féline est de type endothélio-chorial et autorise le passage d'un très faible pourcentage (entre 0 et 10 %) d'anticorps de la mère au fœtus. La majorité des anticorps maternels est donc obtenue suite à l'ingestion du colostrum.<sup>108, 212-214</sup> Le colostrum des chattes contient principalement

des IgG avec une concentration 5 fois supérieure à leur concentration sérique.<sup>213</sup> Les chatons sont capables d'absorber efficacement ces immunoglobulines contenues dans le colostrum pendant environ 16 heures.<sup>215</sup> Ensuite, la muqueuse intestinale perd sa perméabilité et les immunoglobulines du colostrum ne sont plus absorbées. Les chatons commencent progressivement à produire leurs propres allo-anticorps tandis que le taux d'anticorps maternels diminue en approximativement six à huit semaines.<sup>173</sup>

L'INF affecte les chatons de groupes A ou AB nés d'une mère de groupe B, suite à l'ingestion d'anticorps anti-A contenus dans le colostrum. Les anticorps anti-A de la mère reconnaissent l'antigène A à la surface des érythrocytes des chatons entraînant alors une hémolyse intra ou extravasculaire.<sup>211, 216</sup>

### *8.1.2. Signes cliniques, diagnostic et traitement*

Les signes cliniques de l'INF dépendent de la sévérité de l'hémolyse. Les facteurs déterminant le degré d'hémolyse ne sont pas connus mais les variations importantes dans la présentation clinique au sein d'une même portée suggèrent qu'une absorption différente des anticorps du colostrum serait le facteur principal.<sup>211, 217</sup>

Généralement, les chatons naissent en bonne santé et têtent énergiquement. Des signes cliniques apparaissent dans les quelques heures à quelques jours suivant l'ingestion du colostrum. Certains chatons présentent une forme suraiguë et meurent dans les premières 24 heures suivant la mise-bas.<sup>209</sup> D'autres chatons vont présenter une forme aiguë avec des signes non spécifiques tels que de l'abattement, une diminution ou un arrêt de la tétée et une dégradation de leur état général.<sup>217</sup> Les signes plus spécifiques à une INF sont secondaires à l'hémolyse : hémoglobinurie, muqueuses pâles, ictère. Certains chatons vont présenter une nécrose de la queue qui peut se développer de manière isolée, ou chez les chatons ayant survécu à la forme aiguë. La nécrose de la queue est associée à l'action des « IgM froides » qui vont entraîner, à des températures de 30 à 32°C, une hémagglutination dans les vaisseaux périphériques, la formation de micro-thrombi puis une nécrose ischémique.<sup>216, 218, 219</sup>

Le diagnostic est basé sur les signes cliniques et la confirmation du groupe sanguin de la mère et des chatons. Si un typage sanguin est impossible, un cross-match peut être réalisé entre le sérum de la mère et les globules rouges des chatons. L'autopsie et l'analyse histopathologique peuvent apporter des éléments en faveur d'une INF : ictère, splénomégalie, hémoglobinurie, images d'érythrophagocytose et d'hématopoïèse extra-médullaire dans le foie et la rate, et cylindres d'hémoglobine avec nécrose des tubules rénaux.<sup>209, 217</sup>

Le traitement doit être agressif et mis en place le plus rapidement possible. Les étapes du traitement reposent sur le remplacement de l'immunité passive (colostrum de synthèse, mère adoptive, administration sous-cutanée ou intrapéritonéale de sérum de chat adulte), des transfusions sanguines si besoin (en utilisant le sang de la mère), et des traitements de support (gestion de l'hypoglycémie, de l'hypothermie, de la déshydratation).<sup>213, 214, 220</sup>

La mortalité associée à l'INF étant élevée malgré une prise en charge adaptée, la prévention est indispensable.

### 8.1.3. Prévention

Les portées à risque d'INF sont issues d'un accouplement entre une femelle de groupe B (génotype  $b/b$ ) avec un mâle de groupe A (génotype  $A/A$ ,  $A/b$ ,  $A/a^{ab}$ ). Si le chat mâle est homozygote  $A/A$  ou hétérozygote  $A/a^{ab}$ , tous les chatons peuvent être affectés. Si le mâle est hétérozygote  $A/b$ , la moitié de la portée peut être atteinte. Le risque d'INF dans l'espèce féline varie de 0 à 20 % selon la prévalence de l'allèle  $b$ .<sup>124, 136, 149</sup> Ce risque étant relativement élevé et les conséquences souvent fatales, le typage sanguin des reproducteurs est indispensable, car la meilleure méthode pour prévenir l'INF est d'éviter la reproduction entre des chattes de groupe B et des mâles de groupe A. Si un accouplement entre une chatte B et un mâle A est nécessaire pour des raisons zootechniques, il est possible de séparer les chatons A et AB de leur mère les 16 à 72 premières heures suivant la naissance.<sup>217</sup>

En théorie les chatons de groupe B nés d'une mère de groupe A pourrait être à risque d'INF, mais aucun cas n'a été décrit dans la littérature. Les titres en anticorps anti-B chez les mères de groupe A semblent trop faibles pour conduire à une INF.

## 8.2. Réactions transfusionnelles hémolytiques

Des réactions transfusionnelles, tous types confondus, sont rapportées chez 1,2 à 22,9 % des chats recevant des produits sanguins.<sup>16-18, 30, 32</sup> Ces réactions transfusionnelles sont divisées en réactions immunitaires et réactions non immunitaires. Au sein des réactions immunitaires, une interaction entre un allo-antigène érythrocytaire et son allo-anticorps peut conduire à une réaction hémolytique aiguë ou retardée à l'origine d'une destruction des globules rouges. Les réactions transfusionnelles non hémolytiques à médiation immunitaire et les réactions transfusionnelles non médiées par le système immunitaire ne seront pas présentées dans ce mémoire car elles ne mettent pas en jeu les antigènes érythrocytaires.

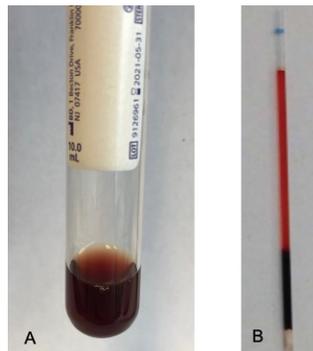
### 8.2.1. Réactions hémolytiques aiguës

Les réactions hémolytiques aiguës se produisent au cours de la transfusion ou dans les 24 premières heures suivant la transfusion. Comme discuté précédemment, les réactions hémolytiques sont des réactions d'hypersensibilité de type II liée à l'activation du système du complément par des IgM reconnaissant des allo-antigènes érythrocytaires et conduisant à une hémolyse intravasculaire. Une hémolyse extravasculaire médiée principalement par des IgG peut également être présente en parallèle, dans le foie et la rate. La sévérité des réactions hémolytiques semble être corrélée au titre en anticorps; par contre le titre minimum permettant d'induire une réaction hémolytique n'a pas été déterminé.<sup>221</sup>

L'hémolyse intravasculaire est la plus dangereuse car elle entraîne une inflammation systémique et peut conduire à une défaillance multi-organique par différents mécanismes :

- Activation de l'hémostase et initiation d'une CIVD,
- Hypotension systémique par libération de substances vasoactives (tels que les fragments C3a, C5a, la bradykinine),
- État de choc
- Insuffisance rénale aiguë secondaire à une nécrose ischémique, une hypoxie, ou une CIVD.

Les signes cliniques varient en sévérité et incluent de la fièvre, des vomissements, une défécation, des vocalises, de la tachypnée, de l'hémoglobinurie, de l'hémoglobinémie (figure 24), une tachycardie, une dyspnée, une hypotension, et d'autres signes compatibles avec un état de choc.<sup>221-223</sup> Les signes cliniques sont souvent moins marqués lors d'hémolyse extravasculaire et s'accompagnent d'une bilirubinémie et bilirubinurie.



**Figure 24 - Urine et sérum d'un chat suite à une réaction transfusionnelle aiguë**  
(A) urines pigmentées par de l'hémoglobine; (B) plasma hémolysé dans un tube à micro-hématocrite; © Alyssa Cannavino, avec permission

Les réactions hémolytiques aiguës nécessitent une prise en charge intensive immédiate. La transfusion doit être arrêtée et les paramètres vitaux mesurés. Une ressuscitation volumique par l'administration de fluides intraveineux, l'administration d'oxygène, l'utilisation de vasopresseurs, voire des manœuvres de réanimation peuvent être nécessaires. L'efficacité de l'administration des glucocorticoïdes n'est pas démontrée. Les mesures mises en place ont pour but de maintenir une pression artérielle au-dessus de 70-80 mmHg et une production d'urine adéquate (1 – 2 mL/kg/heure). Un suivi sérié de l'hématocrite, de l'hémoglobémie et de l'hémoglobinurie sont aussi recommandés. Une surveillance des signes d'insuffisance rénale aiguë et de CIVD doit être mise en place.

#### *8.2.2. Réactions hémolytiques retardées*

Ces réactions apparaissent plus de 24 heures après la transfusion, habituellement dans les 3 à 5 jours suivant une transfusion. Elles sont le résultat principalement d'une hémolyse extravasculaire. Elles peuvent se produire dans deux situations. Lors d'une première transfusion de sang incompatible chez un animal n'ayant pas ou peu d'allo-anticorps naturels, une réponse immunitaire se met en place et se traduit par la production d'anticorps en 7 à 10 jours. Dans le deuxième cas, chez un patient préalablement sensibilisé à un antigène érythrocytaire (allo-immunisation), une seconde exposition au même antigène conduit à l'activation d'une réponse immunitaire anamnésique se traduisant par une augmentation plus rapide et plus intense de la formation d'anticorps.

Dans les deux cas, cette production d'anticorps en réponse à la transfusion peut conduire à une destruction graduelle des globules rouges transfusés. Ainsi, bien qu'il n'y ait aucun signe clinique au cours de la transfusion, les globules rouges transfusés vont avoir une durée de vie plus courte menant à une diminution de l'hématocrite post-transfusionnel et potentiellement à des signes compatibles avec de l'hémolyse (fièvre, anorexie, ictère). Le test de Coombs direct peut également être positif. Les réactions transfusionnelles retardées ne sont habituellement pas mortelles, mais l'intensité de la réponse dépend de la quantité et de la force des anticorps. Elles ne nécessitent pas de traitement spécifique et ne sont pas prévenues par l'administration de glucocorticoïdes.<sup>1, 169</sup>

#### *8.2.3. Réactions hémolytiques chez le chat liées au système AB*

La présence des allo-anticorps naturels anti-A chez les chats de groupe B (pour rappel, principalement des IgM avec un titre élevé) entraîne une réaction hémolytique aiguë sévère si un chat de groupe B reçoit du sang de groupe A. Ces réactions peuvent apparaître en quelques minutes suite à l'administration d'un faible volume de sang.<sup>222</sup> Les globules rouges de type A administrés à un chat B ont ainsi une demi-vie d'environ 1,3 heures et sont tous détruits dans les premières 24 heures suivant la transfusion.<sup>223</sup> Un

pourcentage variable de chats de groupe A ont un titre souvent faible en allo-anticorps naturels anti-B (principalement des IgG). La transfusion d'un chat de groupe A avec du sang de groupe B va donc conduire à l'absence ou à une faible réaction hémolytique. La demi-vie des globules rouges B transfusés à un chat de type A est de 2,1 jours.<sup>221, 223</sup> Pour comparaison, lors de compatibilité dans le système AB ou de transfusion autologue, la demi-vie des globules rouges transfusés varie normalement de 23 à 39 jours.<sup>85, 223, 224</sup>

#### *8.2.4. Conséquences des antigènes érythrocytaires indépendants du système AB*

Plusieurs études se sont intéressées aux potentielles conséquences cliniques des antigènes érythrocytaires indépendants du système AB et de leurs allo-anticorps naturels ou acquis.

L'allo-immunisation correspond au développement d'anticorps suite à une première exposition à un antigène érythrocytaire étranger à l'individu. Comme expliqué dans le paragraphe précédent, suite à une allo-immunisation, un individu est à risque de développer une réaction transfusionnelle lors de tout contact ultérieur avec le même antigène. Une allo-immunisation contre des antigènes érythrocytaires extérieurs au système AB a été observée chez 25 % des chats (sur une population de 20 chats) environ 5 jours après une première transfusion.<sup>48</sup> Dans une deuxième étude, 27 % des 55 chats précédemment transfusés présentaient des incompatibilités en dehors du système AB, sans qu'il soit déterminé s'ils présentaient des incompatibilités avant leur première transfusion. De plus, environ 16 % des chats développaient des incompatibilités après leur première transfusion, alors qu'ils étaient initialement compatibles avec tous les donneurs testés.<sup>19</sup>

Concernant l'efficacité de la transfusion, les données trouvées dans la littérature sont contradictoires. Une étude rétrospective a montré une plus grande augmentation de l'hématocrite par volume de pRBC transfusé chez les chats pour lesquels la compatibilité donneur-receveur avait été vérifiée ( $n = 43, 1.02 \pm 0.51 \text{ \%/mL/kg}$ ), comparativement aux chats transfusés sans test de compatibilité ( $n = 190, 0.74 \pm 0.65 \text{ \%/mL/kg}$ ).<sup>101</sup> Une autre étude présentait des résultats similaires, mais avec un nombre de transfusions avec cross-match préalable trop faible pour atteindre une puissance statistique (103 transfusions avec cross-match sur 450 événements transfusionnels).<sup>17</sup> Au contraire, une étude prospective évaluant les changements dans l'hématocrite par volume de pRBC transfusé à trois temps différents (1 heure, 12 heures et 24 heures post transfusion) n'a pas détecté de différence significative entre des chats transfusés avec cross-matches ( $n = 24$ ), et des chats transfusés sans cross-match ( $n = 24$ ).<sup>18</sup> Une étude rétrospective menée chez 249 chats (167 avec cross-match et 82 sans cross-match) a aussi montré l'absence

d'association entre l'administration de pRBC cross-matchés et l'augmentation de l'hématocrite dans les 24 heures suivant la transfusion.<sup>19</sup>

Concernant les risques de réactions transfusionnelles, les études s'accordent presque toutes à conclure qu'une transfusion de sang typé dans le système AB et cross-matché n'est pas associée statistiquement à un risque moins important de réactions hémolytiques transfusionnelles aiguës cliniquement détectables, qu'une transfusion de sang uniquement typé.<sup>17-19</sup> Une seule étude a rapporté un nombre de réactions transfusionnelles fébriles plus élevé chez les chats transfusés sans cross-match préalable. Cette différence est difficile à expliquer car les réactions fébriles sont normalement associées aux globules blancs et à l'accumulation de cytokines durant le stockage et non à des interactions anticorps-antigène érythrocytaire.<sup>19</sup> Ces études ne se sont pas intéressées au suivi plus de 24 heures après la transfusion et à l'existence de possibles réactions hémolytiques retardées.

Concernant la survie, peu de données sont disponibles et les résultats sont conflictuels. Ainsi, aucune différence dans la survie à 30 jours et 60 jours post-transfusion n'a été rapportée entre des chats avec cross-matches compatibles et des chats sans cross-matches.<sup>19</sup> Au contraire, une augmentation du risque de mortalité a été rapportée chez les chats naïfs de transfusion et non cross-matchés (odds ratio de 3.57, intervalle de confiance [0.81-16.13]) dans une deuxième étude rétrospective.<sup>17</sup>

Les différentes études présentées ci-dessus avaient pour objectif principal d'évaluer la nécessité de réaliser un cross-match pré-transfusion et de décrire la fréquence des incompatibilités en dehors du système AB. Elles ont donc de nombreuses limites concernant l'impact clinique des antigènes érythrocytaires extérieurs au système AB. D'une part, la majorité des études est de nature rétrospective et associée avec des conditions sous-jacente différentes (anémie hémolytique, dialyse, etc.) qui peuvent influencer le succès de la transfusion et la survie. Elles sont également associées à un manque de standardisation dans la surveillance des receveurs qui peut influencer la détection des réactions transfusionnelles. D'autre part, la limite la plus importante est la comparaison de chats transfusés avec des cross-matches compatibles à des chats transfusés sans cross-match. Il n'est ainsi pas possible de conclure que les antigènes érythrocytaires et leurs anticorps n'ont pas d'importance clinique car les chats avec des tests compatibles sont comparés à des chats dont le statut de compatibilité est inconnu. Considérant que la prévalence d'incompatibilité est faible à modérée (de 0 à 29 %) et que les chats sont majoritairement incompatibles contre un seul donneur dans ces différentes études, il est tout à fait envisageable que la majorité des chats dans les groupes sans cross-match ne présentaient pas d'incompatibilité. Le seul moyen de connaître l'impact réel de ces incompatibilités extérieures au système

AB serait de comparer des transfusions de sang avec cross-match compatible à des transfusions de sang avec cross-match incompatible.

Une étude prospective a comparé les événements transfusionnels entre des chats avec cross-match compatible et des chats avec cross-match incompatible. Dans cette étude, des chats naïfs de transfusion étaient transfusés sans connaissance des résultats des cross-matches réalisés sur tube au laboratoire et sur tube de gel au chevet du patient (RapidVet-H, DMS). Il n'y avait pas de différence dans l'augmentation de l'hématocrite par volume de sang transfusé à 12 heures post-transfusion en fonction des résultats du cross-match. La détection des incompatibilités par le kit commercial, mais non par la méthode de laboratoire, semblait associée au développement de réactions hémolytiques transfusionnelles.<sup>208</sup> Une autre étude a rapporté l'administration d'unités de pRBC incompatibles avec le cross-match majeur (incompatibilité 1+ par la méthode de laboratoire en tube) chez cinq chats sans observation de réactions hémolytiques aiguës.<sup>19</sup>

Considérant les données contradictoires sur l'importance clinique des anticorps naturels ou acquis associés aux antigènes érythrocytaires extérieurs au système AB, les limites évoquées précédemment concernant les résultats des différentes études disponibles dans la littérature, et la description de réactions hémolytiques aiguës potentiellement mortelles associées à l'antigène Mik, un test de compatibilité est actuellement recommandé, par précaution, chez le chat avant toute transfusion.

Cette revue de littérature s'est concentrée sur deux aspects différents de la médecine transfusionnelle chez le chat. Le premier chapitre s'est intéressé aux étapes de la collecte et du stockage des produits sanguins félins. Il introduit ainsi notre première étude prospective, menée au CHUV de l'Université de Montréal entre 2017 et 2018, comparant un système de collecte fermé fabriqué spécifiquement pour les chats à un système de collecte ouvert classique composé de seringues. Le deuxième chapitre s'est quant à lui concentré sur les antigènes érythrocytaires et leurs allo-anticorps, et introduit notre deuxième étude prospective, menée entre 2017 et 2019, décrivant la découverte de cinq nouveaux antigènes érythrocytaires chez le chat.

# Chapitre III – Comparison of a closed system and an open system for blood collection in feline donors

Publié dans le *Journal of Feline Medicine and Surgery* en mars 2020

Marie Binvel<sup>\*1</sup>, Julie-Hélène Fairbrother<sup>2</sup>, Valérie Lévesque<sup>3</sup>, Marie-Claude Blais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada

<sup>2</sup>Bacteriology diagnostic laboratory, Complexe de Diagnostic et d'Épidémiosurveillance Vétérinaires du Québec, Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec and Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada

<sup>3</sup>Small Animal Blood Bank of the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada

**\*Corresponding author:**

Marie Binvel, DMV

## **Keywords**

Ralstonia species; transfusion; bacterial contamination; blood units

## **Abstract**

Feline blood collection is commonly performed using an open-system as adapted closed-systems are not readily available, limiting storage.

**Objectives:** This research aimed to evaluate the performances of a closed blood collection system and to compare it with an open-system in terms of feasibility, tolerability by the donor, quality of blood collected, and bacterial contamination.

**Methods:** Eight feline blood donors were prospectively and randomly subjected to both collection methods. Heart rate (HR), respiratory rate (RR), and blood pressure (BP) were evaluated before sedation, after sedation and after blood collection. The duration of the donation, the formation of a hematoma, as well as the degree of hemolysis and packed cell volume (PCV) of each blood unit, were evaluated. Aliquot samples were aseptically collected from each unit and tested for bacterial contamination by culture and PCR on days 0, 14, and 28 of storage.

**Results:** There was no significant difference between collection methods for HR and RR at any timepoints. Before sedation, the mean systolic BP was significantly higher with the closed-system (closed: 169 mmHg, open: 137 mmHg;  $P=0.003$ ). The average duration of collection was significantly shorter with the closed-system (closed: 3 mins 10 s, open: 8 mins;  $P=0.035$ ), however the prevalence of a successful blood collection with a single venipuncture and hematoma formation were not significantly different between systems. The mean unit PCV was significantly higher with the open-system (closed: 31 %, open: 34 %;  $P=0.026$ ). On bacterial culture, 15/16 units were negative at all timepoints (closed: 7; open: 8). Using PCR, 5/16 units were positive for *Ralstonia* species on at least one timepoint (closed: 3, open: 2).

**Conclusion and relevance:** Our designed closed-system appears well-adapted to feline blood collection and was well tolerated by the donors, performing similarly to an open-system, and could represent a valuable clinical device for the development of a feline blood banking, namely feline blood storage.

## **Introduction**

The use of blood products has become essential in the supportive care of critically ill cats, in which the main indications of transfusion are blood loss anemia and erythropoiesis deficiency.<sup>1-3</sup> Because of the small amount of blood collected and the lack of commercial closed collection systems, an open-system composed of multi-step manipulation of syringes is usually employed.<sup>2,4-7</sup> Each point of attachment provides an opportunity for contamination. Therefore, the blood collection procedure in cats is considered to have a higher risk of contamination than in dogs or humans, precluding storage of feline blood products. Two reports have described the spontaneous contamination of feline whole blood units by *Serratia* and *Pseudomonas* species.<sup>8,9</sup> This bacterial contamination could cause an immediate reaction and even fatal endotoxin-related shock in the recipient, although clinical cases in feline patients have not been described.<sup>10</sup>

One previous report mentioned the use of a feline closed collection system that was not commercially available.<sup>11</sup> Another recent study evaluated the in vitro quality of feline blood stored for 35 days in a new commercially available closed collection system designed for cats and concluded that the system was appropriate for blood collection.<sup>12</sup> However, no published study has compared the feasibility and safety of an open-system with those of a closed-system.

The objectives of this study were to compare two whole blood collection systems in cats (closed-system and open-system) in term of feasibility, tolerability by the donor, quality of blood unit, and bacterial contamination. We hypothesized that both systems would be identical for each criterion, except for the risk of bacterial contamination which would be reduced with the closed-system.

## **Materials and methods**

### **Animals**

Eight healthy adult domestic shorthair blood type A cats (weight: 4.5-5.9 kg, age: 2-6 years) that belonged to the blood donor colony (Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal) were enrolled. All cats had a normal physical examination and echocardiography before entering the colony. They were tested negative for feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus (Snap FIV/FeLV Combo, IDEXX Laboratories Inc.), *Mycoplasma haemofelis*, *Bartonella* species, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*, *Cytauxzoon felis*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species (PCR testing, IDEXX Reference Laboratories, Canada) and were up-to-date on vaccinations and deworming, according to the current recommendations.<sup>13</sup> Each cat was subjected to both collection methods performed by a single

phlebotomist, the order of which was attributed randomly. All blood collections were performed by the same phlebotomist, a health technician trained in good blood collection practices, in presence of the same veterinarian, a small internal medicine resident. This study was approved by the Ethical Committee of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal (CEUA-Rech-927).

### **Blood collection procedures**

Prior to sedation and blood collection, packed cell volume (PCV) and total solids were evaluated on blood collected from a peripheral venipuncture. All donors were sedated with ketamine (4 mg/kg) and diazepam (0.25 mg/kg) administered in the cephalic vein. All cats were placed in lateral recumbency and a jugular vein was punctured. Duration of the donation was recorded, from the time of venipuncture for blood collection until completion of the collection. Serial physical examinations, including heart rate (HR), respiratory rate (RR) and blood pressure (BP) measured with an oscillometric monitor (PetMAP graphic, Ramsey Medical), were performed by the same veterinarian prior to sedation (pre-sedation), immediately after sedation (post-sedation) and after blood collection (post-collection). The site of venipuncture was evaluated post-donation for the presence of a hematoma or of active bleeding.

### **Blood collection systems**

For the open-system, 56 ml of blood was collected via a 19 G butterfly needle connected by a three-way valve to two 30 ml syringes pre-filled under aseptic condition in a laminar flow hood with CPDA anticoagulant extracted from a 450 ml single unit for human blood collection (Terumo Medical Corporation) in a ratio of CPDA: blood of 1:7.<sup>2, 6, 7, 14, 15</sup> Eighteen syringes (8 for the study and 10 for the functioning of our blood bank) were prepared at the same time using 2 different human blood collection bags.

To create a closed-system, a 150 ml single pediatric bag (transfer pack, Fenwal) was aseptically welded (TSCD-II apparatus, Terumo Medical Corporation) to the same type of human bags used for the open-system, in a laminar flow hood. Eight milliliters of CPDA were transferred to the pediatric bag in order to obtain the same ratio of CPDA: blood, after which the bag was welded to a single 19 G apheresis needle (Fistula Needle Set, JMS). The final product (figure 1) was sealed into a bag for storage (Safe-Seal, Medicom) and stored in a cupboard in the blood bank room. A volume of 56 ml of blood (weighing 59 g for a blood specific gravity of 1.053) was collected by suction using a vacuum chamber (Animal Blood Resources International) placed on a digital scale. Negative pressure of the vacuum was set at -1inHg.

### **Samples and analysis of whole blood**

For the open-system, 6 ml of blood from the syringes were aseptically transferred to a collection line (Baxter extension set with 2 interlink injection sites). For the closed-system, the blood in the bag was gently mixed and the collection line was filled with blood. Three aliquots of 2 ml and one aliquot of 0.3 ml were produced on collection lines for both systems using an electric thermal sealer (Hematron 3, Baxter). All blood units collected during the study were transfused to anemic feline patients, and only aliquots were analyzed at all timepoints.

PCV (measured on a microhematocrit tube after centrifugation) was assessed immediately post-donation on the 0.3 ml aliquot, and the degree of hemolysis was visually graded according to the following scale: absent, i.e. plasma is nearly transparent (0); mild, i.e. plasma is light red (1+); moderate, i.e. plasma is red (2+); and severe, i.e. color of plasma cannot be visually differentiated from red blood cells (3+). Bacterial contamination was assessed by testing aliquots by culture and by conventional PCR on days 0 (T0 at room temperature), 14 (T14 at  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ), and 28 (T28 at  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ ). These timepoints represent the beginning, the middle, and the end of the shelf-life of the feline whole blood bag.<sup>16</sup> Three aliquots of 2 ml from one unused specimen of each collection system were analyzed at T0, T14 and T28 (“closed and open-system negative controls”). Three aliquots from the collection line of a 450 ml human single bag containing CPDA were analyzed at T0, T14 and T28 (“CPDA negative control”). The CPDA bag used to perform the CPDA negative control was obtained from the same lot than the bags used to produce the closed-systems.

At the time of the analysis, the blood contained in the aliquot was aseptically transferred in an empty sterile tube in a laminar flow hood to facilitate manipulation. Aerobic and anaerobic cultures were performed by inoculation of 500  $\mu\text{l}$  of blood on Columbia agar with 5 % sheep blood (Difco) incubated at  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  with 5 % carbon dioxide, and 500  $\mu\text{l}$  on Tryptone soya agar (Oxoid) with 5 % sheep blood and gentamycin sulfate (Enzo) incubated at  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  in anaerobic conditions. Also, 10  $\mu\text{l}$  of blood was added to 5 mL of brain heart infusion broth (Bacto) and incubated at  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . All plates were examined after 18-24 and 48 hours of incubation. The incubation time for the negative plates was prolonged up to 5 days. Identification of growing bacteria was performed using the Matrix-assisted laser desorption/ionization–time of flight mass spectrometry.

DNA was extracted from a 500  $\mu\text{L}$  aliquot of blood (Biosprint 96 one-for-all Vet Kit, Qiagen) according to the manufacturer’s instructions. PCR was performed with universal primers for 16S rRNA gene of bacteria. Amplification was performed in a Professional Basic Biometra thermocycler (Biotech Inc). Negative (sterile water) and positive (known 16S rDNA of *Listeria* species) controls were included in every set of PCR

reaction. PCR products were detected by 1.5 % agarose gel electrophoresis, and bacteria were identified by sequencing the PCR product (Sanger method) and comparing it to a genetic sequence database (GenBank NCBI).

### **Analysis and statistics**

A mixed model, in which collection method and time (pre-sedation, post-sedation, post-collection) were included as fixed effects and subject was included as a random effect, was used to compare HR, RR and BP between methods. Similarly, a mixed model, in which collection method was included as a fixed effect and subject was included as a random effect, was used to compare the duration of collection and donor PCV (pre-sedation) and blood unit PCV. A McNemar test was used to compare the prevalence of success with a single venipuncture, the prevalence of hematoma formation, and the degree of hemolysis between both collection methods. Statistical analyses were performed using the software SAS v.9.4 (Software, SAS Institute Inc). Results were considered significant when  $P < 0.05$ .

## **Results**

### **Patients**

All cats had been enrolled in the feline blood donor colony for a minimum of 6 months (median 13.5 months [range 6 – 24 months]) and had participated in an average of 5.7 donations [range 1-10 donations] before entering the study. The median duration between collections for the purpose of the study was 5 months [range 2 – 7 months], and cats had participated in zero to two donations “outside” the study during the study-period.

### **Assessing the impact of each method on the donor**

No significant differences in mean HR and RR were found between collection methods for each given timepoint. Before sedation, the mean systolic BP was significantly higher (169 mmHg) with the closed-system (open-system: 137 mmHg,  $P = 0.003$ ), but no significance difference was noted at other timepoints (Table 1). The prevalence of hematoma was not statistically different between collection methods (closed: 12.5 % [ $n = 1$ ], open: 25 % [ $n=2$ ];  $P = 0.13$ ). Of the three cats that developed hematomas, two underwent repeated phlebotomy. The average duration of collection for these three cats was 12 mins 40 s. The average duration of collection with the closed-system (3 mins 10 s) was significantly shorter than with the open-system (8 mins;  $P = 0.035$ ). The prevalence of success with a single venipuncture was not significantly different between collection systems (closed: 87.5 %, open: 75 %;  $P = 1$ ) (Table 2).

### **Quality of the blood product**

The degree of hemolysis of all samples was either 0 or 1+. The prevalence of mild hemolysis (1+) was not significantly different between collection methods ( $P = 1$ ). The mean donor PCV prior to donation was identical for both collection methods (42 % [range 38-47 %]), which was significantly higher than the mean PCV of the aliquots for the 2 systems combined (33 % [range 28-38 %]) ( $P < 0.0001$ ). The mean unit PCV was significantly higher (34 %) with the open-system compared with the closed-system (31 %;  $P = 0.026$ ).

### **Bacterial culture and PCR**

Fifteen of the 16 (94 %) blood units and all the “open and closed-system negative controls” and “CPDA negative control” aliquots were negative for bacterial culture at all the timepoints. One unit collected with the closed-system was positive for *Staphylococcus* species after enrichment at T0, but negative at all other timepoints. Five units were only positive with PCR (5/16, 31 %), including 4/5 units positive at T0, but negative at all other timepoints. Two “closed-system negative controls” aliquots (T0 and T28) and one “CPDA negative control” aliquot (T0) were also positive. All of the detected bacteria by PCR were *Ralstonia* species (Table 3). Blood collected by the open-system was transfused the day of donation. Blood collected by the closed-system was transfused after 0 to 19 days of storage (mean 8 days). All blood transfusions were crossmatched-compatible and closely monitored and were uneventful.

### **Discussion**

Considering the small blood volume collected from cats, the use of closed collection system for donation is rare, and the collection of feline blood has been performed mainly via open-systems.<sup>2, 4-7, 12, 17</sup> For this study, we decided to design a closed-system not composed of syringes, but rather one that looks like human and canine standard closed-donation systems, in order to avoid disconnectable points of attachment that could compromise the sterility of the blood product. This system will not be commercially available, but it is easy to produce, and its availability is only dependent on the ability to invest in a welder apparatus.

Overall, the blood collection using both systems was well tolerated by the donors as demonstrated by the lack of significant variation of the studied clinical parameters (HR, RR, BP) immediately following sedation and donation for both methods. Most importantly, no episode of hypotension was observed with all BP maintained  $>100$  mmHg. These results are in accordance with those of other reports showing that, despite a variety of sedation protocols, blood donation is well tolerated by cats.<sup>5, 18, 19</sup>

Despite the same environment before sedation for both methods, the mean systolic BP was unexpectedly higher with the closed-system. It is possible that the phlebotomist was more stressed when manipulating the new designed closed-system, which was perceived by the donor. Stress behavior parameters were not evaluated to reinforce this hypothesis.

The mean duration of blood collection with the open-system (8 mins) was comparable to what has been previously reported.<sup>17,18</sup> No study has published the duration required to collect feline blood with a closed-system using a vacuum chamber. A study conducted in dogs reported a time of collection by suction of 4 mins 14 s, which is comparable to the time measured in our study.<sup>20</sup> The average duration of collection by the closed-system was significantly shorter than by the open system, and it remained well-tolerated by our donors. A shorter duration is a real advantage of the closed-system because it ensures that cats are manipulated when sedation is still active, which is ideal to reduce stress and discomfort.

The prevalence of hematoma following blood donation was previously reported to be 4.2-7.9 % in dogs, and 11 % in cats.<sup>5,20,21</sup> The overall prevalence of transient hematoma was higher in this study (18.7 %), but the prevalence of hematomas with the closed-system (12.5 %) was very close to the previously reported value in cats. A correlation with the duration of collection and the number of venipunctures was suspected as 2/3 cats with hematomas underwent repeated phlebotomy, although this was not statistically significant due to sample size. Collection duration, repeated phlebotomy, size of the needle and pressure of the blood aspiration could be studied as risk factors for the development of venipuncture-related adverse events.

The mean unit PCV was significantly lower than the pre-sedation PCV of the blood donors, which is in accordance with other reports showing that PCV of feline whole blood units varies between 26.1 and 27.8 % while those of feline donors are greater than 30 %.<sup>6,7,12</sup> First, this difference can be partly explained by a dilution effect of CPDA in the collection bag/syringe.<sup>7</sup> Secondly, sequestration of erythrocytes in the spleen and shifting of fluid from the extravascular to the intravascular compartment due to the anesthetic protocol could be considered.<sup>22,23</sup> To support an effect of our sedation protocol on our donor's PCV, it would have been interesting to measure their PCV after sedation and before collection. The mean unit PCV from the open-system was also significantly higher (34 %) than of the closed-system (31 %), which was nonetheless adequate.<sup>6,7,12</sup> Since the sedation protocol was the same and the amount of hemolysis was not significantly different between methods, the difference is more likely related to the volume of collected blood. Indeed, when using the closed-system, the blood collection was stopped when approximately 59 g of blood was collected, whereas with the open-system the collection stopped when

56 ml were precisely measured. This point is a slight disadvantage of the closed-system and could be improved by adjusting our ratio CPDA: blood and our assessment of the volume collected with the scale.

In our study, the percentage of negative bacteriological units was high (94 %), which is similar to the 96-100 % observed in previous studies on feline and canine blood products.<sup>12, 24-26</sup> *Staphylococcus* species was the only isolated bacteria. We attribute this growth to a contamination during the laboratory procedures, i.e. the manipulations for microbiological evaluation described in the material and method section, because the sample was negative by PCR at all timepoints.

The percentage of units and aliquots that were positive by PCR was moderate (31 % and 25 % respectively), and comparable between both systems. The detection of bacterial DNA in blood with PCR has been described in only a few veterinary studies.<sup>11, 26</sup> In one study, a PCR assay was performed on days 0, 21 and 35 on stored canine whole blood units and 53 % of blood units were positive at one timepoint.<sup>26</sup> Interestingly, in the current study, four units were positive at T0 and negative after that. The failure to identify the bacterium at subsequent timepoints may be attributable to the residual phagocytic activity of blood leukocytes.<sup>27</sup> Furthermore, the level of contamination at the time of collection is estimated to be less than 1-10 colony forming units/mL in human blood products.<sup>28, 29</sup> Initially, the low bacterial load of the units was perhaps not uniformly shared between aliquots with some aliquots containing too few bacteria to be positive. This hypothesis could explain that one unit was positive at T0 and T28, but negative at T14. These results and explanations are only possible if the microorganisms identified were dead or degraded, so that the bacteria were already dead at T0 or that the refrigeration temperature killed the bacteria after T0 or inhibited their growth. It would have been interesting to use a real-time PCR to quantify the bacterial load of the aliquots.

All bacteria identified by PCR were unexpectedly *Ralstonia* species. In previous studies, contamination by *Serratia* and *Pseudomonas* species has been described in feline whole blood and packed red blood cells units.<sup>9, 11</sup> *Ralstonia* species are aerobic, non-fermenting, Gram-negative rods that can be found in water and soil.<sup>30</sup> In human patients with impaired immunocompetence, *Ralstonia* species have been shown to be the causative agent of invasive infections including osteomyelitis, septic arthritis, and meningitis. One veterinary case report described a septicemia due to *Ralstonia pickettii* in a dog with immune-mediated thrombocytopenia.<sup>31</sup> *Ralstonia* species were never described in transfusion-related morbidities in human medicine nor in veterinary medicine. It was not possible to determine the actual contamination source of these microorganisms, but we hypothesize that the contaminants were introduced during the processing of the units because they were already present at T0 for all positive units and the PCR assays were positive

in 2/3 “closed-system negative control” aliquots. We do not believe that the contamination was related to inadequate asepsis during the production of our closed-system for the following reasons: firstly, 1/3 “CPDA negative control” aliquot was positive at T0; secondly, three aliquots from units collected with the open-system were also *Ralstonia*-positive. The hypothesis of contaminated CPDA units is considered likely because many cases of human infection were due to contaminated medical solutions with the contamination supposedly occurring at the manufacturing stage.<sup>32-35</sup> “Open-system negative control” aliquots were negative at all the timepoints, but it was not possible to compare the lot number of the CPDA units used to produce every system because the syringes of the open system were pre-filled with anticoagulant months before the beginning of the study, and the lot number was not recorded at this time. Alternatively, bacterial DNA contamination during PCR analysis at the laboratory is possible but seems less likely because negative and positive controls were undertaken at every step of the analysis. Furthermore, of 95 conventional PCR assays performed during the study period, *Ralstonia* species were detected in 9/57 samples from our study and 1/38 sample outside our study (P = 0,045).

The clinical relevance of these PCR positive results is likely not significant because most of the positive units were negative after T0. *Ralstonia* species grow easily on conventional media, which led us to suspect that the bacteria were dead/degraded. Finally, all units were transfused to feline recipients at our veterinary hospital without detection of any transfusion reactions despite a close monitoring.

The first limitation of our study is that all blood parameters were evaluated on segments from the collection line. This method was previously described for human and canine blood units<sup>26, 36, 37</sup>, but further studies are needed to assess the reliability of using segments as a proxy for evaluating quality parameters and bacterial contamination of feline blood units. For ethical reasons, the blood was used for actual anemic feline patients, which limited the volume of our aliquots to less than 10 % of the total volume collected. If aliquots of larger volume had been used, semi-quantitative measurement of the degree of hemolysis could have been assessed, as well as other quality tests. We also chose a duration of storage of 28 days because it represented the average of the two extremes feline whole blood unit shelf-life found in the literature [21-35 days], but the optimal shelf-life of whole feline blood stored in CPDA is unknown.<sup>2, 9, 12, 38</sup> Recent studies have evaluated *in vitro* indicators of red blood cell survival after storage, which cannot accurately predict how a given sample of stored red blood cells will survive in a recipient.<sup>7, 12, 25, 39</sup> An *in vivo* evaluation where the stored cells are labelled and followed in the circulation is essential to meet the current FDA requirements for stored human whole blood, which states that at least 75 % of transfused red blood cells remain in circulation 24 hours after transfusion. The objectives of our study were not to assess the storage

lesions and shelf-life of stored feline whole blood unit; but with the development of closed collection systems for cats, further studies are required to standardize the expiry of feline blood products. Contrary to one of the hypotheses, our study did not observe any difference in bacterial contamination between the two collection systems. However, it is important to note that collection conditions were optimized with, among others, an animal health technician trained in good blood collection practices. These conditions do not necessarily reflect the reality of all feline blood collection. Besides, the contamination was studied on a small number of blood units and further studies on a more significant number of cases is necessary. Finally, further research on the actual clinical relevance of positive PCR results on blood units are needed to assess the utility of using this test for evaluating bacterial contamination of blood products.

## **Conclusions**

Our designed closed-system appears as appropriate as an open-system for blood collection of feline donors and should be considered as an alternative to open collection systems to limit the multi-step manipulation of syringes. This closed-system permits blood collection by suction using a vacuum chamber, which accelerated the process without being detrimental to the blood donor; therefore, optimizing the collection. Finally, this system could represent a valuable clinical device for the development of a feline blood bank.

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank Dr Guy Beauchamp for his assistance with statistical evaluation of the data.

## **Conflict of interest**

The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

## **Funding**

The study was supported by the Fonds du Centenaire research grant (in-house grant, FC2018) as well as by the Fonds en Santé des Animaux de Compagnie research grant, supported by Zoetis (FSAC2018)

## **Ethical Approval**

This work involved the use of experimental animals; or involved the use of non-experimental animal(s) (owned or unowned) outside of established internationally recognised high standards ('best practice') of

individual veterinary clinical patient care. The study therefore had ethical approval from an established committee as stated in the manuscript.

## **Informed Consent**

Informed consent (either verbal or written) was obtained from the owner or legal custodian of all animal(s) described in this work for the procedure(s) undertaken.

## **Informed Consent for publications**

No animals or humans are identifiable within this publication, and therefore additional Informed Consent for publication was not required.

## **References**

1. Castellanos I, Couto CG and Gray TL. Clinical use of blood products in cats: a retrospective study (1997--2000). *J Vet Intern Med* 2004; 18: 529-532. 2004/08/24. DOI: 10.1892/0891-6640(2004)18<529:cuobpi>2.0.co;2.
2. Weingart C, Giger U and Kohn B. Whole blood transfusions in 91 cats: a clinical evaluation. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 139-148. 2004/05/12. DOI: 10.1016/j.jfms.2004.01.005.
3. Klaser DA, Reine NJ and Hohenhaus AE. Red blood cell transfusions in cats: 126 cases (1999). *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 920-923. 2005/03/25.
4. Barfield D and Adamantos S. Feline blood transfusions: A pinker shade of pale. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 11-23. 2011/01/11. DOI: 10.1016/j.jfms.2010.11.006.
5. Doolin KS, Chan DL, Adamantos S, et al. Retrospective evaluation of unexpected events during collection of blood donations performed with and without sedation in cats (2010-2013). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2017; 27: 555-560. 2017/08/11. DOI: 10.1111/vec.12643.
6. Spada E, Perego R, Baggiani L, et al. Haematological and morphological evaluation of feline whole blood units collected for transfusion purposes. *J Feline Med Surg* 2018: 1098612X18798841. 2018/09/19. DOI: 10.1177/1098612X18798841.
7. Spada E, Proverbio D, Baggiani L, et al. Change in haematological and selected biochemical parameters measured in feline blood donors and feline whole blood donated units. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 375-381. 2016/02/05. DOI: 10.1177/1098612X16628919.

8. Hohenhaus AE, Drusin LM and Garvey MS. *Serratia marcescens* contamination of feline whole blood in a hospital blood bank. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210: 794-798. 1997/03/15.
9. Stefanetti V, Miglio A, Cappelli K, et al. Detection of bacterial contamination and DNA quantification in stored blood units in 2 veterinary hospital blood banks. *Vet Clin Pathol* 2016; 45: 406-410. 2016/09/20. DOI: 10.1111/vcp.12372.
10. Wagner SJ. Transfusion-transmitted bacterial infection: risks, sources and interventions. *Vox Sang* 2005; 88: 60. 2005/01/25. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2005.00587.x.
11. Kessler RJ, Rankin S, Young S, et al. *Pseudomonas fluorescens* contamination of a feline packed red blood cell unit and studies of canine units. *Vet Clin Pathol* 2010; 39: 29-38. 2009/10/22. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2009.00190.x.
12. Crestani C, Stefani A, Carminato A, et al. In vitro assessment of quality of citrate-phosphate-dextrose-adenine-1 preserved feline blood collected by a commercial closed system. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 1051-1059. 2018/04/11. DOI: 10.1111/jvim.15056.
13. Wardrop KJ, Birkenheuer A, Blais MC, et al. Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 15-35. 2016/01/26. DOI: 10.1111/jvim.13823.
14. Wardrop KJ. Selection of anticoagulant-preservatives for canine and feline blood storage. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995; 25: 1263-1276. 1995/11/01.
15. Heikes BW and Ruaux CG. Effect of syringe and aggregate filter administration on survival of transfused autologous fresh feline red blood cells. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2014; 24: 162-167. 2013/11/15. DOI: 10.1111/vec.12115.
16. Davidow B. Transfusion medicine in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2013; 43: 735-756. 2013/06/12. DOI: 10.1016/j.cvsm.2013.03.007.
17. Killos MB, Graham LF and Lee J. Comparison of two anesthetic protocols for feline blood donation. *Vet Anaesth Analg* 2010; 37: 230-239. 2010/05/12. DOI: 10.1111/j.1467-2995.2010.00527.x.
18. Iazbik MC, Gomez Ochoa P, Westendorf N, et al. Effects of blood collection for transfusion on arterial blood pressure, heart rate, and PCV in cats. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1181-1184. 2008/01/17. DOI: 10.1892/06-287.1.

19. Spada E, Proverbio D, Bagnagatti De Giorgi G, et al. Clinical and haematological responses of feline blood donors anaesthetised with a tiletamine and zolazepam combination. *J Feline Med Surg* 2015; 17: 338-341. 2014/07/13. DOI: 10.1177/1098612X14542452.
20. Conversy B, Blais MC, Carioto L, et al. Comparison of gravity collection versus suction collection for transfusion purposes in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2013; 49: 301-307. 2013/07/19. DOI: 10.5326/JAAHA-MS-5917.
21. DeLuca LA, Glass SG, Johnson RE, et al. Description and evaluation of a canine volunteer blood donor program. *J Appl Anim Welf Sci* 2006; 9: 129-141. 2006/09/08. DOI: 10.1207/s15327604jaws0902\_3.
22. Biermann K, Hungerbuhler S, Mischke R, et al. Sedative, cardiovascular, haematologic and biochemical effects of four different drug combinations administered intramuscularly in cats. *Vet Anaesth Analg* 2012; 39: 137-150. 2012/02/24. DOI: 10.1111/j.1467-2995.2011.00699.x.
23. Dhumeaux MP, Snead EC, Epp TY, et al. Effects of a standardized anesthetic protocol on hematologic variables in healthy cats. *J Feline Med Surg* 2012; 14: 701-705. 2012/05/12. DOI: 10.1177/1098612X12448588.
24. Blasi Brugue C, Ferreira RRF, Mesa Sanchez I, et al. In vitro quality control analysis after processing and during storage of feline packed red blood cells units. *BMC Vet Res* 2018; 14: 141. 2018/04/28. DOI: 10.1186/s12917-018-1458-4.
25. Heinz JA, Pashmakova MB, Wilson CR, et al. Biochemical evaluation of the effects of storage on feline erythrocytes. *J Small Anim Pract* 2016; 57: 637-643. 2016/10/27. DOI: 10.1111/jsap.12585.
26. Miglio A, Stefanetti V, Antognoni MT, et al. Stored Canine Whole Blood Units: What is the Real Risk of Bacterial Contamination? *J Vet Intern Med* 2016; 30: 1830-1837. 2016/10/14. DOI: 10.1111/jvim.14593.
27. Siblini L, Lafeuillade B, Ros A, et al. Influence of blood prestorage conditions and white blood cell filtration on the bacterial load of blood deliberately inoculated with Gram-positive and Gram-negative pathogens. *Vox Sang* 2004; 87: 241-249. 2004/12/09. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2004.00565.x.
28. Dreier J, Stormer M and Kleesiek K. Real-time polymerase chain reaction in transfusion medicine: applications for detection of bacterial contamination in blood products. *Transfus Med Rev* 2007; 21: 237-254. 2007/06/19. DOI: 10.1016/j.tmr.2007.03.006.

29. Hillyer CD, Josephson CD, Blajchman MA, et al. Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation: joint ASH and AABB educational session in transfusion medicine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003; 575-589. 2003/11/25.
30. Ryan MP and Adley CC. *Ralstonia* spp.: emerging global opportunistic pathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 291-304. 2013/09/24. DOI: 10.1007/s10096-013-1975-9.
31. Herrera MA, Burkitt JM, Epstein SE, et al. *Ralstonia pickettii* septicemia in a dog with immune-mediated thrombocytopenia. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 182-185. 2009/01/30. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2008.0222.x.
32. Labarca JA, Trick WE, Peterson CL, et al. A multistate nosocomial outbreak of *Ralstonia pickettii* colonization associated with an intrinsically contaminated respiratory care solution. *Clin Infect Dis* 1999; 29: 1281-1286. 1999/10/19. DOI: 10.1086/313458.
33. Moreira BM, Leobons MB, Pellegrino FL, et al. *Ralstonia pickettii* and *Burkholderia cepacia* complex bloodstream infections related to infusion of contaminated water for injection. *J Hosp Infect* 2005; 60: 51-55. 2005/04/13. DOI: 10.1016/j.jhin.2004.09.036.
34. Centers for Disease C and Prevention. Nosocomial *Ralstonia pickettii* colonization associated with intrinsically contaminated saline solution--Los Angeles, California, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1998; 47: 285-286. 1998/05/08.
35. Tejera D, Limongi G, Bertullo M, et al. *Ralstonia pickettii* bacteremia in hemodialysis patients: a report of two cases. *Rev Bras Ter Intensiva* 2016; 28: 195-198. 2016/07/14. DOI: 10.5935/0103-507X.20160033.
36. Farrell SB, Shelat SG, Kim HC, et al. Alternative method to determine the hematocrit of red blood cell units: a potential use in the apheresis unit. *Transfusion* 2009; 49: 1255-1258. 2009/02/19. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02099.x.
37. Kurach JD, Hansen AL, Turner TR, et al. Segments from red blood cell units should not be used for quality testing. *Transfusion* 2014; 54: 451-455. 2013/07/10. DOI: 10.1111/trf.12303.
38. Wong C and Haskins SC. The effect of storage on the P50of feline blood. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2007; 17: 32-36. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2005.00163.x.

39. Cummings KA, Abelson AL, Rozanski EA, et al. The effect of storage on ammonia, cytokine, and chemokine concentrations in feline whole blood. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2016; 26: 639-645. 2016/07/23. DOI: 10.1111/vec.12510.

## Tables

**Table 1: Mean, 95 % confidence interval (CI), Minimal (Min) and maximal (Max) values of the evaluated clinical parameters measured in eight feline donors using closed and open collection systems before sedation, after sedation and after collection.**

Parameters	Closed-system		Open-system		P value
	Mean (95 % CI)	Min-Max	Mean ± SD (95 % CI)	Min-Max	
HR (bpm)					
<i>Before sedation</i>	180 (172-187)	[130-220]	172 (165-179)	[132-220]	0.31
<i>After sedation</i>	173 (166-180)	[140-208]	159 (152-166)	[140-170]	
<i>After collection</i>	183 (176-190)	[124-220]	179 (172-186)	[112-240]	
RR (mpm)					
<i>Before sedation</i>	45 (42-48)	[32-56]	39 (36-42)	[24-64]	0.42
<i>After sedation</i>	35 (32-38)	[24-56]	37 (34-40)	[24-80]	
<i>After collection</i>	39.5 (36.5-42.5)	[28-52]	37.5 (34.5-40.5)	[28-48]	
BP (mmHg)					
<i>Before sedation</i>	169 (164-174)	[159-194]	137 (132-142)	[124-161]	<b>0.003</b>
<i>After sedation</i>	159 (154-164)	[123-186]	150 (145-155)	[123-175]	0.27
<i>After collection</i>	156 (151-161)	[135-192]	145 (140-150)	[105-178]	0.20

Values in bold are statistically significant – HR= heart rate; RR = respiratory rate; BP = blood pressure

**Table 2: Mean, 95 % confidence interval (CI), Minimal (Min) and maximal (Max) values of collection parameters in eight feline donors using closed and open collection systems**

Parameters	Closed-system		Open-system		P value
	Mean (95 % CI)	Min-Max	Mean (95 % CI)	Min-Max	
Success with a single venipuncture (%)	87.5	NA	75	NA	1
Transient hematoma (%)	12.5	NA	62.5	NA	0.13
Hemolysis (%)	33	NA	33	NA	1
Donor PCV (%)	42.1 (41.3-42.9)	[40-45]	42.5 (41.7- 43.4)	[38-47]	0.64
Aliquot PCV (%)	31.4 (30.6 – 32.2)	[28-35]	34.4 (33.6 – 35.2)	[30-38]	<b>0.026</b>
Donation time (min)	3.18 (2.08-4.28)	[1.9-5.0]	8 (6.90-9.10)	[3.4-20.25]	<b>0.035</b>

*Values in bold are statistically significant - PCV = packed red blood cells*

**Table 3: Bacterial culture (all timepoints combined) and PCR results (at T0, T14 and T28) for the samples with at least one positive result**

Sample	System	Bacterial culture	PCR	PCR	PCR
			T <sub>0</sub>	T <sub>14</sub>	T <sub>28</sub>
1	Closed	Negative	Ralstonia spp	Negative	Negative
2	Closed	Negative	Ralstonia spp	Negative	Negative
3	Closed	Negative	Ralstonia spp	Negative	Negative
4	Closed	Staph spp (T <sub>0</sub> )	Negative	Negative	Negative
5	Open	Negative	Ralstonia spp	Negative	Negative
6	Open	Negative	Ralstonia spp	Negative	Ralstonia spp

*Staphylococcus species: Staph spp; Ralstonia species: Ralstonia spp*

# Chapitre IV – Identification of five new feline erythrocyte antigens based on the presence of naturally occurring alloantibodies

Non publié, soumis au *Journal of Veterinary Internal Medicine* en juillet 2020

Marie Binvel<sup>\*,1, a</sup>, Julie Arsenault<sup>2</sup>, Boris Depré<sup>3, b</sup>, Marie-Claude Blais<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada

<sup>2</sup> Department of Pathology and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada

<sup>3</sup>Emergency and Critical Care, Adomvet, Lyon, France

**\*Corresponding author:** Marie Binvel, DMV

**Keywords:** Blood typing, blood type systems, Mik antigen, blood compatibility, crossmatch, transfusion, alloimmunisation

**Abbreviations:** CI: confidence intervals; FEA: feline erythrocyte antigens; NOAb: naturally occurring alloantibodies; CHUV: Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire; FMV: Faculty of Veterinary Medicine; OR: odds ratio; RBC: red blood cells

**Acknowledgments:** Abstract was presented at the 2020 American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) Forum On Demand. Funding was provided by the Companion Animals Health Fund from the Faculty of Veterinary Medicine of the Université de Montréal, supported by Zoetis.

**Conflict of interest declaration:** The authors declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

**Off-label antimicrobial declaration:** Authors declare no off-label use of antimicrobials

**Institutional animal care and use committee (IACUC) or other approval declaration:** This prospective study was approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal (approval number: Rech 18-1912), and written owner consent was obtained before enrollment of cats into the study.

**Human ethics approval declaration:** Authors declare human ethics approval was not needed for this study

## **Abstract**

**Background:** Since the discovery of the Mik antigen, several studies have described blood incompatibilities unrelated to the AB system in cats.

**Objective:** To estimate the prevalence of cats with non-AB incompatibilities associated with the presence of naturally occurring alloantibodies (NOAb), and to begin mapping the corresponding feline erythrocyte antigens (FEA).

**Animals:** 258 type A cats from different sources

**Methods:** Prospectively, cats were evaluated for the presence of NOAb by crossmatching in groups of four to six cats. When NOAb were detected in a cat, its plasma was used as reagent to assess the presence of the corresponding FEA in all cats included thereafter, and agreement observed between results of this extensive blood typing was evaluated.

**Results:** The chance of detecting incompatibilities by randomly crossmatching two cats was 3.9%, which resulted in at least 7% of type A cats having NOAb. Blood typing and agreement analyses performed with seven newly detected NOAb allowed the identification of five presumably distinct FEA. FEA 1 and 5 were most frequent with prevalence of 84% and 96%, respectively. Only FEA 1 status was associated with the presence NOAb ( $P = 0.005$ ), which were observed in 16.7% of the 42 FEA 1-negative cats.

**Conclusions and clinical importance:** This study represents a first step of FEA's identification outside the AB system. Because of its prevalence and association with NOAb, FEA 1 may correspond to the Mik antigen. Banked alloantibodies will facilitate future studies, notably regarding mode of inheritance, prevalence and clinical relevance of the discovered FEA.

## **Introduction**

Blood types are markers on the red blood cells (RBC) surface identified most often following the discovery of antibodies that have reacted to them in a certain population subset.<sup>1</sup> In cats, the only blood group system currently defined is the AB system, consisting of types A, B, and AB.<sup>2</sup> The prevalence of these blood types varies among breeds and geographic locations, with type A being the most common.<sup>3-10</sup> The AB system is also characterized by the well-recognized presence of naturally occurring anti-A and anti-B alloantibodies (NOAb anti-A and anti-B).<sup>11</sup> The clinical relevance of these alloantibodies manifests by severe, acute hemolytic transfusion reactions in type B cats receiving type A blood as well as neonatal isoerythrolysis, whereas shortened survival of transfused RBC in type A cats receiving type B blood is reported.<sup>12-14</sup> Therefore, typing feline blood donors and recipients is critical prior to a first transfusion.

In 2007, a new feline RBC antigen named *Mik* was recognized in a group of domestic cats and appeared to be common with only four *Mik*-negative cats identified among 66 type A cats. Furthermore, *Mik*-negative cats presented NOAb anti-*Mik* that could mediate a clinically significant transfusion reaction despite the blood donor and recipient being AB-matched.<sup>15</sup> This study raised the question of the existence and clinical relevance of other feline RBC antigens independent of the AB system. Several other crossmatch studies documented the presence of NOAb outside the AB blood group system with 0 to 29 % of transfusion-naive cats showing at least one non-AB related incompatibility. Most of these studies focused on the possible clinical impact of the presence of NOAb on efficacy and safety of transfusion and did not describe the RBC antigens reacting to those NOAb.<sup>16-22</sup>

The first aims of this study were to evaluate the chance of detecting non-AB incompatibilities by randomly crossmatching two cats, to estimate the prevalence of cats with non-AB incompatibilities, and to investigate whether the presence of NOAb was associated with sex, age, purebred status, health status or sample's hemolysis. The second aim of this study was to assess the agreement observed between reactions obtained during an extensive and systematic blood typing investigation, in order to begin mapping the feline erythrocyte antigens (FEA) corresponding to the newly detected NOAb.

## **Materials and Methods**

This study was conducted prospectively at the Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV) of the Faculty of Veterinary Medicine (FMV) of the Université de Montréal between November 2017 and June 2019, and was approved by the Animal Care and Use Committee of Université de Montréal (approval number: Rech 18-1912).

## Animals

Cats were recruited from four different sources:

1. Adult cats that belonged to the CHUV's blood donor colony (n = 11), which were recruited overtime from various animal shelters. All blood donor cats were healthy based on an annual physical examination, complete blood count, and serum chemistry panel. They were screened for feline immunodeficiency virus, feline leukemia virus (Snap FIV/FeLV Combo, IDEXX Laboratories Inc.), *Mycoplasma haemofelis*, *Bartonella* species, *Candidatus Mycoplasma haemominutum*, *Candidatus Mycoplasma turicensis*, *Cytauxzoon felis*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* species (PCR testing, IDEXX Reference Laboratories, Canada) and were up-to-date on vaccinations and deworming.
2. Adult cats that belonged to the research colony of the FMV (n = 24). Research colony's cats also came from different animal shelters. Cats were clinically healthy based on an annual physical examination. They were screened for FIV/FeLV and were up-to-date on vaccinations and deworming.
3. Client-owned cats referred to the CHUV or employed-owned cats (n= 102). Written owner consent was obtained before enrollment of the cat in the study.
4. Surplus feline ethylenediaminetetraacetic (EDTA) blood samples submitted to the Diagnostic Laboratory of the FMV, that may have been healthy or sick (n = 134).

The following information were recorded for all cats: sex, age, breed, health status, reason for presentation, transfusion history, FIV/FeLV status, and hematocrit when available. Exclusion criteria included cats with a known history of previous blood transfusion. History regarding blood transfusions was unknown for 39 cats, which were still included in the study because a history of transfusion was considered unlikely.

## Samples

EDTA-anticoagulated blood samples (< 7 days old stored at 4°C) were available for all cats in the study. The samples were centrifuged at 3000g for 5 minutes to collect packed RBC as well as plasma from each cat. When the hematocrit was not available, the packed cell volume (PCV) of the EDTA sample was determined. The plasma was visually inspected for the degree of hemolysis which was scored from 0 to 4 by one observer<sup>a</sup>. RBC were washed 3 times in isotonic saline (0.9 % NaCl), and then 15 µL were suspended in 1,500 µL of low ionic strength saline (Ortho Clinical Diagnostics, Raritan, New-Jersey) to make a resultant 0.8 % RBC suspension.

### **AB Blood Typing**

Blood type was determined for all cats using a gel column method performed by two veterinarians<sup>a,b</sup> at different points in the study. This technique uses cards of six columns filled with gel beads and no added reagent (ID-Micro Typing System Cards, Ortho Clinical Diagnostics, Pompano Beach, Florida). Fifty microliters of the 0.8 % RBC suspension were mixed with 25  $\mu$ L of *Triticum vulgare* lectin (anti-B reagent, 8  $\mu$ g/mL, stored at -24°C) in one column, and with 25  $\mu$ L of type B serum (anti-A reagent) in another column. Auto-controls, referring to RBC incubated with plasma from the same animal, were also performed. The gel cards were incubated at 37°C for 15 minutes (ID-Incubator, DiaMed Microtyping System, Switzerland), followed by a centrifugation (ID-centrifuge, DiaMed Microtyping System, Switzerland) step at 80g for 10 minutes. AB and B cats were excluded from the next steps of the study.

### **Detection of naturally occurring alloantibodies by crossmatch gel column test**

Type A cats were evaluated for the presence of non-AB blood group alloantibodies through the use of extensive crossmatching with each other, in groups of 4-6 cats formed in chronological order. More specifically, each cat's plasma (25  $\mu$ L) was mixed with 0.8 % RBC suspension (50  $\mu$ L) of three to five other individuals within its group in addition to its own RBC (auto-control). The gel cards were then incubated and centrifuged according to the description above. The RBCs' migration through the gel was scored according to the following scale: 4+: all RBCs were agglutinated and formed a red line on the top of the gel; 3+: most RBCs were agglutinated on the top half of the gel with some retained on the surface of the gel; 2+: RBC agglutinates were predominantly observed in the lower half or were dispersed throughout the gel; 1+: few RBC agglutinates were dispersed in the lower half of gel, with most of the RBCs found at the bottom of the gel column; 0 : all RBCs were at the bottom of the tube (none agglutinated). For this step, reactions  $\geq$  2+ were considered incompatible (i.e., presence of NOAb).

### **Prospective blood typing for novel antigens**

When NOAb were detected in a cat (index cat) based on incompatible reaction(s), and according on the cat's availability, additional EDTA-anticoagulant blood samples (5 to 10 mL) were collected and its plasma was frozen and stored at -20°C for later testing. Plasma from the index cat was then tested against RBC of all other cats included thereafter in the study (i.e., blood typing). The blood typing was performed using the same gel column method described above. The results were graded using the same scale, and for this step a result  $\geq$  1+ was considered positive (i.e., presence of the FEA corresponding to the index NOAb). Corresponding FEA were numbered in the chronological order that the index cats were identified.

### **Agglutinin titer**

Strength of NOAb was evaluated through agglutination titers. The agglutinin titer is the highest dilution of serum or plasma at which agglutination is still detected ( $\geq 1+$ ). This was determined by making serial 2-fold dilutions of the index cat's plasma in phosphate-buffered saline solution crossmatched against RBCs of 2 previously typed-positive cats, randomly selected.

### **Statistical analyses**

Statistical analyses were performed using SAS Statistical Software, Version 9.3 (SAS Institute Cary, North Carolina). Descriptive data are presented as median, range and percentage. Prevalence of cats with non-AB incompatibilities with 95 % confidence intervals (CI) was estimated. Univariable logistic regressions were used to model the presence of NOAb (reaction  $\geq 2+$ ) according to cat's characteristics (source, sex, age, purebred status, health status, hemolysis) and extensive blood typing results. To identify factors independently associated with the presence of NOAb, a multivariate logistic regression analysis was performed including all the variables with  $P < 0.20$  (likelihood ratio test) in univariate analyses, followed by a backward selection procedure with  $P > 0.05$  as the criteria for rejection. Odds ratios (OR) were used to present the results with a significance level of 0.05. To determine whether there was an agreement between reactions obtained for each pairwise combination of two different NOAb (i.e., between two FEA blood typing), the percentage of agreement, McNemar's test, kappa statistic, and Gwet's coefficient were estimated. The percentage of agreement between two NOAb was calculated as the proportion of cats that had the same FEA typing results (defined as positive or negative) divided by the total of cats tested for the two given NOAb. For the McNemar's test, the null hypothesis was that the proportion of cats with a positive reaction for one NOAb was the same as the proportion of cats with a positive reaction for a second NOAb. The statistical significance was set at 0.01 to account for multiple testing. Cohen's Kappa statistics and Gwet's coefficient provide chance-corrected agreement coefficients, with the Gwet's coefficient being less sensitive to prevalence and marginal probabilities. Kappa values and Gwet's coefficient were interpreted to indicate strength of agreement as follows:  $< 0.20$  = poor;  $0.21-0.40$  = fair;  $0.41-0.6$  = moderate;  $0.61-0.80$  = good, and  $0.81-1.00$  = very good.<sup>23,24</sup>

## **Results**

### **Description of cats and AB blood typing results**

A total of 271 cats were included in the study with 126 females, 138 males and seven cats for which the sex was not recorded. The median age of the 212 cats for which birth date was available was 7.7 years

(range, 4 months to 19.5 years). The majority were mixed-breed cats ( $n = 217$ ), in addition to the following breeds: Bengal ( $n = 4$ ), Cornish Rex ( $n = 4$ ), Himalayan ( $n = 4$ ), Persian ( $n = 4$ ), Siamese ( $n = 4$ ), Chartreux ( $n = 3$ ), Main Coon ( $n = 3$ ), Sphinx ( $n = 3$ ), Savannah ( $n = 1$ ), Tonkinese ( $n = 1$ ), Munchkin ( $n = 1$ ), Abyssinian ( $n = 1$ ), British Shorthair ( $n = 1$ ), Highlander ( $n = 1$ ). Breed was not recorded for 19 cats. A total of 101 cats were tested for FIV/FelV, of which 96 were FIV/FelV negative, four were FIV-positive and one was FIV and FelV-positive. One-hundred-and-thirty-two cats were clinically unhealthy, 110 cats were considered healthy, and the reason of presentation was not available for 29 cats. Red blood cell mass evaluated by hematocrit or PCV ranged from 19 to 49 % (median of 34 %). The blood-type proportions in cats were 95.6 % type A ( $n = 259$ ), 3.3 % type B ( $n = 9$ ) and 1.1 % type AB ( $n = 3$ ). Of the 271 cats, 12 cats were excluded from the rest of the study because of their B or AB blood type and one type A cat was excluded because of a positive auto-control.

#### **Detection of naturally occurring alloantibodies results**

A total of 1228 crossmatches were performed with 258 type A cats divided into 46 groups; therefore, each cat was crossmatched against a median of 4.8 other cats: 3 other cats ( $n=4$ ), 4 other cats ( $n=54$ ), or 5 other cats ( $n= 200$ ). There was a total of 48 incompatible crossmatches (3.9%). Overall, 18 cats had at least one incompatible reaction ( $> 1+$ ), for a prevalence of 7% of incompatibilities (95 % CI: 4.2-10.8 %). Six cats (2.3 %) showed incompatibility to only one other cat, three (1.2 %) showed incompatibilities to two cats, four (1.6 %) showed incompatibilities to three other cats, and five cats (1.9 %) showed incompatibilities to all individuals to which they were tested (Table 1 and Figure 1).

Table 2 shows the clinical and demographic characteristics of the cats included in the study, and their distribution according to the presence or absence of NOAb. According to final multivariable logistic regression model, cats under 2 years of age were more likely to present NOAb (OR 2.21, 95 % confidence interval [CI], 0.60-8.14;  $P = 0.04$ ) than older cats ( $\geq 8$  years). Middle-aged cats ( $\geq 2$  and  $< 8$  years) were at less risk of presenting NOAb (OR, 0.30; 95 % CI, 0.08-1.14;  $P = 0.02$ ) than were older cats. The FEA1 was the only other variable kept in the final model (discussed in the next section).

#### **Blood typing for novel antigens results**

Of the eighteen cats with NOAb, seven were included for the prospective blood typing starting at different moments between day 0 (group 1) and day 480 (group 32). Nine cats could not be included because their owners were not reachable and/or were unable to return with their cat for the second blood sample. One cat was not included because it was one of the cats from the second to last group to be cross-matched. One cat was not included because he died before a second sample of blood could be taken. As indicated

above, a number from 1 to 7 was attributed to the index cats and their NOAb, as well as the corresponding FEA. The prospective blood typing results are summarized in Table 2. FEA 1 and 5 were most frequent with 83.7 % and 96 % of positive cats, respectively. FEA 2 and FEA 3 were the least common, with 9.6 % and 18.2 % of positive cats.

FEA 1 was the only antigen significantly associated with the presence of NOAb (Table 2). FEA 1 negative cats were more likely to present NOAb (OR = 3.81, 95 % CI, 1.32-11.0; P = 0.01) than FEA 1 positive cats. The seven FEA 1 negative cats with NOAb showed incompatibility to a median of four other cats (range, 3 to 5) for a total of 28 incompatible reactions (n= 48).

The results of the comparisons between reactions obtained with two different NOAb (i.e., between two FEA blood typing) are presented in Table 3. Agreement between pairs of FEA were variable, ranging from poor to very good. For example, the median percentage of agreement was considered acceptable (> 75 %) and Gwet's coefficient was good (0.61 – 0.8) to very good (> 0.8) between FEA 1 and FEA 5 (88.6 % ; 0.86), FEA 2 and FEA 3 (81.6 % ; 0.76), FEA 4 and FEA 6 (87.7 %; 0.78), FEA 4 and FEA 7 (84.4 %; 0.73) (Figure 2). Median Cohen's kappa was good between FEA 4 and FEA 6 (0.73), and between FEA 4 and FEA 7 (0.64). McNemar's test was significant for each pairwise combination of FEA typing results, except for FEA 1 and FEA 4 (P = 0.06), FEA 2 and FEA 3 (P= 0.13), FEA 4 and FEA 5 (P= 0.03), FEA 4 and FEA 7 (P= 0.03). The agreement was perfect between FEA 6 and FEA 7 (Figure 1). Available extensive blood typing results of the seven index cats in which NOAb were discovered are presented in Table 4.

### **Agglutinin titers results**

The NOAb agglutinin titers was measured for two cats in each NOAb groups, except for NOAb 4 because of the limited amount of the index plasma available (the cat died in the first weeks of the study). The titers varied from 1:4 to 1:8 for NOAb 1, 3, 5 and 6. The NOAb 2 agglutinin titers were 1:1 and the NOAb 7 agglutinin titers were 1:16 and 1:32.

## **Discussion**

In our prospective study we identified the presence of naturally occurring non-AB related alloantibodies and we used them to begin mapping unidentified corresponding FEA. Thus, comparison of results obtained from an extensive blood typing supports the existence of five, presumably different, new FEA. We described the frequency, the distribution, and the association of these newly identified FEA with NOAb, although more studies are warranted to clarify those findings and to determine their clinical importance.

Previous reports have already documented crossmatch incompatibilities and transfusion reactions in AB-matched transfusion naïve cats, highlighting the presence of NOAb outside of the AB system.<sup>15-22</sup> Our study supports the presence of non-AB NOAb with 3.9% chance of detecting incompatibilities by randomly crossmatching two cats, which resulted in at least 7% of 258 type A cats having NOAb. The history of transfusion was unknown for 39 studied cats, but none of them presented incompatibilities. Incompatibilities observed in our study were therefore all related to NOAb. Our study population was not a random sample, but a convenient sample of cats belonging to two different colonies, employed-owned cats and cats seen at our hospital, and more than half of them were unhealthy. However, since the presence of NOAb was not influenced by health status, nor by cat's source, sex or purebred status, our sample is likely representative of the feline population in the great area of Montreal.

Previous studies reported variable prevalence of non-AB blood type incompatibilities. Two European studies failed to detect any non-AB NOAb in 20 and 112 transfusion naïve cats, respectively.<sup>18, 17, 18</sup> In a prospective study in the United States, 24 cats had a pretransfusion crossmatch performed with 29% having NOAb for a total of 10 positive reactions of 52 crossmatches (19%).<sup>20</sup> A retrospective study in the United States documented 23 of 154 (14.9%) transfusion naïve cats with major crossmatch incompatibilities for a total of 39 positive reactions of 462 crossmatches (8%).<sup>19</sup> Geographical variation and number of crossmatch tested by cat may influence the prevalence of and the ability to detect non-AB incompatibilities, respectively. This large variability of prevalence among studies could also be explained by difference in crossmatch methods.

Currently, the reference method of crossmatching in the United States, which is the method used in studies presented above, is the laboratory tube agglutination assay.<sup>17-20</sup> Problems with this technique include low reproducibility, interobserver variation in interpretation, labor-intensiveness, requirements for technical expertise, lack of standardization, weakly false-positive and false-negative results.<sup>25</sup> Several other methods are available including slide assay, saline gel column technique, antiglobulin-enhanced gel column test and commercial gel-tube assay.<sup>1</sup> We chose to use the saline gel column technique for blood typing and alloantibody studies because this method has been proven to be highly accurate in human medicine with a sensitivity between 97.58 and 100% and a specificity close to 100%.<sup>26</sup> It can be better standardized, is simple to perform and easy to interpret with grading being independent of the skill of the reader; as other studies have previously shown for dogs, cats, and horses.<sup>15, 21, 27-30</sup> Two studies compared crossmatch results of tube and column gel methods for detecting NOAb in a limited number of cats (66 and 10) and found overall agreement between both methods.<sup>15, 19</sup> However, a prospective observational

study of 101 transfusion-naïve cats showed marked difference in the proportion of crossmatch incompatibility between the laboratory tube method (27%) and a commercial gel tube test (4%).<sup>22</sup> In a study comparing a saline gel column test and an antiglobulin-enhanced gel column test in 446 plasma to RBC pairings, both methods showed the same compatibility results for all pairings, except for 15 pairings for which incompatibility was only detected with the antiglobulin-enhanced gel column test (including 14 incompatibilities outside the expected AB mismatches).<sup>21</sup> These comparison studies emphasized that not all crossmatch methods are interchangeable and it remains difficult to compare results obtained from two different techniques.

It should also be noted that there is a lack of standardization of grade at which gel column crossmatch results are considered incompatible in veterinary medicine, with some studies using the grade 1+ and others the grade 2+.<sup>15, 21, 28, 29, 31</sup> The interpretation of low-grade agglutination (1+) can sometimes be confused with grade 0. A threshold of 2+ was chosen during the step of NOAb detection to increase the specificity. The selection of plasma that led to an easily visible agglutination reaction was important for the extensive blood typing to enable repeatable and interpretable results. However, even if we had considered incompatibility from grade 1+, our results would have been similar because only 4 cats showed 1+ reactions in the first step of the study, which would have led to a total of 22 cats with NOAb (8.5% versus 7%) and 54 positive reactions (4.4% versus 3.9%). A better standardization of crossmatch protocol appears to be of growing importance in feline transfusion medicine in order to correctly interpret and compare prevalence of incompatibilities.

Our compatibility results were influenced by the age, with cats under 2 years of age being more likely to present NOAb than older cats ( $\geq 8$  years). It is possible that NOAb are present in older cats at a concentration below the analytical sensitivity of the crossmatch test. Low antibody titers may be due to geriatric immuno-incompetence or an age-related decrease in natural exposure to the epitopes responsible for alloantibody formation. With this explanation, we would have expected the presence of NOAb to gradually decrease with age. However, we also found that middle-aged cats ( $\geq 2$  and  $<8$  years) were at less risk of presenting NOAb than were older cats ( $\geq 8$  years). We have no explanations for this finding and more studies are needed to determine the effects of age on NOAb.

During the prospective blood typing, seven NOAb were used to start mapping the FEA to which they bind (NOAb 1 to FEA 1, NOAb 2 to FEA 2, etc.). A perfect agreement was identified between reactions obtained with NOAb 6 and NOAb 7, which most likely indicates that they both reacted to the same antigen. FEA 6 and FEA 7 are therefore considered as one antigen, named FEA 6.7. It also appeared that NOAb 4 often

led to the same results as NOAb 6 and 7. Despite a good but imperfect agreement, it seems likely that NOAb 4 reacted against the same antigen as NOAb 6 and 7. The first reason is that the index cats 6 and 7 were both FEA 4-negative. Since cats can only have NOAb against FEA they do not express, NOAb 6 and 7 were likely directed against FEA 4, which would suggest that FEA 6.7 is actually the same antigen as FEA 4 (FEA 4.6.7). The second reason is that discrepancies between reactions obtained with NOAb 4 and NOAb 6-7 had a similar trend: positive reactions to NOAb 4 were observed in 11 cats that had negative reactions to NOAb 6 and NOAb 7, which could suggest that NOAb 4 is stronger (greater affinity and/or higher titer) than NOAb 6 and NOAb 7. A variability in the antibody titer (NOAb 4 titer was not determined but could be higher), in antigenic expression, and/or in the affinity of polyclonal antibodies to the FEA could have contributed to those differences. Additionally, the reagent being plasma from an index cat, it could have contained several antibodies directed against other erythrocyte antigens that may have cross-reacted during blood typing and contributed to those discrepancies. Index cats 6 and 7 were also FEA 2 and FEA 3-negative, but a poor agreement was detected between reactions obtained with NOAb 6-7, NOAb 2 and NOAb 3. Therefore, it seems unlikely that FEA 6.7 is the same antigen as FEA 2 or FEA 3. Unfortunately, the agreement between NOAb 4/FEA 4 and NOAb 6-7/FEA 6.7 cannot be studied furthermore because the reagent containing NOAb 4 is no longer available.

Gwet's coefficient showed good agreement between reactions obtained with NOAb 1 and NOAb 5. However, NOAb 1 and 5 could not react to the exact same FEA because the index cat 1 was FEA 5-positive; therefore, it could not express anti-FEA5 NOAb. In opposite, the index cat 5 being FEA 1-negative, it is possible that its plasma contained antibodies anti-FEA 1 and NOAb 5 (i.e. anti-FEA 5), which could participate to the observed agreement. The same reasoning applies for the agreement observed between FEA 2 and FEA 3.

Concerning the distribution of the different FEA, FEA 2 and FEA 3 had a frequency of < 20% in studied cats. Between 57 and 75% of cats were FEA 4.6.7-positive. FEA 1 appears to be a common antigen with a frequency of 84%. FEA 5 appears to also be common with a frequency of 96%. In human medicine, red cell antigens are classified as high-frequency antigens when they have a prevalence of greater than 90% in the general population, but a low number of cats was screened to determine the frequency of FEA 5 (n = 77) and the terminology "common antigen" appears more appropriate than "high frequency antigen".<sup>32</sup>

Finally, it is interesting to note that cats in our study were never negative for both FEA 1 and FEA 4.6.7. Cats were either FEA 1-negative/FEA 4.6.7-positive, FEA 1-positive/FEA 4.6.7-negative or FEA 1-positive/FEA 4.6.7-positive. The same observation applies for FEA 5 and FEA 4.6.7. These antigens could

potentially belong to the same blood group system, which would mean they are controlled at a single gene locus, or by two or more very closely linked genes on the same chromosome. This remains highly hypothetical and further studies are needed to determine if some of the newly discovered FEA actually form a blood group system.

Considering that cats may present NOAb against RBC antigen they do not express, FEA-negative cats were examined for the presence of NOAb. Unfortunately, only seven index cats out of 18 with NOAb were included for the extensive blood typing. NOAb were found in a low percentage of FEA 2 and FEA 3-negative cats (4.3 and 4.9% respectively). It was not possible to determine if there were anti-FEA 2 and anti-FEA 3 alloantibodies because most of FEA 2 and FEA 3-negative cats with NOAb were also negative for one or two others studied FEA. The only two FEA 4-negative cats (in addition to the index cat 4) with NOAb were the index cats 6 and 7, and the only FEA 6-negative cat (in addition to the index cat 6) with NOAb was the index cat 7; therefore, we concluded that a low percentage of FEA 4.6.7-negative cats (between 0 and 8.7%) showed natural anti-FEA 4.6.7 alloantibodies in cats of our study. NOAb have been identified in 16,7% of FEA 1-negative cats. They were likely anti-FEA 1 alloantibodies because an association was documented between FEA 1 status and the presence of NOAb.

The strength of almost all NOAb was weak with titers of  $\leq 1:8$ , but was moderate for NOAb 7 with titer of 1: 16 to 1:32. In comparison, previous reports demonstrate type-A cats anti-B alloantibodies are weak to moderate with a titer of  $< 1:32$  whereas type B cats anti-A titers are stronger and range from 1:64 to 1:2048.<sup>11</sup> The titer strength of each NOAb slightly varied depending on which FEA-positive RBCs were used, which might reflect variable expression of FEA on erythrocytes. From a practical perspective, polyclonal antiserum with NOAb are not optimal reagents for use in serologic testing because they are heterogeneous, can vary in concentration, serologic properties, epitope recognition and can contain nonspecific antibodies. The development of uniformly reactive and highly specific monoclonal antibodies could improve our ability to detect positive reactions for screening cats for these new FEA and, thus, could facilitate future studies.

From a clinical perspective, the importance of non-AB NOAb still needs to be determined. Recent studies have conflicting results with some of them supporting the use of crossmatched compatible units to increase the efficacy and safety of transfusion, while others show no significant difference in the incidence of transfusion reactions or increase in the post-transfusion PCV between cats with or without a pretransfusion crossmatch.<sup>19, 20, 22, 33, 34</sup> Firm conclusions concerning the clinical relevance of NOAb cannot be drawn from these studies because they compare efficacy and safety of transfusion between cats with

pretransfusion compatible crossmatch and cats with unknown compatibility status (i.e. may be compatible or incompatible). Performing blood transfusion in crossmatch-incompatible cats would represent the only way to further investigate the clinical relevance of NOAb and in vitro incompatibility, which is arguable for obvious ethical reasons. With at least 7% of cats presenting NOAb, almost 2% of them having incompatibilities to all RBC to which they were tested, and previous documentation of acute hemolytic transfusion reactions caused by non-AB NOAb (anti-*Mik*), crossmatching cats before a first transfusion remains valid cautionary recommendation as long as the clinical importance of NOAb and crossmatch incompatibility is not better characterized.<sup>15</sup>

Another important clinical aspect concerns the immunogenicity of the newly discovered FEA, i.e. their ability to stimulate the production of alloantibodies. Blood group antigen immunogenicity is a crucial factor in alloimmunization, which is a common post-transfusion sequelae described in dogs and recently in cats.<sup>18, 19, 35</sup> Development of alloantibodies against erythrocyte antigens outside the AB system has been observed in 25% of an anemic cat population within a median of 5 days after the first transfusion event.<sup>18</sup> In another study, 27% of previously transfused cats had major crossmatch incompatibilities. Furthermore, 16.3% of cats showed some degree of incompatibility after an initial transfusion, even though they had no incompatibility on their first crossmatch to two to three donors tested.<sup>19</sup> The immunogenicity of non-AB FEA warrants further investigation to determine if, after sensitization via transfusion, they stimulate the production of clinically significant acquired alloantibodies that may result in ineffective additional transfusions and even acute life-threatening hemolytic transfusion reactions.

It is uncertain if any of the newly discovered FEA is actually the *Mik* antigen because typing reagents for *Mik* are no longer available. We tried to recruit cats which had been previously typed for *Mik* (*Mik*-positive or negative) in order to analyze their extensive blood typing, but unfortunately *Mik*-typed cats could not be found. Previous data on the *Mik* antigen documented a frequency of 94% in a population of 66 cats, the presence of NOAb anti-*Mik* in *Mik*-negative cats, which have resulted in 2+ and 3+ major crossmatch incompatibilities, and agglutinin titers between 1:1 and 1:64.<sup>15</sup> Given its high frequency and its association with NOAb, FEA 1 may correspond to the lost *Mik* antigen. The lack of *Mik*, and now FEA 4, reagents highlights the problematic of relying solely on polyclonal and natural alloantibodies for blood typing. Although not a long-term solution, banking NOAb is essential to maintain our ability to blood type, to compare newly described FEA with already reported antigens, and to identify rapidly a compatible donor in case of incompatibility outside the AB system. In this way, this study led to the banking of NOAb against

all five new FEA. A more sustainable solution, such as the production of monoclonal antibodies, remains necessary.

Finally, naming a new blood antigen is not standardized in human blood banking, and even less in veterinary transfusion medicine.<sup>36</sup> Using a part (3 letters) of the name of the first reactive donor was chosen in 2007 for the *Mik* antigen.<sup>15</sup> We chose the label FEA (feline erythrocyte antigen) to mimic the label of most canine blood types and to facilitate our discussion. This points out how nomenclature could become an issue as more alloantibodies and corresponding antigens are found. A discussion group should again be considered to standardize canine and feline blood-group system nomenclature with standards made for the appropriate designation of newly found antigens.<sup>37, 38</sup>

In conclusion, based upon the identification of alloantibodies in cats, we found five presumably distinct feline blood antigens named from FEA 1 to 5, FEA 4.6.7 being named more simply FEA 4. All cats negative for one FEA could potentially have NOAb, but only FEA 1-negative cats were shown to be more at risk of presenting NOAb. Given its frequency and its association with NOAb, FEA 1 could correspond to the *Mik* antigen. Additional testing of cats is necessary to document mode of inheritance, geographical and breed distribution, frequency and immunogenicity of these newly discovered FEA, and also to determine the clinical relevance of their associated NOAb.

## **References**

1. Zaremba R, Brooks A and Thomovsky E. Transfusion Medicine: An Update on Antigens, Antibodies and Serologic Testing in Dogs and Cats. *Top Companion Anim Med* 2019; 34: 36-46. 2019/02/28. DOI: 10.1053/j.tcam.2018.12.005.
2. Auer L and Bell K. The AB blood group system of cats. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 1981; 12: 287-297. 1981/01/01. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1981.tb01561.x.
3. Knottenbelt CM. The feline AB blood group system and its importance in transfusion medicine. *J Feline Med Surg* 2002; 4: 69-76. 2002/05/25. DOI: 10.1053/jfms.2001.0162.
4. Arikan S, Gurkan M, Ozaytekin E, et al. Frequencies of blood type A, B and AB in non-pedigree domestic cats in Turkey. *J Small Anim Pract* 2006; 47: 10-13. 2006/01/19. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2006.00005.x.
5. Marques C, Ferreira M, Gomes JF, et al. Frequency of blood type A, B, and AB in 515 domestic shorthair cats from the Lisbon area. *Vet Clin Pathol* 2011; 40: 185-187. 2011/03/26. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00303.x.
6. Zheng L, Zhong Y, Shi Z, et al. Frequencies of blood types A, B, and AB in non-pedigree domestic cats in Beijing. *Vet Clin Pathol* 2011; 40: 513-517. 2011/11/19. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00371.x.
7. Fosset FT and Blais MC. Prevalence of feline blood groups in the Montreal area of Quebec, Canada. *Can Vet J* 2014; 55: 1225-1228. 2014/01/02.
8. 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. *Vet Med Int* 2014; 2014: 704836. 2014/04/24. DOI: 10.1155/2014/704836.
9. Cattin RP. Distribution of blood types in a sample of 245 New Zealand non-purebred cats. *N Z Vet J* 2016; 64: 154-157. 2015/11/06. DOI: 10.1080/00480169.2015.1112313.
10. Vieira SM, Ferreira RRF, de Matos AJ, et al. Distribution of feline AB blood types: a review of frequencies and its implications in the Iberian Peninsula. *JFMS Open Rep* 2017; 3: 2055116917727693. 2017/10/05. DOI: 10.1177/2055116917727693.

11. Bucheler J and Giger U. Alloantibodies against A and B blood types in cats. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 38: 283-295. 1993/10/01. DOI: 10.1016/0165-2427(93)90088-l.
12. Auer L and Bell K. Transfusion reactions in cats due to AB blood group incompatibility. *Res Vet Sci* 1983; 35: 145-152. 1983/09/01.
13. Giger U and Bucheler J. Transfusion of type-A and type-B blood to cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198: 411-418. 1991/02/01.
14. Cain GR and Suzuki Y. Presumptive neonatal isoerythrolysis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 187: 46-48. 1985/07/01.
15. Weinstein NM, Blais MC, Harris K, et al. A newly recognized blood group in domestic shorthair cats: the Mik red cell antigen. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 287-292. 2007/04/13. DOI: 10.1892/0891-6640(2007)21[287:anrbgi]2.0.co;2.
16. Weingart C, Giger U and Kohn B. Whole blood transfusions in 91 cats: a clinical evaluation. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 139-148. 2004/05/12. DOI: 10.1016/j.jfms.2004.01.005.
17. Tasker S, Barker EN, Day MJ, et al. Feline blood genotyping versus phenotyping, and detection of non-AB blood type incompatibilities in UK cats. *J Small Anim Pract* 2014; 55: 185-189. 2014/04/05. DOI: 10.1111/jsap.12180.
18. Hourani L, Weingart C and Kohn B. Alloimmunisation in transfused patients: serial cross-matching in a population of hospitalised cats. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 1231-1237. 2017/01/20. DOI: 10.1177/1098612X16688574.
19. McClosky ME, Cimino Brown D, Weinstein NM, et al. Prevalence of naturally occurring non-AB blood type incompatibilities in cats and influence of crossmatch on transfusion outcomes. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 1934-1942. 2018/10/12. DOI: 10.1111/jvim.15334.
20. Sylvane B, Prittie J, Hohenhaus AE, et al. Effect of cross-match on packed cell volume after transfusion of packed red blood cells in transfusion-naive anemic cats. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 1077-1083. 2018/03/25. DOI: 10.1111/jvim.15120.
21. Goy-Thollot I, Nectoux A, Guidetti M, et al. 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: 588-595. 2018/12/18. DOI: 10.1111/jvim.15381.

22. Humm KR and Chan DL. Prospective evaluation of the utility of cross-matching prior to first transfusion in cats: 101 cases. *J Small Anim Pract* 2020 2020/03/07. DOI: 10.1111/jsap.13124.
23. Gwet KL. Computing inter-rater reliability and its variance in the presence of high agreement. *Br J Math Stat Psychol* 2008; 61: 29-48. 2008/05/17. DOI: 10.1348/000711006X126600.
24. Zec S, Soriani N, Comoretto R, et al. High Agreement and High Prevalence: The Paradox of Cohen's Kappa. *Open Nurs J* 2017; 11: 211-218. 2017/12/15. DOI: 10.2174/1874434601711010211.
25. Tocci LJ and Ewing PJ. Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: an overview of pretransfusion testing. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009; 19: 66-73. 2009/08/21. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2009.00387.x.
26. Cid J, Nogues N, Montero R, et al. Comparison of three microtube column agglutination systems for antibody screening: DG Gel, DiaMed-ID and Ortho BioVue. *Transfus Med* 2006; 16: 131-136. 2006/04/21. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2006.00655.x.
27. Euler CC, Lee JH, Kim HY, et al. Survey of Two New (Kai 1 and Kai 2) and Other Blood Groups in Dogs of North America. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 1642-1647. 2016/09/15. DOI: 10.1111/jvim.14572.
28. Luethy D, Owens SD, Stefanovski D, et al. Comparison of Tube, Gel, and Immunochromatographic Strip Methods for Evaluation of Blood Transfusion Compatibility in Horses. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 1864-1871. 2016/10/23. DOI: 10.1111/jvim.14604.
29. Casenave P, Leclere M, Beauchamp G, et al. Modified stall-side crossmatch for transfusions in horses. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 1775-1783. 2019/05/19. DOI: 10.1111/jvim.15519.
30. Goulet S and Blais MC. Characterization of Anti- Dal Alloantibodies Following Sensitization of Two Dal-Negative Dogs. *Vet Pathol* 2018; 55: 108-115. 2017/01/28. DOI: 10.1177/0300985816688746.
31. Kessler RJ, Reese J, Chang D, et al. Dog erythrocyte antigens 1.1, 1.2, 3, 4, 7, and Dal blood typing and cross-matching by gel column technique. *Vet Clin Pathol* 2010; 39: 306-316. 2010/08/24. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2010.00249.x.
32. Bailey D and Westhoff C. Other Blood Group Systems, Collections, and Series. *Transfusion medicine and hemostasis*. third ed., 2019.

33. Weltman JG, Fletcher DJ and Rogers C. Influence of cross-match on posttransfusion packed cell volume in feline packed red blood cell transfusion. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2014; 24: 429-436. 2014/07/22. DOI: 10.1111/vec.12204.
34. Martinez-Sogues L, Blois SL, Manzanilla EG, et al. Exploration of risk factors for non-survival and for transfusion-associated complications in cats receiving red cell transfusions: 450 cases (2009 to 2017). *J Small Anim Pract* 2020; 61: 177-184. 2020/03/03. DOI: 10.1111/jsap.13108.
35. Goy-Thollot I, Giger U, Boisvineau C, et al. Pre- and Post-Transfusion Alloimmunization in Dogs Characterized by 2 Antiglobulin-Enhanced Cross-match Tests. *J Vet Intern Med* 2017; 31: 1420-1429. 2017/08/15. DOI: 10.1111/jvim.14801.
36. Garratty G, Dzik W, Issitt PD, et al. Terminology for blood group antigens and genes-historical origins and guidelines in the new millennium. *Transfusion* 2000; 40: 477-489. 2000/04/25. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2000.40040477.x.
37. Vriesendorp HM, Westbroek DL, D'Amaro J, et al. Joint report of 1st International Workshop on Canine Immunogenetics. *Tissue Antigens* 1973; 3: 145-163. 1973/01/01.
38. Vriesendorp HM, Albert ED, Templeton JW, et al. Joint report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics. *Transplant Proc* 1976; 8: 289-314. 1976/06/01.

## Tables

**Table 1- Crossmatches (n=1228) and cats (n=258) distribution according to compatible or incompatible results**

Reaction	Crossmatch results	Number (%) of crossmatches	Number (%) of cats*
Compatible	0	1174 (95.6)	236 (91.5)
	1+	6 (0.5)	4 (1.5)
	<i>Total</i>	<i>1180 (96.1)</i>	<i>240 (93)</i>
Incompatible	2+	35 (2.9)	11 (4.3)
	3+	12 (1.0)	6 (2.3)
	4+	1 (0.1)	1 (0.4)
	<i>Total</i>	<i>48 (3.9)</i>	<i>18 (7)</i>

*\*If a cat had > 1 incompatible result, the strongest reaction was used for the repartition.*

**Table 2- Distribution of cats with NOAb according to their clinical and demographic characteristics.**

Characteristics**		Total of cats	Presence of NOAb*		P value <sup>a</sup>
			Number of cats	Percentage (%)	
Source	Blood donor colony	11	0	0.0	0.22
	Teaching colony	23	0	0.0	
	Client and employed-owned cats	98	10	10.2	
	Surplus EDTA sample	126	8	6.4	
Sex	Male	134	9	6.7	0.81
	Female	119	9	7.6	
Age	< 2 years	20	4	20.0	0.04
	2 ≤ age < 8 years	82	3	3.7	
	≥ 8 years	100	11	11.0	
Breed	Mixed	204	14	6.9	0.49
	Purebred	35	4	11.4	
Health status	Unhealthy	126	10	7.9	1.00
	Healthy	105	8	7.6	
Hemolysis	Yes	167	13	7.8	0.48
	No	91	5	5.5	
FEA 1	negative	42	7	16.7	0.01
	positive	216	11	5.1	
FEA 2	negative	141	6	4.3	1.00
	positive	15	1	6.7	
FEA 3	negative	103	5	4.9	0.61
	positive	23	2	8.7	
FEA 4	negative	23	2	8.7	0.64
	positive	70	4	5.7	

FEA 5	negative	3	0	0.0	1.00
	positive	74	2	2.6	
FEA 6	negative	52	1	1.9	0.24
	positive	71	5	7.0	
FEA 7	negative	32	0	0.0	0.50
	positive	42	2	4.8	

<sup>a</sup> P value from univariable logistic regression modeling the presence of NOAb (likelihood ratio test).

\*Results  $\geq 2+$  are considered as incompatible (i.e., presence of NOAb)

\*\* One B cat was excluded from the teaching colony, one AB and 3 B cats were excluded from the client or employed-owned cats, 2 AB and 6 B cats were excluded from the surplus EDTA samples. Sex, age, breed and health status were not recorded for 5, 56, 19 and 27 cats, respectively.

**Table 3 - Agreement assessment between blood typing results obtained with different pairs of naturally occurring alloantibodies (NOAb) [reagent] determined by McNemar's test, percentage of agreement, Cohen's kappa agreement and Gwet's coefficient**

Reagent 1	Reagent 2	Blood typing results				% agreement	P-value McNemar	Kappa		Gwet	
		neg/neg	neg/pos	pos/neg	pos/pos			Estimate	95 % CI	Estimate	95 % CI
FEA1	FEA2	11	13	130	2	8.3	<0.001	-0.18	(-0.27, -0.08)	-0.83	(-0.92, -0.73)
FEA1	FEA3	12	9	91	14	20.6	<0.001	-0.12	(-0.21, -0.02)	-0.59	(-0.73, -0.45)
FEA1	FEA4	0	12	23	58	62.4	0.06	-0.2	(-0.29, -0.12)	0.46	(0.27, 0.65)
FEA1	FEA5	3	9	0	67	88.6	<0.01	0.36	(0.06, 0.66)	0.86	(0.77, 0.96)
FEA1	FEA6	0	18	52	53	43.1	<0.001	-0.28	(-0.39, -0.17)	0.04	(-0.17, 0.25)
FEA1	FEA7	0	11	32	31	41.9	<0.01	-0.28	(-0.43, -0.14)	0.01	(-0.26, 0.28)
FEA2	FEA3	87	14	7	6	81.6	0.13	0.26	(0.03, 0.49)	0.76	(0.64, 0.87)
FEA2	FEA4	22	51	0	8	37	<0.001	0.08	(0.02, 0.14)	-0.22	(-0.45, 0.01)
FEA2	FEA5	2	69	1	7	11.4	<0.001	-0.02	(-0.07, 0.03)	-0.77	(-0.91, -0.62)
FEA2	FEA6	50	61	2	10	48.8	<0.001	0.09	(0.00, 0.17)	0.07	(-0.12, 0.27)
FEA2	FEA7	31	36	1	6	50	<0.001	0.1	(-0.01, 0.21)	0.1	(-0.15, 0.36)
FEA3	FEA4	18	41	0	13	43.1	<0.001	0.14	(0.05, 0.22)	-0.13	(-0.37, 0.10)
FEA3	FEA5	1	49	2	6	12.1	<0.001	-0.07	(-0.17, 0.03)	-0.75	(-0.93, -0.56)
FEA3	FEA6	40	45	3	14	52.9	<0.001	0.15	(0.03, 0.27)	0.12	(-0.09, 0.32)
FEA3	FEA7	20	26	3	4	45.3	<0.001	0	(-0.16, 0.17)	0	(-0.31, 0.30)
FEA4	FEA5	0	9	2	26	70.3	0.03	-0.1	(-0.21, 0.02)	0.6	(0.35, 0.85)
FEA4	FEA6	22	0	10	49	87.7	<0.01	0.73	(0.57, 0.88)	0.78	(0.64, 0.91)
FEA4	FEA7	7	0	5	20	84.4	0.03	0.64	(0.36, 0.91)	0.73	(0.50, 0.96)

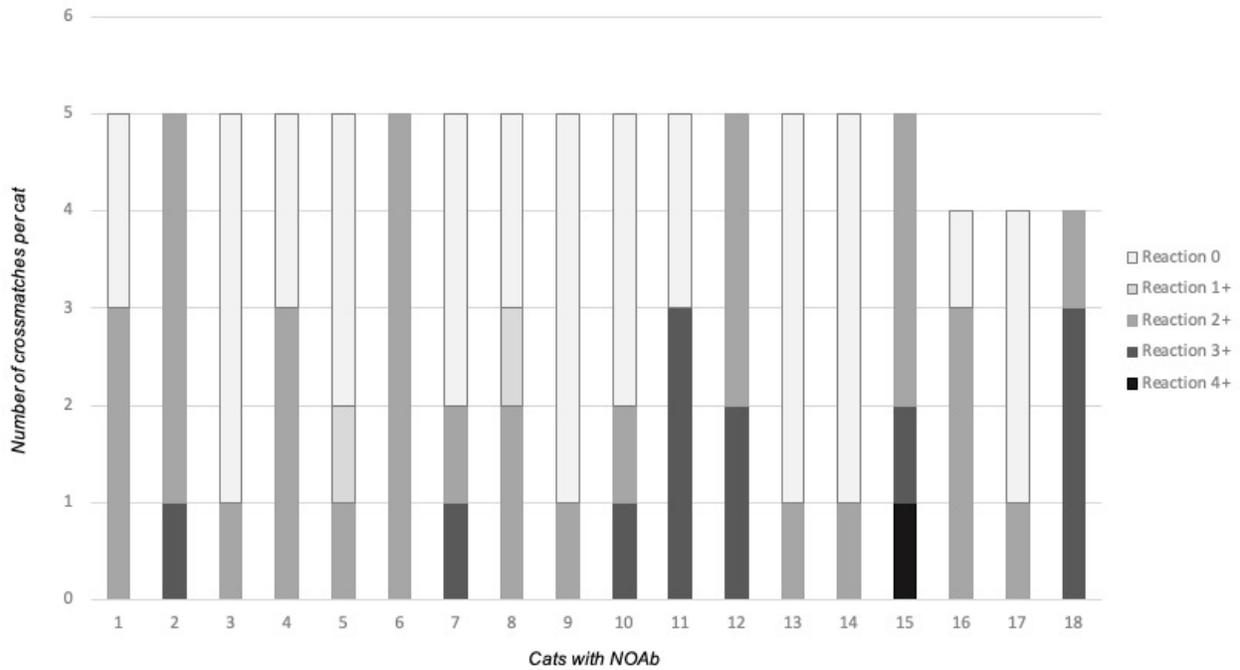
FEA5	FEA7	0	2	32	40	54.1	<0.001	-0.05	(-0.13, 0.02)	0.29	(0.05, 0.53)
FEA6	FEA5	0	35	3	41	51.9	<0.001	-0.08	(-0.16, 0.01)	0.24	(0.00, 0.48)
FEA6	FEA7	32	0	0	42	100	NC	1	NC	1	NC

*FEA: feline erythrocyte antigens; NC: not calculated; neg: negative; pos: positive*

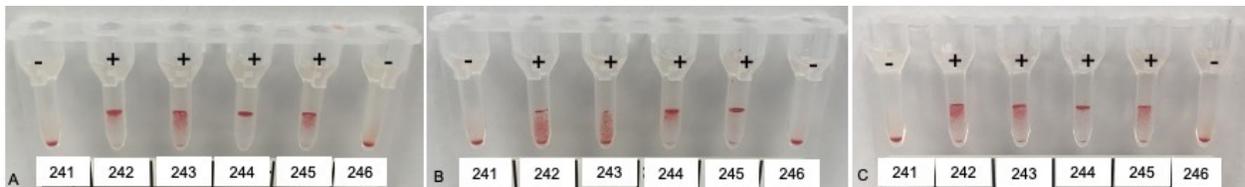
**Table 4 - Extensive blood typing results of each index cat with naturally occurring alloantibodies (NOAb)**

Index cat with NOAb	NOAb discovered	Extensive FEA blood typing						
		FEA 1	FEA 2	FEA 3	FEA 4	FEA 5	FEA 6	FEA 7
<b>Cat 1</b>	NOAb 1	-	-	-	+	+	+	+
<b>Cat 2</b>	NOAb 2	+	-	+	+	+	-	-
<b>Cat 3</b>	NOAb 3	+	-	-	+	NE	NE	NE
<b>Cat 4</b>	NOAb 4	+	-	-	-	NE	NE	NE
<b>Cat 5</b>	NOAb 5	-	-	+	+	-	+	+
<b>Cat 6</b>	NOAb 6	+	-	-	-	NE	-	NE
<b>Cat 7</b>	NOAb 7	+	-	-	-	+	-	-

*NE: not evaluated; + : positive = presence of the FEA on the surface of the index cat's red blood cells; -: negative = absence of the FEA on the surface of the index cat's red blood cells*



**Figure 1 - Distribution of cats with naturally occurring alloantibodies (NOAb) according to the number and the grade of incompatibilities**



**Figure 2 - Gel column results showing FEA 4 (A), FEA 6 (B) and FEA 7 (C) blood typing against the same 6 cats (number 241 to 246).**

*+ : positive = presence of the FEA on the surface of the index cat's red blood cells; - : negative = absence of the FEA on the surface of the index cat's red blood cells. All auto-controls were negative.*

## Discussion

*Les points jugés les plus importants ont été détaillés et discutés dans les deux articles précédents (chapitres III et IV). La discussion du mémoire axera donc principalement sur les points qui n'ont pas pu être abordés dans les articles.*

L'utilisation plus fréquente des transfusions sanguines chez le chat depuis les dix dernières années, globalement et à l'échelle plus restreinte du CHUV, nous pousse à vouloir améliorer nos connaissances en médecine transfusionnelle féline afin de mettre en place les meilleures pratiques transfusionnelles possibles et garantir la sécurité des donneurs et des receveurs. Dans ce contexte, notre travail s'est intéressé à deux aspects différents de la médecine transfusionnelle : le prélèvement de sang et la compatibilité sanguine.

### **Le prélèvement de sang**

Les sacs de prélèvement de sang en plastique contenant un anticoagulant ont été testés pour la première fois en 1950 et introduits plus largement dans les années 1960.<sup>225</sup> Les sacs en plastique ont été développés en médecine humaine pour remplacer les bouteilles en verre et prévenir les risques de contamination, de bris, d'embolies d'air, et permettre une séparation stérile des différents produits sanguins.<sup>226</sup> Ces sacs en plastique sont largement utilisés chez le chien car leur volume (450 à 500 mL) s'y adapte, ce qui autorise un prélèvement en système fermé. Chez le chat, les petits volumes de sang prélevés n'autorisent pas l'utilisation des sacs de prélèvement de médecine humaine. Des solutions alternatives sont donc utilisées, et notamment 44 % des centres vétérinaires interrogés en 2016 prélèvent le sang félin par un système ouvert composé de seringues assemblées au moment du prélèvement.<sup>4</sup> Ce type de système augmente les risques de contamination bactérienne et n'autorise habituellement pas le stockage du produit sanguin. Au moment de notre projet de recherche, aucun système fermé sans seringue et avec sac en plastique n'était commercialisé pour les chats. Nous avons donc décidé de créer un tel système à l'aide d'une soudeuse permettant un scellage aseptique entre les différents composés (sac de collecte, tubulure et aiguille de prélèvement); puis de comparer ce système fermé au système ouvert précédemment utilisé au CHUV.

Notre système fermé se fabrique facilement. Le transfert d'une quantité précise d'anticoagulant (8 mL) dans le sac de 150 mL a été l'étape la plus difficile à mettre en pratique. Initialement après avoir soudé le sac de 150 mL à un sac de prélèvement humain de 450 mL contenant du CPDA-1, l'anticoagulant était

transféré par gravité et la quantité transférée était mesurée grâce à une balance. Malheureusement, cette technique s'est révélée imprécise et conduisait à des grandes variations du ratio anticoagulant : sang en fonction des sacs. Pour résoudre ce problème, la longueur de tubulure des sacs correspondant à 8 mL d'anticoagulant a été mesurée. Le CPDA-1 contenu dans cette longueur exacte de tubulure était ensuite évacué dans le sac de 150 mL grâce à un « stripper ». Les systèmes étaient fabriqués puis introduits dans un sac de stockage sous une hotte à flux laminaire pour limiter la contamination bactérienne. La désinfection du matériel (stripper, soudeuse et pinces) et l'utilisation de sacs non ouverts (considérés stériles) sont essentielles pour aider à limiter la contamination lors de la fabrication. En médecine humaine, les sacs de collecte sont stérilisés par radiations ionisantes, par stérilisation gamma ou encore à l'autoclave.<sup>226</sup> Les deux premières techniques de stérilisation ne sont pas réalisables en clinique, mais une stérilisation à l'autoclave pourrait être envisagée à l'avenir, en plus de la fabrication sous hotte, afin d'accroître la stérilité du système.

Pour notre étude, nous avons choisi le prélèvement en système fermé par succion. Le sang prélevé dans un sac peut en effet être collecté par gravité ou par succion. Le prélèvement par gravité implique de positionner le donneur sur une surface en hauteur par rapport au sac de collecte, et d'utiliser la différence de hauteur associée à la pression veineuse pour permettre au sang de couler dans le sac. Le prélèvement par succion utilise un système d'aspiration pour créer une pression négative autour du sac dans une chambre à volume fixe et permet une collecte plus rapide.<sup>1</sup> Une étude vétérinaire a comparé le prélèvement par gravité au prélèvement par succion chez le chien. Le prélèvement par succion était plus rapide (4.2 minutes) comparativement au prélèvement par gravité (6.3 minutes). Le pourcentage d'hémolyse dans l'unité après le prélèvement n'était pas différent entre les deux méthodes.<sup>65</sup> Une de nos craintes était que la tubulure nécessaire pour réaliser nos échantillons (90 cm) soit trop longue et que le prélèvement par gravité soit trop lent, entraînant une coagulation du sang dans la tubulure qui ne contient pas d'anticoagulant; c'est pourquoi la succion a été privilégiée. Différents protocoles de prélèvement par succion sont rapportés chez le chien avec des pressions négatives variant de -101.6 à -177.8 mmHg (ce qui correspond à -4 à -7 inHg).<sup>65, 227, 228</sup> Aucune donnée n'étant disponible pour le chat, nous avons décidé de fixer aléatoirement la pression au niveau le plus bas possible, soit -1 inHg (ou -25.4 mmHg). Cette pression semblait adéquate car elle a permis de prélever le sang plus rapidement que par le système ouvert (durée médiane de 3.18 min contre 8.0 min), sans différence dans les paramètres vitaux des donneurs, l'hémolyse de l'échantillon ou encore les difficultés rencontrées au cours du prélèvement. Une durée de prélèvement de moins de cinq minutes est avantageuse car elle permet d'assurer que la sédation fait effet tout au long du prélèvement. Une durée plus courte a aussi toute son importance si un prélèvement sans sédation est

envisagé. Ce système comporte toutefois quelques inconvénients. Son premier inconvénient est le prix associé à l'équipement. Le plus gros investissement concerne la soudeuse (environ 30 000 CAD) qui n'est cependant pas dédiée uniquement à la fabrication des systèmes fermés. La chambre à succion représente le deuxième plus gros investissement (environ 400 CAD) et est utilisée pour les prélèvements chez les chiens et les chats. Ensuite, les frais associés à un système fermé sont d'environ 35 CAD contre 10 CAD pour un système ouvert. Le second inconvénient concerne le bruit produit par le système d'aspiration qui peut conduire à de l'agitation chez le donneur et à un plus grand risque d'échec du prélèvement. Les chiens apparaissent tolérants à la méthode par succion et aucune différence dans le succès du prélèvement n'était notée entre les méthodes par succion et par gravité.<sup>65</sup> Cet inconvénient est également de faible importance pour les donneurs félines sédatisés. La tolérance du bruit et son impact sur le succès du prélèvement chez un donneur félin non sédaté nécessite par contre une investigation.

Concernant la qualité du produit sanguin, le pourcentage d'échantillons présentant de l'hémolyse n'était pas différent entre les deux systèmes. Cependant, nous avons évalué l'hémolyse des unités uniquement de manière visuelle. Des études en médecine humaine montrent un accord faible ou inexistant entre l'évaluation visuelle de l'hémolyse et des mesures automatisées des indices d'hémolyse.<sup>229, 230</sup> Une étude sur les pRBC canins a également montré une différence significative entre l'évaluation visuelle de l'hémolyse par des techniciens et vétérinaires, et une estimation quantitative par mesure de l'hémoglobine libre; l'évaluation visuelle ne permettant pas de différencier des unités avec un pourcentage d'hémolyse au-dessus ou en-dessous du seuil de 1 % fixé par la FDA.<sup>231</sup> Bien que nous ayons utilisé une échelle gradée de 0 à 3+ pour nous aider à évaluer visuellement l'hémolyse de nos échantillons, des mesures semi-quantitatives (indice d'hémolyse) ou quantitatives auraient été plus objectives.

Nous avons également décidé de réaliser les mesures d'hémolyse, de l'hématocrite et la recherche de bactéries sur des échantillons obtenus à partir de segments de la tubulure de collecte. Cette méthode permet de sauvegarder l'unité de sang qui peut donc être transfusée à un patient. Considérant que les produits sanguins félines sont précieux et les risques encourus par les donneurs à chaque prélèvement, il semblait peu éthique de prélever le sang uniquement à des fins de recherche. Chaque prélèvement réalisé dans le cadre de notre étude a ainsi été transfusé à un chat anémique présenté au CHUV. En médecine humaine, les segments sont habituellement utilisés pour les tests de compatibilité pré-transfusionnels. Des résultats conflictuels existent sur leur utilisation pour l'évaluation de la qualité du sang. Une étude a montré l'existence d'une légère différence (0,92 à 1,2 %) entre l'hématocrite mesuré à partir des segments et celui mesuré directement dans des unités de pRBC. L'étude concluait que, bien que la différence soit

statistiquement significative, elle était suffisamment faible pour que la mesure de l'hématocrite sur un segment de tubulure soit utilisée pour évaluer l'hématocrite d'une unité de pRBC.<sup>232</sup> Une étude n'a pas montré de différence significative dans la concentration en cytokines entre les segments et des unités de sang entier ou de pRBC.<sup>233</sup> Une troisième étude s'est intéressée à l'utilisation des segments pour évaluer différents critères de qualité des unités de pRBC après 5 et 42 jours de stockage : hématocrite, hémoglobine, pourcentage d'hémolyse, indices hématologiques, concentration en ATP. Des différences significatives étaient trouvées pour chaque paramètre entre les segments et les unités de pRBC. Les auteurs concluaient que la qualité du sang dans les segments ne reflétait pas la qualité du sang dans les unités et conduisait notamment à une surestimation de l'hémolyse qui pourrait entraîner une élimination non nécessaire de l'unité de pRBC.<sup>234</sup> L'évaluation de l'hématocrite et de l'hémolyse sur les segments de tubulure pourrait donc ne pas refléter exactement l'hématocrite et l'hémolyse dans nos unités sanguines. Ces possibles divergences ont peu d'impact sur les conclusions de notre article, vu que des segments de tubulure ont été utilisés dans nos deux méthodes de prélèvement. Toutefois, à l'instar des études en médecine humaine, des comparaisons du sang félin stocké dans des segments de tubulure et dans des unités seraient nécessaires afin de juger de la fiabilité des tests sur segments pour évaluer la qualité d'une unité sanguine.

Nous n'avons pas trouvé d'étude qui compare l'évaluation de la contamination bactérienne des segments de tubulure à celle des unités de sang. La technique des segments pour rechercher des bactéries a toutefois été utilisée dans une étude en médecine humaine et une étude en médecine vétérinaire.<sup>235, 236</sup> Comme indiqué dans le paragraphe précédent, le choix d'utiliser des segments s'est fait suite à une volonté d'utiliser les unités pour un patient. Pour tenter de minimiser les différences entre l'unité (seringues ou sac) et les tubulures, l'intégralité du sang contenu dans les tubulures a été envoyée dans l'unité, mélangée puis ré-envoyée dans la tubulure avant de fabriquer les segments. Il est toutefois possible que les résultats obtenus sur les segments ne reflètent pas exactement la réalité de l'unité de sang. D'une part, les conditions rencontrées dans les segments ne sont pas les mêmes que dans les unités en termes de contact avec le matériel plastique et échange avec le milieu. D'autre part, le nombre de bactéries présentes initialement dans les produits sanguins est faible (inférieur à 0.5 unité formant colonie/mL) et le volume de sang analysé est le facteur principal influençant la sensibilité des cultures pour la détection des micro-organismes.<sup>237, 238</sup> L'analyse d'un segment contenant moins de 5 % du volume de sang de l'unité pourrait avoir diminué notre capacité à détecter une contamination par culture.

Pour pallier ce manque de sensibilité, nous avons utilisé une technique de biologie moléculaire, en parallèle de la culture classique sur gélose au sang. Nous avons choisi une méthode de PCR à large spectre ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S. Le gène codant pour l'ARNr 16S est utilisé en raison de sa structure très conservée chez toutes les bactéries. En effet, ce gène est constitué d'une succession de sept domaines conservés, sites de complémentarité pour les amorces universelles utilisées pour l'amplification, et de neuf régions hypervariables, portions de séquences propres à un groupe de bactéries.<sup>239</sup> Lorsqu'un résultat d'amplification est positif, un séquençage est réalisé, puis la séquence obtenue est comparée aux banques de données pour identifier la bactérie en cause. L'identification est exprimée en pourcentage de similarité avec les séquences des espèces bactériennes déjà décrites. Un pourcentage supérieur à 99 % permet d'assimiler la souche à une espèce, et un pourcentage situé entre 97 et 99 % permet de l'identifier au niveau du genre.<sup>240</sup> La technique de PCR 16S a été utilisée dans quelques études en médecine humaine pour détecter une contamination des produits sanguins.<sup>235, 241-244</sup> Une étude en médecine humaine a montré un pourcentage de pRBC positifs avec la PCR 16S de 0.1 %, ce qui est comparable aux pourcentages rapportés dans la littérature en utilisant la culture.<sup>235</sup> Une seule étude vétérinaire a utilisé une technique de PCR 16S sur des unités de sang entier chez le chien et a montré que 53 % des unités étaient positives avec la PCR contre 4 % avec la culture.<sup>236</sup> À notre connaissance, aucune autre étude n'a comparé les pourcentages de contamination bactérienne obtenus par culture et PCR 16S des produits sanguins.

L'avantage de la PCR 16S est la rapidité d'obtention des résultats et sa plus grande sensibilité, surtout pour les espèces fastidieuses et difficiles à cultiver. Il existe toutefois des limites à cette technique. Tout d'abord, le coût de cette technique reste plus élevée que la culture. Ainsi pour notre étude, le coût de l'amplification par la PCR 16S était deux à quatre fois plus cher que la culture, en fonction du besoin ou non d'un séquençage. Ensuite, la PCR 16S reste peu performante comme outil d'identification pour certains genres au sein desquels les variations de séquences entre espèces sont trop minimes pour permettre de les distinguer.<sup>245, 246</sup> De plus, certaines bactéries ont plusieurs copies du gène codant pour l'ARNr 16S, avec des variations entre elles, ce qui a pour conséquence de générer des séquences contenant des ambiguïtés.<sup>246</sup> Par ailleurs, les bases de données auxquelles les séquences sont comparées peuvent être « polluées » par des séquences peu ou mal identifiées ce qui peut entraîner des erreurs d'identification. Par exemple, la qualité des séquences déposées dans la base utilisée dans notre étude (Genbank, base de données publique) réunit un très grand nombre de séquences, mais elle n'est pas contrôlée. Des séquences provenant de microorganismes jamais cultivés peuvent être trouvées, ainsi que des séquences erronées, incomplètes ou ambiguës.<sup>247</sup> Les contaminations lors des amplifications géniques sont également fréquentes et rendent l'interprétation des résultats parfois délicate. Le problème des faux

positifs peut être réduit par l'utilisation de réactifs « DNA free », de pipettes dédiées, de trois pièces séparées dédiées à chaque étape (préparation des mélanges réactionnels, extraction de l'ADN, amplification) et par l'expertise d'un microbiologiste expérimenté. L'utilisation d'un témoin négatif pour chaque étape du protocole est aussi un élément indispensable pour dépister les faux positifs.<sup>248</sup> Tous ces points ont été rigoureusement appliqués dans notre étude afin d'interpréter correctement nos résultats et limiter les faux positifs. La sensibilité de l'amplification du 16S reste inférieure à celle de techniques récemment développées, telles que la PCR en temps réel, la « PCR-hybridation » ou la « loop-mediated isothermal amplification ».<sup>249, 250</sup> Ces techniques permettent de coupler détection bactérienne et identification, avec une sensibilité améliorée et un risque de contamination diminué. Cependant, ces nouvelles techniques demandent une désignation à l'avance des microorganismes recherchés et ne s'appliquent donc pas pour la détection « large » de bactéries. Enfin, la dernière limite des techniques de biologie moléculaire, qui n'est pas limitée à la PCR 16S, est qu'elles ne permettent pas de connaître la viabilité des bactéries ni d'obtenir d'antibiogramme, contrairement à la culture bactérienne. Considérant l'ensemble de ces limites, d'autres études sont nécessaires pour juger de l'intérêt clinique de l'utilisation de la PCR 16S pour détecter la contamination bactérienne des produits sanguins félines.

Enfin, nous allons clore cette section de la discussion en nous intéressant aux méthodes disponibles pour limiter la contamination du produit sanguin et ainsi assurer la sécurité du receveur. La publication de « guidelines » sur les tests à réaliser chez le chat donneur ont permis de limiter la transmission de maladies infectieuses virales ou parasitaires.<sup>2, 46</sup> La transmission de bactéries reste par contre un problème non résolu. Les sources de contamination bactérienne des produits sanguins sont liées au donneur (peau ou bactériémie sub-clinique), au prélèvement ou plus rarement à la préparation et au stockage des unités. En médecine humaine, la prévalence de contamination bactérienne des pRBC varie considérablement d'une étude à l'autre (de 0.03 à 0.3 %).<sup>90, 235, 251, 252</sup> La contamination des concentrés plaquettaires (prévalence variant de 0.08 à 0.4 %) est la problématique principale en médecine humaine car ce type de produit sanguin se conserve à température ambiante avec agitation pour préserver les plaquettes, ce qui favorise la croissance bactérienne.<sup>253-255</sup> Notre étude, quant à elle, montrait un pourcentage de contamination de 6 % par culture et 28 % par PCR, ce qui est bien plus élevé que les pourcentages rapportés en médecine humaine, mais comparable à ce qui a été rapporté chez le chien.<sup>236</sup> Plusieurs stratégies ont été introduites en médecine humaine pour réduire la contamination bactérienne. Ces stratégies incluent une désinfection adéquate de la peau du donneur, la déviation des premiers millilitres de sang collecté, ou encore l'inactivation des pathogènes.<sup>251, 252, 256, 257</sup>

Concernant la désinfection de la peau des donneurs, différents protocoles sont disponibles dans la littérature humaine. Une étude a montré une diminution de 57% de la contamination bactérienne des produits sanguins après la transition d'un protocole de désinfection à base d'alcool isopropylique 70 % et de chlorhexidine 0.5 %, à un protocole en deux étapes à base d'alcool isopropylique 70 % et de teinture d'iode.<sup>258</sup> Une deuxième étude a montré des résultats relativement similaires après passage d'un protocole à base de cetrimide 0.5 %/chlorhexidine 0.05 % et alcool isopropylique 70 %, à un protocole composé de povidone iodée 10 % et d'alcool isopropylique 70 %.<sup>259</sup> Une étude publiée en 2011 a montré qu'une désinfection en une seule étape à l'aide de tampon imprégné de chlorhexidine 2 %/alcool isopropylique 70 % était plus efficace pour diminuer la contamination bactérienne des produits plaquettaires que le protocole classique en deux étapes à base d'alcool et de povidone iodée.<sup>260</sup> Dans notre étude, nous avons utilisé une éponge imprégnée de chlorhexidine 4 % (BD E-Z Scrub 747 4% CHG, Becton Dickinson). La mousse obtenue lors du passage de l'éponge était laissée au contact de la peau pendant 2 minutes. Ensuite, des compresses imbibées de chlorhexidine 2 % et d'alcool isopropylique 70 % étaient utilisées à trois reprises pour enlever la mousse. Différents protocoles de désinfection pourraient être comparés chez les chats donneurs, à l'instar des études en médecine humaine, afin de déterminer le protocole le plus rapide à mettre en place et associé à une contamination minimale. En outre, des techniques pour limiter la possible contamination par le poil pourraient être instaurées (utilisation d'un champ opératoire par exemple).

En fonction des études, la diversion des premiers 10 à 40 mL d'un don permet de réduire de 40 à 92 % la contamination bactérienne du sang entier, des pRBC ou des concentrés plaquettaires en médecine humaine.<sup>235, 258, 261, 262</sup> Actuellement, la diversion d'environ 5 et 10 % du volume total prélevé chez un chat donneur n'est pas réalisable car le matériel utilisé ne s'y prête pas. Notre système fermé pourrait être optimisé afin d'y ajouter un sac satellite qui autoriserait cette diversion des premiers millilitres de sang prélevés.

L'inactivation des agents pathogènes par des méthodes ciblant les acides nucléiques des micro-organismes existent et incluent: le bleu de méthylène, les rayons UV seuls ou en association avec des agents tels que le psoralène ou la riboflavine. Ces méthodes sont étudiées de manière extensive en médecine humaine en termes de toxicité cellulaire et toxicité pour le receveur. Toute stratégie qui implique l'ajout d'un agent étranger ou des manipulations physico-chimiques doit être bien réfléchiée pour conserver l'intégrité des cellules et l'activité des protéines, mais aussi pour limiter la toxicité à court et moyen termes chez le

receveur aussi bien que chez le manipulateur.<sup>263-265</sup> De telles techniques d'inactivation ne sont pas étudiées ni utilisées en médecine vétérinaire actuellement.

Enfin la réalisation de la ponction par un phlébotomiste entraîné pourrait aussi aider à diminuer la contamination des produits sanguins. Des études en médecine humaine ont ainsi montré que l'emploi de personne dédiée au prélèvement du sang pour les hémocultures était associé à une plus faible contamination des échantillons.<sup>266-269</sup> Les mêmes résultats pourraient s'appliquer au prélèvement du sang pour préparer des produits sanguins. Dans notre étude, le sang était prélevé par une technicienne dédiée à la banque du sang et entraînée aux bonnes pratiques des prélèvements.

Le système fermé créé pour notre projet a prouvé sa facilité de fabrication et d'utilisation, ainsi que sa sécurité lors du prélèvement pour nos donneurs. Il a actuellement remplacé le système de prélèvement ouvert au CHUV. Ce système est toutefois un prototype et pourrait être amélioré afin de diminuer la contamination (ajout d'une poche de dérivation), améliorer notre ratio sang : anticoagulant, mais également faciliter la séparation des produits sanguins (création d'un système avec deux ou trois sacs). De plus, l'instauration d'un système de prélèvement fermé qui autorise le stockage des produits sanguins félines ré-ouvrent la voie aux études sur la viabilité des globules rouges félines lors de leur conservation. Enfin, des études sur un plus grand nombre d'unités sanguines sont maintenant nécessaires pour mieux évaluer le pourcentage de contaminations bactériennes, l'impact possible sur le receveur et les mesures à mettre en place pour les diminuer.

## **Les antigènes érythrocytaires et la compatibilité sanguine**

La recherche a beaucoup de retard dans la découverte et la description des groupes sanguins et antigènes érythrocytaires chez le chat comparativement à d'autres espèces. Ainsi, chez l'humain, 36 systèmes de groupes sanguins sont actuellement définis et comptabilisent plus de 300 antigènes érythrocytaires.<sup>270</sup> Plus de dix antigènes érythrocytaires sont décrits chez le chien; huit groupes sanguins majeurs et 34 antigènes érythrocytaires sont reconnus chez le cheval, 11 systèmes de groupe sanguins sont rapportés chez les bovins, dont le groupe EAB qui contient plus de 60 antigènes érythrocytaires.<sup>1, 169</sup> La croissance exponentielle de la médecine transfusionnelle féline au cours des dix dernières années et la popularisation des tests de compatibilité pré-transfusionnels ont mis en lumière les limites de nos connaissances sur les antigènes érythrocytaires félines. En 2007, la découverte de l'antigène Mik a été une étape importante pour avertir du potentiel impact clinique des antigènes érythrocytaires extérieurs au système AB et encourager les travaux sur ces antigènes inconnus.<sup>199</sup> De manière étonnante, les études publiées par la suite se sont

principalement intéressées à l'intérêt des tests de compatibilité avant une transfusion sans chercher à définir ou décrire les antigènes érythrocytaires à l'origine des réactions d'incompatibilité non expliquées par le système AB. Cette observation a conduit à notre deuxième projet de recherche.

Ce projet a été divisé en deux parties. La première partie a consisté à détecter, dans le plasma des chats de groupe A, des anticorps naturels dirigés contre des antigènes érythrocytaires non identifiés et indépendants du système AB. La réalisation de cross-match par groupe de quatre à six chats nous a permis de détecter des incompatibilités associées à la présence d'anticorps naturels chez 7 % des chats de type A inclus dans l'étude (n = 258). Comme présenté dans le chapitre II, plusieurs publications précédentes s'étaient déjà intéressées à la prévalence des incompatibilités extérieures au système AB. Les résultats étaient très variables en fonction des études avec des prévalences allant de 0 à 29 %.<sup>18, 19, 30, 48, 122, 190, 208</sup> Comme discuté, ces différences peuvent être imputables à de nombreuses raisons (technique de cross-match, grade des réactions incompatibles). Nous allons présenter ici les raisons non détaillées dans l'article.

Tout d'abord, le nombre d'individus contre lesquels un chat est cross-matché et le nombre de chats qui sont testés influencent notre capacité à détecter des incompatibilités. Logiquement, plus le nombre de chats inclus dans une étude est grand, plus la capacité d'intégrer des individus avec des anticorps naturels augmente, ceci est d'autant plus vrai pour les anticorps associés à des antigènes de haute fréquence. De plus, plus le nombre d'individus contre lesquels un chat est cross-matché augmente, plus la capacité de détecter des anticorps augmente; ceci est d'autant plus vrai pour les anticorps associés à des antigènes de basse fréquence. Les études précédentes ont intégré entre 20 et 154 chats cross-matchés contre 1 à 3 individus en moyenne.<sup>18, 19, 30, 48, 122, 190, 208</sup> Une seule étude a cross-matché une petite population de 10 chats contre 30 individus.<sup>190</sup> Notre étude comptabilise la plus grande population de chats examinés pour leurs incompatibilités avec 258 chats cross-matchés contre 4 à 6 individus. En théorie, il aurait été idéal de cross-matché tous les chats entre eux (258 x 258). En pratique, ceci était irréalisable puisque la technique exige l'utilisation de globules rouges relativement frais, avec une limite d'âge fixée à sept jours (médiane de 3 jours dans notre étude). Le choix de sept jours a été fait car aucune étude n'a été publiée concernant l'influence de l'âge et des conditions de stockage des globules rouges du chat sur la répétabilité et la fiabilité des résultats des cross-matches. S'il était démontré que des conditions adéquates de stockage des globules rouges sur une plus longue période (par exemple, réfrigérés avec une solution additive) ne modifient pas les résultats des cross-match, il serait plus facile d'organiser des études de compatibilité de plus grande ampleur.

Un autre facteur influençant la prévalence des incompatibilités en dehors du système AB est la localisation géographique. D'une part, la localisation géographique peut jouer sur la présence des allo-anticorps naturels. En effet, comme expliqué dans le chapitre II, les allo-anticorps naturels se développent vraisemblablement par exposition à des épitopes présents dans l'environnement et de structure similaire à celle des antigènes érythrocytaires. Un environnement différent peut donc influencer la production d'anticorps naturels par les chats. D'autre part, la localisation géographique peut influencer la prévalence des antigènes érythrocytaires. Ce point a été illustré dans le chapitre II lors de la présentation de l'épidémiologie du système AB chez le chat, avec notamment le tableau 9 qui montre les grandes variations dans la distribution des groupes A, B et AB en fonction des pays. Ces variations dans la distribution des groupes sanguins en fonction de la localisation géographique ne sont pas spécifiques au chat puisqu'elles sont également décrites en médecine humaine, et ont été rapportées chez le chien avec le groupe sanguin Dal.<sup>271</sup> Différentes hypothèses sont avancées pour expliquer ces variations géographiques : effet fondateur, dérive génétique, sélection naturelle favorisant les sujets porteurs de certains antigènes.<sup>272</sup> En médecine humaine, les antigènes ABO sont la cible de nombreux agents infectieux. Ces antigènes ont été associés à une résistance ou susceptibilité à certaines maladies ; par exemple l'antigène O semble associé à des formes moins sévères de paludisme. Les antigènes ABO conditionnent également la présence d'anticorps naturels dont le rôle anti-infectieux a été évoqué.<sup>272</sup> Aucune étude ne s'est intéressée à l'association entre les antigènes et anticorps naturels du système AB du chat et une résistance ou susceptibilité aux maladies. Dans notre étude la présence d'anticorps naturels n'était pas associée au statut sain ou malade des chats, mais d'autres études pourraient s'intéresser à une possible corrélation entre des maladies infectieuses (par exemple mycoplasmoses ou bartonelloses) et les antigènes érythrocytaires/anticorps naturels.

La deuxième partie de notre étude s'est intéressée aux antigènes érythrocytaires contre lesquels les anticorps naturels, détectés chez les chats de groupe A, réagissent. En utilisant sept allo-anticorps naturels, nous avons identifié au moins cinq antigènes érythrocytaires félines probablement différents que nous avons choisi de nommer de FEA 1 à FEA 5 (FEA, *feline erythrocyte antigens*). Ces FEA sont indépendants du système AB. En effet, notre article a inclus uniquement des chats de groupe A pour faciliter l'interprétation des résultats de cross-match et de typage, et s'affranchir des réactions engendrées par la présence d'anticorps anti-A et anti-B. Au cours de notre étude, trois chats de type AB et neuf chats de type B ont toutefois été typés pour certains FEA, et les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous (tableau 18).

Tableau 18. – **Résultat du typage sanguin extensif pour trois chats AB et neuf chats B et comparaison aux résultats obtenus chez les chats A**

Groupe sanguin dans le système	Nombre de chats	Statut				
		FEA 1	FEA 2	FEA 3	FEA 4	FEA 5
<b>AB</b>						
<b>AB</b>	1	+	-	ND	ND	ND
<b>AB</b>	1	+	-	-	-	ND
<b>AB</b>	1	+	-	ND	+	+
<b>B</b>	4	+	ND	ND	ND	ND
<b>B</b>	1	+	-	ND	ND	ND
<b>B</b>	1	+	-	+	+	ND
<b>B</b>	2	+	-	+	-	+
<b>B</b>	1	+	+	-	+	+
<b>Fréquence chez les chats A (%)</b>	258	83.7	9.6	18.2	57-75	96

*+ : statut positif (présence de l'antigène) ; - : statut négatif (absence de l'antigène); ND : données non disponibles*

La distribution des différents FEA est variable chez les chats de groupe AB et B, et sans pouvoir tirer de conclusion au vu du faible nombre de chats typés, les fréquences des différents FEA chez ces 12 chats se rapprochent de celles rapportées chez les 258 chats de groupe A. Ces résultats montrent que les FEA 1 à 5 sont indépendants du système AB. Des études incluant les chats B et AB seraient nécessaires dans le futur pour obtenir des fréquences globales des différents FEA.

Cette étude a intégré essentiellement des chats domestiques avec seulement 31 chats de race. Les fréquences des cinq FEA pourraient être variables en fonction des différentes races, comme ce qui est observé avec le système AB. D'autres études seront nécessaires sur un plus grand échantillon de chats et avec un plus grand nombre de chats par race pour juger de l'épidémiologie des nouveaux FEA identifiés. De plus, des analyses de pedigree seront indispensables pour décrire le mode d'héritabilité de chaque FEA.

Enfin, le point essentiel relié à la découverte de ces nouveaux antigènes érythrocytaires et de leurs allo-anticorps naturels consiste en leur potentiel impact clinique lors d'une transfusion. Pour rappel, l'importance clinique des antigènes érythrocytaires repose sur leur capacité à réagir avec des anticorps naturels ou des anticorps acquis pouvant entraîner des réactions hémolytiques transfusionnelles ou des INF.

Les allo-anticorps naturels reliés aux cinq FEA ont probablement un impact clinique faible à modéré. En effet, si ces allo-anticorps naturels entraînaient des réactions hémolytiques aiguës sévères et fréquentes, ils auraient été étudiés avant aujourd'hui, comme les antigènes du groupe sanguin AB qui ont été étudiés dès les années 1950. De plus, les réactions hémolytiques aiguës sont liées aux titres en anticorps et, bien que le titre minimal nécessaire pour entraîner une hémolyse intravasculaire ne soit pas connu, les titres des anticorps naturels associés aux cinq FEA de notre étude étaient faibles à modérés (< 1 : 32). Ces titres sont proches des titres rapportés pour les anticorps anti-B des chats de groupe A. Des hémolyses extravasculaires retardées sont donc probablement plus fréquentes lorsqu'une transfusion incompatible a lieu chez un chat possédant des anticorps naturels anti-FEA (1 à 5), comme lors d'une transfusion de sang B chez un chat de type A possédant des anticorps anti-B. Ce type de réaction transfusionnelle diminue la durée de vie des globules rouges transfusés et peut passer cliniquement inaperçue. Cependant, il est important de noter que les titres en anticorps naturels peuvent varier entre individus et des titres plus élevés pourraient être observés chez certains sujets et conduire à des réactions hémolytiques aiguës. Ainsi, une réaction hémolytique aiguë a été décrite chez un chat Mik négatif (possiblement FEA 1 négatif) ayant des anticorps naturels anti-Mik et transfusé avec du sang d'un chat Mik positif.<sup>199</sup> Récemment, une clinique vétérinaire aux États-Unis nous a contacté pour un de leur patient félin qui avait présenté une réaction hémolytique aiguë suite à une première transfusion malgré une compatibilité dans le système AB. Des cross-matches post-transfusion montraient des incompatibilités avec tous les donneurs testés. Le sang du chat nous a été envoyé afin de réaliser un typage extensif. Le chat était FEA 1 négatif et possédait probablement des anticorps naturels anti-FEA 1 qui ont conduit à la réaction hémolytique aiguë observée au cours de sa première transfusion. Le chat a ensuite été transfusé avec du sang FEA 1 négatif et n'a pas démontré de réaction hémolytique aiguë. Ce type de réactions aiguës associées à des anticorps naturels dirigés contre des antigènes extérieurs au système AB semblent rares. Comme mentionné dans l'article, le seul moyen de documenter les conséquences de la présence d'allo-anticorps naturels serait de transfuser un chat qui possède des allo-anticorps naturels avec des érythrocytes exprimant l'antigène correspondant. Pour des raisons éthiques évidentes, ce type d'expérience n'est pas réalisée. Par contre, la surveillance de toute réaction hémolytique aiguë ou retardée non expliquée par le système AB est primordiale et doit mener à la réalisation d'un typage extensif du chat ayant présenté la réaction.

Les allo-anticorps acquis sont produits environ 7 à 10 jours après l'exposition à un antigène érythrocytaire chez un individu ne possédant pas cet antigène ni les anticorps naturels correspondants (allo-immunisation). Le chat est alors dit sensibilisé et peut développer une réaction immunitaire lors de toute exposition ultérieure à cet antigène. La capacité d'un antigène érythrocytaire a entraîné la production

d'anticorps est appelée immunogénicité. Cette immunogénicité pourrait être étudiée en transfusant un chat ne possédant pas un antigène (typage négatif) ni d'anticorps naturels détectables *in vitro*, avec des globules rouges exprimant l'antigène. L'intervalle de temps nécessaire pour être capable de détecter des anticorps post-transfusion, leur titre et la durée pendant laquelle ces anticorps sont détectables serait des informations essentielles pour comprendre l'importance de ces différents FEA dans les phénomènes d'allo-immunisation post-transfusion.

Deux études ont montré que 16 à 25 % des chats démontraient des incompatibilités après leur première transfusion.<sup>19, 48</sup> Des études rétrospectives en médecine humaine rapportent que moins de 1 à 3 % de la population générale développent des anticorps post-transfusion. Cependant, chez les patients multi-transfusés, les phénomènes d'allo-immunisation sont rapportés chez 10 à 60 % des patients.<sup>273</sup> De telles données ne sont pas disponibles chez les chats multi-transfusés et nécessitent une investigation. L'utilisation clinique de multiples transfusions en médecine féline est amenée à croître en parallèle de l'accessibilité aux produits sanguins félins et du développement de nouvelles modalités thérapeutiques telles que l'hémodialyse. Dans ce contexte, la réalisation d'un typage extensif a toute son importance, pour limiter le développement d'incompatibilités qui pourraient diminuer les chances de trouver un donneur et parfois conduire à des impasses thérapeutiques. Une étude en médecine humaine a ainsi montré que la réalisation d'un typage extensif permettait de diminuer l'incidence des allo-immunisations de 33.9 % à 17.5 % chez les patients multi-transfusés.<sup>273</sup> Des études seront nécessaires pour démontrer l'intérêt d'un typage extensif comparativement au seul typage AB chez le chat en général et chez les chats multi-transfusés.

Face à un patient félin pour lequel aucun donneur compatible ne peut être trouvé, une xéno-transfusion, c'est-à-dire la transfusion de sang d'une autre espèce (habituellement de chien), est envisagée par certains vétérinaires. Cette pratique n'est pas encouragée car, bien qu'une amélioration transitoire de l'état général des chats soit décrite par plusieurs auteurs, une hémolyse retardée et une élimination rapide des globules rouges canins dans les six premiers jours suivant la transfusion sont observées. Des réactions anaphylactiques fatales ont été décrites après des xéno-transfusions répétées.<sup>200, 274-277</sup> Une étude récente a également démontré que 74.8 % des chats présentaient des anticorps naturels dirigés contre des antigènes exprimés à la surface des globules rouges de chien, détectés à 37°C.<sup>278</sup> Considérant ce pourcentage élevé d'incompatibilités inter-espèce, une xéno-transfusion n'apporterait pas de bénéfice dans une situation où du sang compatible est recherché.

La découverte de ces cinq nouveaux antigènes érythrocytaires ouvre la voie à de nombreux projets de recherche, tout comme la définition du système AB en 1981 a débouché sur une multitude de publications. Il est cependant important de noter que les sujets de recherche qui pourraient être réalisés sur les nouveaux FEA dépendent de notre capacité à typer les chats pour ces FEA, et donc dépendent actuellement de la disponibilité des anticorps naturels. Ce point est un frein majeur à la recherche en médecine transfusionnelle, et des solutions de typage plus durable que des anticorps naturels sont nécessaires (stockage d'anticorps acquis par allo-immunisation, et idéalement production d'anticorps monoclonaux).

## Conclusion

L'objectif des transfusions est d'améliorer et souvent de sauver la vie de l'animal. La transfusion doit donc rester un acte sécuritaire, aussi bien pour le donneur que pour le receveur. Dans cette optique, notre travail s'est intéressé à promouvoir la sécurité de la médecine transfusionnelle féline en traitant deux aspects différents : l'optimisation de la collecte de sang chez le chat et la découverte de nouveaux antigènes érythrocytaires félins.

Tout d'abord, nous avons fabriqué un système de prélèvement de sang fermé, comparable en termes de facilité d'utilisation et de qualité du produit sanguin à notre ancien système ouvert. Ce système fermé autorise le stockage du sang pendant plusieurs semaines. Un prélèvement du donneur par du personnel expérimenté peut donc être planifié à l'avance, ce qui augmente la sécurité pour le donneur. De plus l'utilisation du système fermé autorise la transformation du sang entier en différents produits sanguins pour s'adapter au mieux aux besoins des patients, et augmenter ainsi la sécurité pour le receveur.

Ensuite, nous nous sommes intéressés aux antigènes érythrocytaires indépendants du système AB à l'origine d'incompatibilités mises en évidence par la réalisation de cross-matches sur colonne de gel. Nous avons documenté l'existence d'au moins cinq antigènes érythrocytaires différents, pouvant être associés à la présence d'allo-anticorps naturels. Bien que ces antigènes soient à l'origine de réactions incompatibles *in vitro*, leur importance et leur pouvoir immunogène *in vivo* restent à déterminer. Une meilleure compréhension des phénomènes d'allo-immunisation et d'incompatibilité sanguine liés à ces nouveaux FEA et à leurs allo-anticorps correspondants permettra d'augmenter la sécurité du receveur lors d'une transfusion sanguine.

## Références bibliographiques

1. Yagi K and Holowaychuk MK. *Manual of veterinary transfusion medicine and blood banking*. 1st ed. 2016.
2. Wardrop KJ, Birkenheuer A, Blais MC, et al. Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 15-35. 2016/01/26. DOI: 10.1111/jvim.13823.
3. Howard A, Callan B, Sweeney M, et al. Transfusion practices and costs in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 201: 1697-1701. 1992/12/01.
4. Jagodich TA and Holowaychuk MK. Transfusion practice in dogs and cats: an Internet-based survey. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2016; 26: 360-372. 2016/01/28. DOI: 10.1111/vec.12451.
5. Kisielewicz C and Self IA. Canine and feline blood transfusions: controversies and recent advances in administration practices. *Vet Anaesth Analg* 2014; 41: 233-242. 2014/03/01. DOI: 10.1111/vaa.12135.
6. Chiaramonte D. Blood-component therapy: selection, administration and monitoring. *Clin Tech Small Anim Pract* 2004; 19: 63-67. 2004/06/08. DOI: 10.1053/j.ctsap.2004.01.003.
7. Nilsson L, Hedner U, Nilsson IM, et al. Shelf-life of bank blood and stored plasma with special reference to coagulation factors. *Transfusion* 1983; 23: 377-381. 1983/09/01. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1983.23584018713.x.
8. Nolte I and Mischke R. Investigations of platelet aggregation and platelet counts from stored canine whole blood. *Res Vet Sci* 1995; 58: 190-192. 1995/03/01. DOI: 10.1016/0034-5288(95)90076-4.
9. Tsuchiya R, Yagura H, Hachiya Y, et al. Aggregability and post-transfusion survival of canine platelets in stored whole blood. *J Vet Med Sci* 2003; 65: 825-829. 2003/09/03. DOI: 10.1292/jvms.65.825.
10. Jobes D, Wolfe Y, O'Neill D, et al. Toward a definition of "fresh" whole blood: an in vitro characterization of coagulation properties in refrigerated whole blood for transfusion. *Transfusion* 2011; 51: 43-51. 2010/07/29. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02772.x.

11. Pidcoke HF, McFaul SJ, Ramasubramanian AK, et al. Primary hemostatic capacity of whole blood: a comprehensive analysis of pathogen reduction and refrigeration effects over time. *Transfusion* 2013; 53 Suppl 1: 137S-149S. 2013/01/18. DOI: 10.1111/trf.12048.
12. Repine TB, Perkins JG, Kauvar DS, et al. The use of fresh whole blood in massive transfusion. *J Trauma* 2006; 60: S59-69. 2006/06/10. DOI: 10.1097/01.ta.0000219013.64168.b2.
13. Cotton BA, Podbielski J, Camp E, et al. A randomized controlled pilot trial of modified whole blood versus component therapy in severely injured patients requiring large volume transfusions. *Ann Surg* 2013; 258: 527-532; discussion 532-523. 2013/08/28. DOI: 10.1097/SLA.0b013e3182a4ffa0.
14. Davidow B. Transfusion medicine in small animals. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2013; 43: 735-756. 2013/06/12. DOI: 10.1016/j.cvsm.2013.03.007.
15. Lucas RL, Lentz KD and Hale AS. Collection and preparation of blood products. *Clin Tech Small Anim Pract* 2004; 19: 55-62. 2004/06/08. DOI: 10.1053/j.ctsap.2004.01.007.
16. Castellanos I, Couto CG and Gray TL. Clinical use of blood products in cats: a retrospective study (1997--2000). *J Vet Intern Med* 2004; 18: 529-532. 2004/08/24. DOI: 10.1892/0891-6640(2004)18<529:cuobpi>2.0.co;2.
17. Martinez-Sogues L, Blois SL, Manzanilla EG, et al. Exploration of risk factors for non-survival and for transfusion-associated complications in cats receiving red cell transfusions: 450 cases (2009 to 2017). *J Small Anim Pract* 2020; 61: 177-184. 2020/03/03. DOI: 10.1111/jsap.13108.
18. Sylvane B, Prittie J, Hohenhaus AE, et al. Effect of cross-match on packed cell volume after transfusion of packed red blood cells in transfusion-naive anemic cats. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 1077-1083. 2018/03/25. DOI: 10.1111/jvim.15120.
19. McClosky ME, Cimino Brown D, Weinstein NM, et al. Prevalence of naturally occurring non-AB blood type incompatibilities in cats and influence of crossmatch on transfusion outcomes. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 1934-1942. 2018/10/12. DOI: 10.1111/jvim.15334.
20. Roux FA, Deschamps JY, Blais MC, et al. Multiple red cell transfusions in 27 cats (2003-2006): indications, complications and outcomes. *J Feline Med Surg* 2008; 10: 213-218. 2008/05/03. DOI: 10.1016/j.jfms.2007.09.005.
21. Blasi Brugue C, Ferreira RRF, Mesa Sanchez I, et al. In vitro quality control analysis after processing and during storage of feline packed red blood cells units. *BMC Vet Res* 2018; 14: 141. 2018/04/28. DOI: 10.1186/s12917-018-1458-4.

22. Wardrop KJ and Brooks MB. Stability of hemostatic proteins in canine fresh frozen plasma units. *Vet Clin Pathol* 2001; 30: 91-95. 2002/05/25. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2001.tb00264.x.
23. O'Neill EM, Rowley J, Hansson-Wicher M, et al. Effect of 24-hour whole-blood storage on plasma clotting factors. *Transfusion* 1999; 39: 488-491.
24. Cardigan R, Van der Meer PF, Pergande C, et al. Coagulation factor content of plasma produced from whole blood stored for 24 hours at ambient temperature: results from an international multicenter BEST Collaborative study. *Transfusion* 2011; 51 Suppl 1: 50S-57S. 2011/01/28. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02963.x.
25. Walton JE, Hale AS, Brooks MB, et al. Coagulation factor and hemostatic protein content of canine plasma after storage of whole blood at ambient temperature. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 571-575. 2014/01/29. DOI: 10.1111/jvim.12277.
26. Urban R, Guillermo Couto C and Iazbik MC. Evaluation of hemostatic activity of canine frozen plasma for transfusion by thromboelastography. *J Vet Intern Med* 2013; 27: 964-969. 2013/05/15. DOI: 10.1111/jvim.12097.
27. Roback JD, Caldwell S, Carson J, et al. Evidence-based practice guidelines for plasma transfusion. *Transfusion* 2010; 50: 1227-1239. 2010/03/30. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02632.x.
28. Wong MP, Droubatchevskaia N, Chipperfield KM, et al. Guidelines for frozen plasma transfusion. *British Columbia Medical Journal* 2007; 49: 311-319.
29. Snow SJ, Ari Jutkowitz L and Brown AJ. Trends in plasma transfusion at a veterinary teaching hospital: 308 patients (1996-1998 and 2006-2008). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2010; 20: 441-445. 2010/08/25. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2010.00557.x.
30. Weingart C, Giger U and Kohn B. Whole blood transfusions in 91 cats: a clinical evaluation. *J Feline Med Surg* 2004; 6: 139-148. 2004/05/12. DOI: 10.1016/j.jfms.2004.01.005.
31. Korman RM, Hetzel N, Knowles TG, et al. A retrospective study of 180 anaemic cats: features, aetiologies and survival data. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 81-90. 2012/09/20. DOI: 10.1177/1098612X12461008.
32. Klaser DA, Reine NJ and Hohenhaus AE. Red blood cell transfusions in cats: 126 cases (1999). *J Am Vet Med Assoc* 2005; 226: 920-923. 2005/03/25. DOI: 10.2460/javma.2005.226.920.
33. Prittie JE. Triggers for use, optimal dosing, and problems associated with red cell transfusions. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003; 33: 1261-1275. 2003/12/11. DOI: 10.1016/s0195-5616(03)00093-7.

34. Hebert PC, Wells G, Blajchman MA, et al. A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. Transfusion Requirements in Critical Care Investigators, Canadian Critical Care Trials Group. *N Engl J Med* 1999; 340: 409-417. 1999/02/11. DOI: 10.1056/NEJM199902113400601.
35. Carson JL, Terrin ML, Noveck H, et al. Liberal or restrictive transfusion in high-risk patients after hip surgery. *N Engl J Med* 2011; 365: 2453-2462. 2011/12/16. DOI: 10.1056/NEJMoa1012452.
36. Holowaychuk MK, Leader JL and Monteith G. Risk factors for transfusion-associated complications and nonsurvival in dogs receiving packed red blood cell transfusions: 211 cases (2008-2011). *J Am Vet Med Assoc* 2014; 244: 431-437. 2014/02/01. DOI: 10.2460/javma.244.4.431.
37. Maglaras CH, Koenig A, Bedard DL, et al. Retrospective evaluation of the effect of red blood cell product age on occurrence of acute transfusion-related complications in dogs: 210 cases (2010-2012). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2017; 27: 108-120. 2016/09/27. DOI: 10.1111/vec.12530.
38. Langston C, Cook A, Eatroff A, et al. Blood Transfusions in Dogs and Cats Receiving Hemodialysis: 230 Cases (June 1997-September 2012). *J Vet Intern Med* 2017; 31: 402-409. 2017/02/16. DOI: 10.1111/jvim.14658.
39. Mansi ET, Waldrop JE and Davidow EB. Retrospective evaluation of the indications, safety and effects of fresh frozen plasma transfusions in 36 cats (2014-2018). *J Feline Med Surg* 2019; 1098612X19876728. 2019/10/03. DOI: 10.1177/1098612X19876728.
40. Barfield D and Adamantos S. Feline blood transfusions: A pinker shade of pale. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 11-23. 2011/01/11. DOI: 10.1016/j.jfms.2010.11.006.
41. Pennisi MG, Hartmann K, Addie DD, et al. Blood transfusion in cats: ABCD guidelines for minimising risks of infectious iatrogenic complications. *J Feline Med Surg* 2015; 17: 588-593. 2015/06/24. DOI: 10.1177/1098612X15588449.
42. Marenzoni ML, Lauzi S, Miglio A, et al. Comparison of three blood transfusion guidelines applied to 31 feline donors to minimise the risk of transfusion-transmissible infections. *J Feline Med Surg* 2018; 20: 663-673. 2017/08/26. DOI: 10.1177/1098612X17727233.
43. Cote E, Manning AM, Emerson D, et al. Assessment of the prevalence of heart murmurs in overtly healthy cats. *J Am Vet Med Assoc* 2004; 225: 384-388. 2004/08/27. DOI: 10.2460/javma.2004.225.384.

44. Nakamura RK, Rishniw M, King MK, et al. Prevalence of echocardiographic evidence of cardiac disease in apparently healthy cats with murmurs. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 266-271. 2011/02/01. DOI: 10.1016/j.jfms.2010.12.007.
45. Paige CF, Abbott JA, Elvinger F, et al. Prevalence of cardiomyopathy in apparently healthy cats. *J Am Vet Med Assoc* 2009; 234: 1398-1403. 2009/06/02. DOI: 10.2460/javma.234.11.1398.
46. Wardrop KJ, Reine N, Birkenheuer A, et al. Canine and feline blood donor screening for infectious disease. *J Vet Intern Med* 2005; 19: 135-142. 2005/02/18.
47. Spada E, Perego R, Baggiani L, et al. Haematological and morphological evaluation of feline whole blood units collected for transfusion purposes. *J Feline Med Surg* 2019; 21: 732-740. 2018/09/19. DOI: 10.1177/1098612X18798841.
48. Hourani L, Weingart C and Kohn B. Alloimmunisation in transfused patients: serial cross-matching in a population of hospitalised cats. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 1231-1237. 2017/01/20. DOI: 10.1177/1098612X16688574.
49. Reed N, Espadas I, Lalor SM, et al. Assessment of five formulae to predict post-transfusion packed cell volume in cats. *J Feline Med Surg* 2014; 16: 651-656. 2014/01/08. DOI: 10.1177/1098612X13517254.
50. Spada E, Proverbio D, Baggiani L, et al. Change in haematological and selected biochemical parameters measured in feline blood donors and feline whole blood donated units. *J Feline Med Surg* 2017; 19: 375-381. 2016/02/05. DOI: 10.1177/1098612X16628919.
51. Crestani C, Stefani A, Carminato A, et al. In vitro assessment of quality of citrate-phosphate-dextrose-adenine-1 preserved feline blood collected by a commercial closed system. *J Vet Intern Med* 2018; 32: 1051-1059. 2018/04/11. DOI: 10.1111/jvim.15056.
52. Iazbik MC, Gomez Ochoa P, Westendorf N, et al. Effects of blood collection for transfusion on arterial blood pressure, heart rate, and PCV in cats. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 1181-1184. 2008/01/17. DOI: 10.1892/06-287.1.
53. Spada E, Proverbio D, Bagnagatti De Giorgi G, et al. Clinical and haematological responses of feline blood donors anaesthetised with a tiletamine and zolazepam combination. *J Feline Med Surg* 2015; 17: 338-341. 2014/07/13. DOI: 10.1177/1098612X14542452.
54. Doolin KS, Chan DL, Adamantos S, et al. Retrospective evaluation of unexpected events during collection of blood donations performed with and without sedation in cats (2010-2013). *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2017; 27: 555-560. 2017/08/11. DOI: 10.1111/vec.12643.

55. Volpato J, Mattoso CR, Beier SL, et al. Sedative, hematologic and hemostatic effects of dexmedetomidine-butorphanol alone or in combination with ketamine in cats. *J Feline Med Surg* 2015; 17: 500-506. 2014/09/14. DOI: 10.1177/1098612X14549214.
56. Troyer HL, Feeman WG, Gray TL, et al. Comparing chemical restraint and anesthetic protocols used for blood donation in cats: one teaching hospital's experience. *Vet Med* 2005; 100: 652-658.
57. Killos MB, Graham LF and Lee J. Comparison of two anesthetic protocols for feline blood donation. *Vet Anaesth Analg* 2010; 37: 230-239. 2010/05/12. DOI: 10.1111/j.1467-2995.2010.00527.x.
58. Reese SL, Zekas LJ, Iazbik MC, et al. Effect of sevoflurane anesthesia and blood donation on the sonographic appearance of the spleen in 60 healthy cats. *Vet Radiol Ultrasound* 2013; 54: 168-175. 2012/10/16. DOI: 10.1111/j.1740-8261.2012.01990.x.
59. Biermann K, Hungerbuhler S, Mischke R, et al. Sedative, cardiovascular, haematologic and biochemical effects of four different drug combinations administered intramuscularly in cats. *Vet Anaesth Analg* 2012; 39: 137-150. 2012/02/24. DOI: 10.1111/j.1467-2995.2011.00699.x.
60. Conner BJ, Hanel RM, Hansen BD, et al. Effects of acepromazine maleate on platelet function assessed by use of adenosine diphosphate activated- and arachidonic acid- activated modified thromboelastography in healthy dogs. *Am J Vet Res* 2012; 73: 595-601. 2012/04/27. DOI: 10.2460/ajvr.73.5.595.
61. Glowaski MM and Wetmore LA. Propofol: application in veterinary sedation and anesthesia. *Clin Tech Small Anim Pract* 1999; 14: 1-9. 1999/04/08. DOI: 10.1016/S1096-2867(99)80021-8.
62. Rodan I, Sundahl E, Carney H, et al. AAEP and ISFM feline-friendly handling guidelines. *J Feline Med Surg* 2011; 13: 364-375. 2011/04/26. DOI: 10.1016/j.jfms.2011.03.012.
63. Gibbon KJ, Cyborski JM, Guzinski MV, et al. Evaluation of adverse effects of EMLA (lidocaine/prilocaine) cream for the placement of jugular catheters in healthy cats. *J Vet Pharmacol Ther* 2003; 26: 439-441. 2004/02/14. DOI: 10.1046/j.0140-7783.2003.00536.x.
64. Wagner KA, Gibbon KJ, Strom TL, et al. Adverse effects of EMLA (lidocaine/prilocaine) cream and efficacy for the placement of jugular catheters in hospitalized cats. *J Feline Med Surg* 2006; 8: 141-144. 2005/12/28. DOI: 10.1016/j.jfms.2005.10.002.

65. Conversy B, Blais MC, Carioto L, et al. Comparison of gravity collection versus suction collection for transfusion purposes in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 2013; 49: 301-307. 2013/07/19. DOI: 10.5326/JAAHA-MS-5917.
66. Newman B. Arm complications after manual whole blood donation and their impact. *Transfus Med Rev* 2013; 27: 44-49. 2012/06/12. DOI: 10.1016/j.tmr.2012.05.002.
67. Wardrop KJ. Selection of anticoagulant-preservatives for canine and feline blood storage. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995; 25: 1263-1276. 1995/11/01. DOI: 10.1016/s0195-5616(95)50153-6.
68. Bunn HF. Evolution of mammalian hemoglobin function. *Blood* 1981; 58: 189-197. 1981/08/01.
69. Beutler E and West C. The storage of hard-packed red blood cells in citrate-phosphate-dextrose (CPD) and CPD-adenine (CPDA-1). *Blood* 1979; 54: 280-284. 1979/07/01.
70. Wardrop KJ, Owen TJ and Meyers KM. Evaluation of an additive solution for preservation of canine red blood cells. *J Vet Intern Med* 1994; 8: 253-257. 1994/07/01. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1994.tb03228.x.
71. Wardrop KJ, Tucker RL and Mugnai K. Evaluation of canine red blood cells stored in a saline, adenine, and glucose solution for 35 days. *J Vet Intern Med* 1997; 11: 5-8. 1997/01/01. DOI: 10.1111/j.1939-1676.1997.tb00065.x.
72. Lacerda LA, Hlavac NR, Terra SR, et al. Effects of four additive solutions on canine leukoreduced red cell concentrate quality during storage. *Vet Clin Pathol* 2014; 43: 362-370. 2014/08/20. DOI: 10.1111/vcp.12163.
73. Heinz JA, Pashmakova MB, Wilson CR, et al. Biochemical evaluation of the effects of storage on feline erythrocytes. *J Small Anim Pract* 2016; 57: 637-643. 2016/10/27. DOI: 10.1111/jsap.12585.
74. *American Association of Blood Banks Standards for blood banks and transfusion services*. 31st ed. Bethesda, Maryland 2018.
75. Ramirez-Arcos S, Perkins H, Kou Y, et al. Bacterial growth in red blood cell units exposed to uncontrolled temperatures: challenging the 30-minute rule. *Vox Sang* 2013; 105: 100-107. 2013/02/13. DOI: 10.1111/vox.12027.
76. Perry HE, Prasad P, Kirwan S, et al. Core temperature changes in resuspended red blood cells (RBCs) and pediatric RBCs removed from refrigerated storage. *Transfusion* 2010; 50: 174-177. 2009/09/26. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02384.x.

77. Ramirez-Arcos S, Mastronardi C, Perkins H, et al. Evaluating the 4-hour and 30-minute rules: effects of room temperature exposure on red blood cell quality and bacterial growth. *Transfusion* 2013; 53: 851-859. 2012/08/01. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2012.03807.x.
78. Aplin K, Pitt T, Allen J, et al. Extending the 30-minute rule for red cell units - investigation of the bacterial risk of 60-minute exposures to ambient temperature. *Vox Sang* 2019; 114: 189-197. 2019/03/06. DOI: 10.1111/vox.12747.
79. Brunskill S, Thomas S, Whitmore E, et al. What is the maximum time that a unit of red blood cells can be safely left out of controlled temperature storage? *Transfus Med Rev* 2012; 26: 209-223 e203. 2011/11/29. DOI: 10.1016/j.tmr.2011.09.005.
80. Marion RS and Smith JE. Posttransfusion viability of feline erythrocytes stored in acid-citrate-dextrose solution. *J Am Vet Med Assoc* 1983; 183: 1459-1460. 1983/12/15.
81. Wardrop KJ, Tucker RL and Anderson EP. Use of an in vitro biotinylation technique for determination of posttransfusion viability of stored canine packed red blood cells. *Am J Vet Res* 1998; 59: 397-400. 1998/05/01.
82. Novinger MS, Sullivan PS and McDonald TP. Determination of the lifespan of erythrocytes from greyhounds, using an in vitro biotinylation technique. *Am J Vet Res* 1996; 57: 739-742. 1996/05/01.
83. Garon CL, Cohn LA and Scott MA. Erythrocyte survival time in Greyhounds as assessed by use of in vivo biotinylation. *Am J Vet Res* 2010; 71: 1033-1038. 2010/09/03. DOI: 10.2460/ajvr.71.9.1033.
84. Mock DM, Widness JA, Veng-Pedersen P, et al. Measurement of posttransfusion red cell survival with the biotin label. *Transfus Med Rev* 2014; 28: 114-125. 2014/06/28. DOI: 10.1016/j.tmr.2014.03.003.
85. Heikes BW and Ruau CG. Effect of syringe and aggregate filter administration on survival of transfused autologous fresh feline red blood cells. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2014; 24: 162-167. 2013/11/15. DOI: 10.1111/vec.12115.
86. Wong C and Haskins SC. The effect of storage on the P50 of feline blood. *J Vet Emerg Crit Care* 2007; 17: 32-36.
87. Cummings KA, Abelson AL, Rozanski EA, et al. The effect of storage on ammonia, cytokine, and chemokine concentrations in feline whole blood. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2016; 26: 639-645. 2016/07/23. DOI: 10.1111/vec.12510.

88. Heaton WA. Evaluation of posttransfusion recovery and survival of transfused red cells. *Transfus Med Rev* 1992; 6: 153-169. 1992/07/01. DOI: 10.1016/s0887-7963(92)70166-7.
89. van der Meer PF and Pietersz RN. Overnight storage of whole blood: a comparison of two designs of butane-1,4-diol cooling plates. *Transfusion* 2007; 47: 2038-2043. 2007/10/26. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01427.x.
90. Brecher ME and Hay SN. Bacterial contamination of blood components. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 195-204. 2005/01/18. DOI: 10.1128/CMR.18.1.195-204.2005.
91. Kim DM, Brecher ME, Bland LA, et al. Visual identification of bacterially contaminated red cells. *Transfusion* 1992; 32: 221-225. 1992/03/01. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1992.32392213804.x.
92. Kessler RJ, Rankin S, Young S, et al. Pseudomonas fluorescens contamination of a feline packed red blood cell unit and studies of canine units. *Vet Clin Pathol* 2010; 39: 29-38. 2009/10/22. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2009.00190.x.
93. Hassan RM, El Enany MG and Rizk HH. Evaluation of broad-range 16S rRNA PCR for the diagnosis of bloodstream infections: two years of experience. *J Infect Dev Ctries* 2014; 8: 1252-1258. 2014/10/15. DOI: 10.3855/jidc.4867.
94. Su G, Fu Z, Hu L, et al. 16S Ribosomal Ribonucleic Acid Gene Polymerase Chain Reaction in the Diagnosis of Bloodstream Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 2015; 10: e0127195. 2015/05/23. DOI: 10.1371/journal.pone.0127195.
95. Kuehnert MJ, Roth VR, Haley NR, et al. Transfusion-transmitted bacterial infection in the United States, 1998 through 2000. *Transfusion* 2001; 41: 1493-1499. 2002/01/05. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2001.41121493.x.
96. Hall KK and Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 788-802. 2006/10/17. DOI: 10.1128/CMR.00062-05.
97. Stefanetti V, Miglio A, Cappelli K, et al. Detection of bacterial contamination and DNA quantification in stored blood units in 2 veterinary hospital blood banks. *Vet Clin Pathol* 2016; 45: 406-410. 2016/09/20. DOI: 10.1111/vcp.12372.
98. Hohenhaus AE, Drusin LM and Garvey MS. Serratia marcescens contamination of feline whole blood in a hospital blood bank. *J Am Vet Med Assoc* 1997; 210: 794-798. 1997/03/15.
99. Spada E, Proverbio D, Martino PA, et al. Ammonia concentration and bacterial evaluation of feline whole blood and packed red blood cell units stored for transfusion. *International journal of Health, Animal science and Food safety* 2014; 1: 15-23.

100. Bucheler J and Cotter SM. Storage of feline and canine whole blood in CPDA-1 and determination of the post-transfusion viability. *JVIM* 1994; 8: 172.
101. Weltman JG, Fletcher DJ and Rogers C. Influence of cross-match on posttransfusion packed cell volume in feline packed red blood cell transfusion. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2014; 24: 429-436. 2014/07/22. DOI: 10.1111/vec.12204.
102. Patterson J, Rousseau A, Kessler RJ, et al. In vitro lysis and acute transfusion reactions with hemolysis caused by inappropriate storage of canine red blood cell products. *J Vet Intern Med* 2011; 25: 927-933. 2011/05/28. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2011.0737.x.
103. Gauvin F, Spinella PC, Lacroix J, et al. Association between length of storage of transfused red blood cells and multiple organ dysfunction syndrome in pediatric intensive care patients. *Transfusion* 2010; 50: 1902-1913. 2010/05/12. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02661.x.
104. Sparrow RL. Red blood cell storage duration and trauma. *Transfus Med Rev* 2015; 29: 120-126. 2015/01/13. DOI: 10.1016/j.tmr.2014.09.007.
105. Shah A, Brunskill SJ, Desborough MJ, et al. Transfusion of red blood cells stored for shorter versus longer duration for all conditions. *Cochrane Database Syst Rev* 2018; 12: CD010801. 2018/12/24. DOI: 10.1002/14651858.CD010801.pub3.
106. Spinella PC, Tucci M, Fergusson DA, et al. Effect of Fresh vs Standard-issue Red Blood Cell Transfusions on Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Critically Ill Pediatric Patients: A Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2019; 322: 2179-2190. 2019/12/11. DOI: 10.1001/jama.2019.17478.
107. Hann L, Brown DC, King LG, et al. Effect of duration of packed red blood cell storage on morbidity and mortality in dogs after transfusion: 3,095 cases (2001-2010). *J Vet Intern Med* 2014; 28: 1830-1837. 2014/10/15. DOI: 10.1111/jvim.12430.
108. Tizard I. *Veterinary Immunology*. 9th ed. 2012, p.568.
109. Ingebrigtsen R. The Influence of Isoagglutinins on the Final Results of Homoplastic Transplantations of Arteries. *J Exp Med* 1912; 16: 169-177. 1912/08/01. DOI: 10.1084/jem.16.2.169.
110. Ottenberg R and Thalhimer W. Studies in experimental Transfusion. *J Med Res* 1915; 33: 213-229. 1915/11/01.
111. Holmes R. Blood groups in cats. *J Physiol* 1950; 111: 61p. 1950/10/16.
112. Holmes R. The occurrence of blood groups in cats. *J Exper Biol* 1953; 30: 350-357.

113. Eyquem A, Podliachouk L and Millot P. Blood groups in chimpanzees, horses, sheep, pigs, and other mammals. *Ann N Y Acad Sci* 1962; 97: 320-328. 1962/05/03. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1962.tb34646.x.
114. Auer L and Bell K. The AB blood group system of cats. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 1981; 12: 287-297. 1981/01/01. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1981.tb01561.x.
115. Giger U, Bucheler J and Patterson DF. Frequency and inheritance of A and B blood types in feline breeds of the United States. *J Hered* 1991; 82: 15-20. 1991/01/01. DOI: 10.1093/jhered/82.1.15.
116. Griot-Wenk ME, Callan MB, Casal ML, et al. Blood type AB in the feline AB blood group system. *Am J Vet Res* 1996; 57: 1438-1442. 1996/10/01.
117. Bighignoli B, Niini T, Grahn RA, et al. Cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase (CMAH) mutations associated with the domestic cat AB blood group. *BMC Genet* 2007; 8: 27. 2007/06/08. DOI: 10.1186/1471-2156-8-27.
118. Weingart C, Arndt G and Kohn B. Prevalence of feline blood types A, B and AB in non-pedigree and purebred cats in Berlin and Brandenburg. *Kleintierpraxis* 2006; 51: 189-197.
119. Giger U, Gorman NT and Hubler M. Frequencies of feline type A and type B blood types in Europe. *Anim Genet* 1992; 23 (suppl 1): 17-18.
120. Knottenbelt CM, Addie DD, Day MJ, et al. Determination of the prevalence of feline blood types in the UK. *J Small Anim Pract* 1999; 40: 115-118. 1999/04/14. DOI: 10.1111/j.1748-5827.1999.tb03051.x.
121. Forcada Y, Guitian J and Gibson G. Frequencies of feline blood types at a referral hospital in the south east of England. *J Small Anim Pract* 2007; 48: 570-573. 2007/07/05. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2007.00325.x.
122. Tasker S, Barker EN, Day MJ, et al. Feline blood genotyping versus phenotyping, and detection of non-AB blood type incompatibilities in UK cats. *J Small Anim Pract* 2014; 55: 185-189. 2014/04/05. DOI: 10.1111/jsap.12180.
123. Jacomet L, Montoro A, Rivero MM, et al. Frequency of different blood groups in cats in Buenos Aires. *Rev de Med Vet (B Aires)* 1997; 78: 428-431.
124. Malik R, Griffin DL, White JD, et al. The prevalence of feline A/B blood types in the Sydney region. *Aust Vet J* 2005; 83: 38-44. 2005/06/24. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2005.tb12190.x.

125. Leidinger L, Leidinger E and Giger U. Verteilung und Bedeutung der Blutgruppen A und B bei Haus- und Rassekatzen in Österreich [Distribution and significance of blood groups A and B in domestic and purebred cats in Austria.]. *Wiener tierärztliche monatsschrift* 1993; 80: 10-14.
126. Medeiros MA, Soares AM, Alviano DS, et al. Frequencies of feline blood types in the Rio de Janeiro area of Brazil. *Vet Clin Pathol* 2008; 37: 272-276. 2008/09/03. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2008.00051.x.
127. Fosset FT and Blais MC. Prevalence of feline blood groups in the Montreal area of Quebec, Canada. *Can Vet J* 2014; 55: 1225-1228. 2014/01/02.
128. McDermott FM, Maloney S, McMillan C, et al. The Prevalence of Blood Groups in Domestic Cats in the Saskatoon and Calgary Areas of Saskatchewan and Alberta, Canada. *Front Vet Sci* 2020; 7: 160. 2020/05/07. DOI: 10.3389/fvets.2020.00160.
129. Zheng L, Zhong Y, Shi Z, et al. Frequencies of blood types A, B, and AB in non-pedigree domestic cats in Beijing. *Vet Clin Pathol* 2011; 40: 513-517. 2011/11/19. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00371.x.
130. Jensen AL, Olesen AB and Arnbjerg J. Distribution of feline blood types detected in the Copenhagen area of Denmark. *Acta Vet Scand* 1994; 35: 121-124. 1994/01/01.
131. Ruiz de Gopegui R, Velasquez M and Espada Y. Survey of feline blood types in the Barcelona area of Spain. *Vet Rec* 2004; 154: 794-795. 2004/07/06. DOI: 10.1136/vr.154.25.794.
132. Vieira SM, Ferreira RRF, de Matos AJ, et al. Distribution of feline AB blood types: a review of frequencies and its implications in the Iberian Peninsula. *JFMS Open Rep* 2017; 3: 2055116917727693. 2017/10/05. DOI: 10.1177/2055116917727693.
133. Giger U, Kilrain CG, Filippich LJ, et al. Frequencies of feline blood groups in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 1989; 195: 1230-1232. 1989/11/01.
134. Giger U, Griot-Wenk M, Bucheler J, et al. Geographical variation of the feline blood type frequencies in the United States. *Feline Pract* 1991; 19: 21-27.
135. Barrot AC, Buttin R, Linsart A, et al. Frequency of feline blood types in non-pedigree cats in France. *Revue Méd Vet* 2017; 168: 235-240.
136. Nectoux A, Guidetti M, Barthelemy A, et al. Assessment of risks of feline mismatched transfusion and neonatal isoerythrolysis in the Lyon (France) area. *JFMS Open Rep* 2019; 5: 2055116919863175. 2019/08/07. DOI: 10.1177/2055116919863175.

137. Mylonakis ME, Koutinas AF, Saridomichelakis M, et al. Determination of the prevalence of blood types in the non-pedigree feline population in Greece. *Vet Rec* 2001; 149: 213-214. 2001/09/11. DOI: 10.1136/vr.149.7.213.
138. Bagdi N, Magdus M, Leidinger E, et al. Frequencies of feline blood types in Hungary. *Acta Vet Hung* 2001; 49: 369-375. 2002/04/11. DOI: 10.1556/004.49.2001.4.1.
139. Silvestre-Ferreira AC, Pastor J, Sousa AP, et al. Blood types in the non-pedigree cat population of Gran Canaria. *Vet Rec* 2004; 155: 778-779. 2005/01/11.
140. Juvet F, Brennan S and Mooney CT. Assessment of feline blood for transfusion purposes in the Dublin area of Ireland. *Vet Rec* 2011; 168: 352. 2011/04/19. DOI: 10.1136/vr.c6879.
141. Merbl Y, Hason A, Sethon ED, et al. A Survey of Feline Ab Group Blood types in Israel (2007 to 2009). *Israel Journal of Veterinary Medicine* 2011; 66: 21-28.
142. 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. *Vet Clin Pathol* 2011; 40: 32-39. 2011/02/09. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00286.x.
143. 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. *Vet Med Int* 2014; 2014: 704836. 2014/04/24. DOI: 10.1155/2014/704836.
144. Ejima H, Kurokawa K and Ikemoto S. Feline red blood cell groups detected by naturally occurring isoantibody. *Nihon Juigaku Zasshi* 1986; 48: 971-976. 1986/10/01. DOI: 10.1292/jvms1939.48.971.
145. Cattin RP. Distribution of blood types in a sample of 245 New Zealand non-purebred cats. *N Z Vet J* 2016; 64: 154-157. 2015/11/06. DOI: 10.1080/00480169.2015.1112313.
146. Silvestre-Ferreira AC, Pastor J, Almeida O, et al. Frequencies of feline blood types in northern Portugal. *Vet Clin Pathol* 2004; 33: 240-243. 2004/12/01. DOI: 10.1111/j.1939-165x.2004.tb00380.x.
147. Marques C, Ferreira M, Gomes JF, et al. Frequency of blood type A, B, and AB in 515 domestic shorthair cats from the Lisbon area. *Vet Clin Pathol* 2011; 40: 185-187. 2011/03/26. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00303.x.
148. Gurkan M, Arikan S, Ozaytekin E, et al. Titres of alloantibodies against A and B blood types in non-pedigree domestic cats in Turkey: assessing the transfusion reaction risk. *J Feline Med Surg* 2005; 7: 301-305. 2005/05/26. DOI: 10.1016/j.jfms.2005.03.003.

149. Arikan S, Gurkan M, Ozaytekin E, et al. Frequencies of blood type A, B and AB in non-pedigree domestic cats in Turkey. *J Small Anim Pract* 2006; 47: 10-13. 2006/01/19. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2006.00005.x.
150. Hubler M, Arnold S and Casal M. Die Blutgruppenverteilung bei den Hauskatzen in der Schweiz. *Schweiz Arch Tierheilkol* 1993; 135: 231-235.
151. Sköld S. Förekomst av blodgrupp B hos huskatter i Sverige. Sveriges lantbruksuniversitet. [The presence of blood group B in domestic cats in Sweden].
152. Barrs VR, Giger U, Wilson B, et al. Erythrocytic pyruvate kinase deficiency and AB blood types in Australian Abyssinian and Somali cats. *Aust Vet J* 2009; 87: 39-44. 2009/01/31. DOI: 10.1111/j.1751-0813.2008.00381.x.
153. Arikan S, Duru SY, Gurkan M, et al. Blood type A and B frequencies in Turkish Van and Angora cats in Turkey. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2003; 50: 303-306. 2003/07/31. DOI: 10.1046/j.1439-0442.2003.00536.x.
154. Gunn-Moore DA, Simpson KE and Day MJ. Blood types in Bengal cats in the UK. *J Feline Med Surg* 2009; 11: 826-828. 2009/05/09. DOI: 10.1016/j.jfms.2009.03.008.
155. Proverbio D, Spada E, Perego R, et al. Assessment of blood types of Ragdoll cats for transfusion purposes. *Vet Clin Pathol* 2013; 42: 157-162. 2013/05/10. DOI: 10.1111/vcp.12048.
156. Arikan S and Akkan HA. Titres of naturally occurring alloantibodies against feline blood group antigens in Turkish Van cats. *J Small Anim Pract* 2004; 45: 289-292. 2004/06/23. DOI: 10.1111/j.1748-5827.2004.tb00237.x.
157. Hamanaka S, Handa S, Inoue J, et al. Occurrence of hematoside with two moles of N-acetyl-neuraminic acid in a certain breed of Persian cat. *J Biochem* 1979; 86: 695-698. 1979/09/01. DOI: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a132573.
158. Butler M, Andrews G and Smith JE. Reactivity of lectins with feline erythrocytes. *Comparative Haematology International* 1991; 1: 217-219.
159. Butler M, Andrews G, Smith JE, et al. Thin layer chromatography of erythrocyte membrane glycolipids from type A and type B cats. *Comparative Haematology International* 1991; 1: 196-199.
160. Andrews GA, Chavey PS, Smith JE, et al. N-glycolylneuraminic acid and N-acetylneuraminic acid define feline blood group A and B antigens. *Blood* 1992; 79: 2485-2491. 1992/05/01.

161. Griot-Wenk M, Pahlsson P, Chisholm-Chait A, et al. Biochemical characterization of the feline AB blood group system. *Anim Genet* 1993; 24: 401-407. 1993/12/01. DOI: 10.1111/j.1365-2052.1993.tb00352.x.
162. Green JL, Andrews GA and Wyatt CR. Phenotypic differences within the AB blood type of the feline AB blood group system. *Comp Clin Pathol* 2005; 14: 138-145.
163. Muchmore EA, Milewski M, Varki A, et al. Biosynthesis of N-glycolyneuraminic acid. The primary site of hydroxylation of N-acetylneuraminic acid is the cytosolic sugar nucleotide pool. *J Biol Chem* 1989; 264: 20216-20223. 1989/12/05.
164. Omi T, Nakazawa S, Udagawa C, et al. Molecular Characterization of the Cytidine Monophosphate-N-Acetylneuraminic Acid Hydroxylase (CMAH) Gene Associated with the Feline AB Blood Group System. *PLoS One* 2016; 11: e0165000. 2016/10/19. DOI: 10.1371/journal.pone.0165000.
165. Irie A, Koyama S, Kozutsumi Y, et al. The molecular basis for the absence of N-glycolyneuraminic acid in humans. *J Biol Chem* 1998; 273: 15866-15871. 1998/06/23. DOI: 10.1074/jbc.273.25.15866.
166. Gandolfi B, Grahn RA, Gustafson NA, et al. A Novel Variant in CMAH Is Associated with Blood Type AB in Ragdoll Cats. *PLoS One* 2016; 11: e0154973. 2016/05/14. DOI: 10.1371/journal.pone.0154973.
167. Kehl A, Heimberger K, Langbein-Detsch I, et al. Molecular characterization of blood type A, B, and C (AB) in domestic cats and a CMAH genotyping scheme. *PLoS One* 2018; 13: e0204287. 2018/09/21. DOI: 10.1371/journal.pone.0204287.
168. Kehl A, Mueller E and Giger U. CMAH genotyping survey for blood types A, B and C (AB) in purpose-bred cats. *Anim Genet* 2019; 50: 303-306. 2019/03/12. DOI: 10.1111/age.12778.
169. Zaremba R, Brooks A and Thomovsky E. Transfusion Medicine: An Update on Antigens, Antibodies and Serologic Testing in Dogs and Cats. *Top Companion Anim Med* 2019; 34: 36-46. 2019/02/28. DOI: 10.1053/j.tcam.2018.12.005.
170. Knottenbelt CM. The feline AB blood group system and its importance in transfusion medicine. *J Feline Med Surg* 2002; 4: 69-76. 2002/05/25. DOI: 10.1053/jfms.2001.0162.
171. Combs MR, Denomme G, Grossman BJ, et al. Immunology. In: Brecher ME (ed) *Technical manual*. 15th ed., 2005, pp.243-269.
172. Flegel WA. Pathogenesis and mechanisms of antibody-mediated hemolysis. *Transfusion* 2015; 55 Suppl 2: S47-58. 2015/07/16. DOI: 10.1111/trf.13147.

173. Bucheler J and Giger U. Alloantibodies against A and B blood types in cats. *Vet Immunol Immunopathol* 1993; 38: 283-295. 1993/10/01. DOI: 10.1016/0165-2427(93)90088-I.
174. Knottenbelt CM, Day MJ, Cripps PJ, et al. Measurement of titres of naturally occurring alloantibodies against feline blood group antigens in the UK. *J Small Anim Pract* 1999; 40: 365-370. 1999/09/07. DOI: 10.1111/j.1748-5827.1999.tb03101.x.
175. Wilkerson MJ, Meyers KM and Wardrop KJ. Anti-A isoagglutinins in two blood type B cats are IgG and IgM. *Vet Clin Pathol* 1991; 20: 10-14. 1991/01/01. DOI: 10.1111/j.1939-165x.1991.tb00561.x.
176. Andrews GA, Chavey PS and Smith JE. Production, characterization, and applications of a murine monoclonal antibody to dog erythrocyte antigen 1.1. *J Am Vet Med Assoc* 1992; 201: 1549-1552. 1992/11/15.
177. Kohler G and Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975; 256: 495-497. 1975/08/07. DOI: 10.1038/256495a0.
178. Saeed AF, Wang R, Ling S, et al. Antibody Engineering for Pursuing a Healthier Future. *Front Microbiol* 2017; 8: 495. 2017/04/13. DOI: 10.3389/fmicb.2017.00495.
179. Green JL, Chavey PS, Smith JE, et al. Production and Characterisation of Murine Monoclonal Antibodies to Feline Erythrocyte A and B Antigens. *Comparative Haematology International* 2000; 10: 30-37.
180. Stieger K, Palos H and Giger U. Comparison of various blood-typing methods for the feline AB blood group system. *Am J Vet Res* 2005; 66: 1393-1399. 2005/09/22. DOI: 10.2460/ajvr.2005.66.1393.
181. Seth M, Jackson KV and Giger U. Comparison of five blood-typing methods for the feline AB blood group system. *Am J Vet Res* 2011; 72: 203-209. 2011/02/02. DOI: 10.2460/ajvr.72.2.203.
182. Spada E, Proverbio D, Baggiani L, et al. Evaluation of an immunochromatographic test for feline AB system blood typing. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2016; 26: 137-141. 2015/08/13. DOI: 10.1111/vec.12360.
183. Hourani L, Weingart C and Kohn B. Evaluation of a novel feline AB blood typing device. *J Feline Med Surg* 2014; 16: 826-831. 2014/02/13. DOI: 10.1177/1098612X14522052.
184. Acierno MM, Raj K and Giger U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analyzed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. *J Vet Intern Med* 2014; 28: 592-598. 2014/03/13. DOI: 10.1111/jvim.12321.

185. Lucidi CA, Takahira RK, Gerlach JA, et al. Flow cytometric assessment of canine erythrocytes and platelets for dog erythrocyte antigen 1.1. *Vet Clin Pathol* 2011; 40: 435-443. 2011/12/06. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2011.00374.x.
186. Guidetti M, Goy-Thollot I, Boisvineau C, et al. Alloimmunization of a dog erythrocyte antigen 1- dog transfused with weakly dog erythrocyte antigen 1+ blood. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 2037-2045. 2019/07/31. DOI: 10.1111/jvim.15565.
187. Polak K, Acierno MM, Raj K, et al. Dog erythrocyte antigen 1: mode of inheritance and initial characterization. *Vet Clin Pathol* 2015; 44: 369-379. 2015/08/21. DOI: 10.1111/vcp.12284.
188. Roback JD, Barclay S and Hillyer CD. An automatable format for accurate immunohematology testing by flow cytometry. *Transfusion* 2003; 43: 918-927. 2003/06/26. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2003.t01-1-00433.x.
189. Roback JD, Barclay S and Hillyer CD. Improved method for fluorescence cytometric immunohematology testing. *Transfusion* 2004; 44: 187-196. 2004/02/14. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2004.00640.x.
190. Goy-Thollot I, Nectoux A, Guidetti M, et al. 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: 588-595. 2018/12/18. DOI: 10.1111/jvim.15381.
191. Niggemeier A, Haberstroh HF, Nelson VE, et al. An accidental transfusion of a type A kitten with type B blood causes a transient switch from blood type A to B. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 214-216. 2000/04/20.
192. Koenig A, Maglaras CH and Giger U. Acute hemolytic reaction due to A-B mismatched transfusion in a cat with transient AB blood type. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2020; 30: 325-330. 2020/03/07. DOI: 10.1111/vec.12937.
193. Vap LM, Harr KE, Arnold JE, et al. ASVCP quality assurance guidelines: control of preanalytical and analytical factors for hematology for mammalian and nonmammalian species, hemostasis, and crossmatching in veterinary laboratories. *Vet Clin Pathol* 2012; 41: 8-17. 2012/03/07. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2012.00413.x.
194. Denesiuk L and Clarke G. Use of red blood cells stored in saline suspension for immediate spin crossmatch. *Lab Hematol* 2006; 12: 156-159. 2006/09/05. DOI: 10.1532/LH96.06019.

195. Harris M, Nolen-Walston R, Ashton W, et al. Effect of sample storage on blood crossmatching in horses. *J Vet Intern Med* 2012; 26: 662-667. 2012/03/31. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2012.00913.x.
196. Tocci LJ and Ewing PJ. Increasing patient safety in veterinary transfusion medicine: an overview of pretransfusion testing. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2009; 19: 66-73. 2009/08/21. DOI: 10.1111/j.1476-4431.2009.00387.x.
197. Lapiere Y, Rigal D, Adam J, et al. The gel test: a new way to detect red cell antigen-antibody reactions. *Transfusion* 1990; 30: 109-113. 1990/02/01. DOI: 10.1046/j.1537-2995.1990.30290162894.x.
198. Cid J, Nogues N, Montero R, et al. Comparison of three microtube column agglutination systems for antibody screening: DG Gel, DiaMed-ID and Ortho BioVue. *Transfus Med* 2006; 16: 131-136. 2006/04/21. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2006.00655.x.
199. Weinstein NM, Blais MC, Harris K, et al. A newly recognized blood group in domestic shorthair cats: the Mik red cell antigen. *J Vet Intern Med* 2007; 21: 287-292. 2007/04/13. DOI: 10.1892/0891-6640(2007)21[287:anrbgi]2.0.co;2.
200. Euler CC, Raj K, Mizukami K, et al. Xenotransfusion of anemic cats with blood compatibility issues: pre- and posttransfusion laboratory diagnostic and crossmatching studies. *Vet Clin Pathol* 2016; 45: 244-253. 2016/06/01. DOI: 10.1111/vcp.12366.
201. Euler CC, Lee JH, Kim HY, et al. Survey of Two New (Kai 1 and Kai 2) and Other Blood Groups in Dogs of North America. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 1642-1647. 2016/09/15. DOI: 10.1111/jvim.14572.
202. Luethy D, Owens SD, Stefanovski D, et al. Comparison of Tube, Gel, and Immunochromatographic Strip Methods for Evaluation of Blood Transfusion Compatibility in Horses. *J Vet Intern Med* 2016; 30: 1864-1871. 2016/10/23. DOI: 10.1111/jvim.14604.
203. Casenave P, Leclere M, Beauchamp G, et al. Modified stall-side crossmatch for transfusions in horses. *J Vet Intern Med* 2019; 33: 1775-1783. 2019/05/19. DOI: 10.1111/jvim.15519.
204. Goulet S and Blais MC. Characterization of Anti- Dal Alloantibodies Following Sensitization of Two Dal-Negative Dogs. *Vet Pathol* 2018; 55: 108-115. 2017/01/28. DOI: 10.1177/0300985816688746.
205. Novaretti MC, Silveira EJ, Filho EC, et al. Comparison of tube and gel techniques for antibody identification. *Immunohematology* 2000; 16: 138-141. 2004/09/18.

206. Novaretti MC, Jens E, Pagliarini T, et al. Comparison of conventional tube test technique and gel microcolumn assay for direct antiglobulin test: a large study. *J Clin Lab Anal* 2004; 18: 255-258. 2004/09/10. DOI: 10.1002/jcla.20033.
207. Villarnovo D, Burton SA, Horney BS, et al. Preliminary evaluation of a gel tube agglutination major cross-match method in dogs. *Vet Clin Pathol* 2016; 45: 411-416. 2016/07/06. DOI: 10.1111/vcp.12374.
208. Humm KR and Chan DL. Prospective evaluation of the utility of cross-matching prior to first transfusion in cats: 101 cases. *J Small Anim Pract* 2020 2020/03/07. DOI: 10.1111/jsap.13124.
209. Cain GR and Suzuki Y. Presumptive neonatal isoerythrolysis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1985; 187: 46-48. 1985/07/01.
210. Cave TA, Thompson H, Reid SW, et al. Kitten mortality in the United Kingdom: a retrospective analysis of 274 histopathological examinations (1986 to 2000). *Vet Rec* 2002; 151: 497-501. 2002/11/15. DOI: 10.1136/vr.151.17.497.
211. Silvestre-Ferreira AC and Pastor J. Feline neonatal isoerythrolysis and the importance of feline blood types. *Vet Med Int* 2010; 2010: 753726. 2010/07/16. DOI: 10.4061/2010/753726.
212. Wynn RM and Bjorkman N. Ultrastructure of the feline placental membrane. *Am J Obstet Gynecol* 1968; 102: 34-43. 1968/09/01. DOI: 10.1016/0002-9378(68)90429-8.
213. Claus MA, Levy JK, MacDonald K, et al. Immunoglobulin concentrations in feline colostrum and milk, and the requirement of colostrum for passive transfer of immunity to neonatal kittens. *J Feline Med Surg* 2006; 8: 184-191. 2006/04/08. DOI: 10.1016/j.jfms.2006.01.001.
214. Levy JK, Crawford PC, Collante WR, et al. Use of adult cat serum to correct failure of passive transfer in kittens. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 219: 1401-1405. 2001/11/29. DOI: 10.2460/javma.2001.219.1401.
215. Casal ML, Jezyk PF and Giger U. Transfer of colostrum antibodies from queens to their kittens. *Am J Vet Res* 1996; 57: 1653-1658. 1996/11/01.
216. Giger U and Casal ML. Feline colostrum--friend or foe: maternal antibodies in queens and kittens. *J Reprod Fertil Suppl* 1997; 51: 313-316. 1997/01/01.
217. Bucheler J. Fading kitten syndrome and neonatal isoerythrolysis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1999; 29: 853-870, v. 1999/07/03.
218. Bridle KH and Littlewood JD. Tail tip necrosis in two litters of Birman kittens. *J Small Anim Pract* 1998; 39: 88-89. 1998/03/26. DOI: 10.1111/j.1748-5827.1998.tb03600.x.

219. Jonsson NN, Pullen C and Watson AD. Neonatal isoerythrolysis in Himalayan kittens. *Aust Vet J* 1990; 67: 416-417. 1990/11/01. DOI: 10.1111/j.1751-0813.1990.tb03038.x.
220. Hohenhaus AE. Blood transfusion and blood substitutes. *Fluid, electrolytes and acid-base disorders in small animal practice*. 2006, pp.557-583.
221. Auer L and Bell K. Transfusion reactions in cats due to AB blood group incompatibility. *Res Vet Sci* 1983; 35: 145-152. 1983/09/01.
222. Auer L, Bell K and Coates S. Blood transfusion reactions in the cat. *J Am Vet Med Assoc* 1982; 180: 729-730. 1982/04/01.
223. Giger U and Bucheler J. Transfusion of type-A and type-B blood to cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991; 198: 411-418. 1991/02/01.
224. Marion RS and Smith JE. Survival of erythrocytes after autologous and allogeneic transfusion in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1983; 183: 1437-1439. 1983/12/15.
225. Walter CW. A new technic for collection, storage, and administration of unadulterated whole blood. *Surg Forum* 1950: 483-490. 1950/01/01.
226. Prowse CV, de Korte D, Hess JR, et al. Commercially available blood storage containers. *Vox Sang* 2014; 106: 1-13. 2013/10/10. DOI: 10.1111/vox.12084.
227. Kaufman PM. Supplies for blood transfusions in dogs and cats. *Probl Vet Med* 1992; 4: 582-593. 1992/12/01.
228. Schneider A. Blood components. Collection, processing, and storage. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995; 25: 1245-1261. 1995/11/01. DOI: 10.1016/s0195-5616(95)50152-4.
229. Janatpour KA, Paglieroni TG, Crocker VL, et al. Visual assessment of hemolysis in red blood cell units and segments can be deceptive. *Transfusion* 2004; 44: 984-989. 2004/07/01. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2004.03315.x.
230. Hawkins R. Discrepancy between visual and spectrophotometric assessment of sample haemolysis. *Ann Clin Biochem* 2002; 39: 521-522. 2002/09/14. DOI: 10.1258/000456302320314575.
231. Jaeger B and Reems M. Visual inspection of stored canine blood for hemolysis compared with measured plasma-free hemoglobin to assess suitability for transfusion. *Can Vet J* 2018; 59: 1171-1174. 2018/11/10.
232. Farrell SB, Shelat SG, Kim HC, et al. Alternative method to determine the hematocrit of red blood cell units: a potential use in the apheresis unit. *Transfusion* 2009; 49: 1255-1258. 2009/02/19. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02099.x.

233. Weiskopf RB, Yau R, Sanchez R, et al. Microarray kit analysis of cytokines in blood product units and segments. *Transfusion* 2009; 49: 2269-2275. 2009/06/25. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2009.02274.x.
234. Kurach JD, Hansen AL, Turner TR, et al. Segments from red blood cell units should not be used for quality testing. *Transfusion* 2014; 54: 451-455. 2013/07/10. DOI: 10.1111/trf.12303.
235. Nakamura A, Abe K, Masuya M, et al. Efficiency of diversion of the first aliquot of blood and prestorage leukoreduction for preventing bacterial contamination in red blood cell concentrates assessed using a rapid polymerase chain reaction-based bacterial detection system. *Transfus Med* 2011; 21: 365-370. 2011/12/23. DOI: 10.1111/j.1365-3148.2011.01093.x.
236. Miglio A, Stefanetti V, Antognoni MT, et al. Stored Canine Whole Blood Units: What is the Real Risk of Bacterial Contamination? *J Vet Intern Med* 2016; 30: 1830-1837. 2016/10/14. DOI: 10.1111/jvim.14593.
237. Sykes J and Rankin S. Isolation and identification of aerobic and anaerobic bacteria. In: Saunders E (ed) *Canine and feline infectious diseases*. St Louis, Missouri, 2014.
238. Dreier J, Stormer M and Kleesiek K. Real-time polymerase chain reaction in transfusion medicine: applications for detection of bacterial contamination in blood products. *Transfus Med Rev* 2007; 21: 237-254. 2007/06/19. DOI: 10.1016/j.tmr.2007.03.006.
239. Chakravorty S, Helb D, Burday M, et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods* 2007; 69: 330-339. 2007/03/30. DOI: 10.1016/j.mimet.2007.02.005.
240. Drancourt M, Berger P and Raoult D. Systematic 16S rRNA gene sequencing of atypical clinical isolates identified 27 new bacterial species associated with humans. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 2197-2202. 2004/05/08. DOI: 10.1128/jcm.42.5.2197-2202.2004.
241. Sen K. Rapid identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by the 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1953-1958. 2000/05/02.
242. Rider J and Newton A. Electrochemiluminescent detection of bacteria in blood components. *Transfus Med* 2002; 12: 115-123. 2002/05/02. DOI: 10.1046/j.1365-3148.2002.00364.x.
243. Kunishima S, Inoue C, Kamiya T, et al. Presence of *Propionibacterium acnes* in blood components. *Transfusion* 2001; 41: 1126-1129. 2001/09/12. DOI: 10.1046/j.1537-2995.2001.41091126.x.

244. Turenne CY, Witwicki E, Hoban DJ, et al. Rapid identification of bacteria from positive blood cultures by fluorescence-based PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 513-520. 2000/02/03.
245. Janda JM and Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2761-2764. 2007/07/13. DOI: 10.1128/JCM.01228-07.
246. Petti CA. Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 1108-1114. 2007/03/17. DOI: 10.1086/512818.
247. Boudewijns M, Bakkens JM, Sturm PD, et al. 16S rRNA gene sequencing and the routine clinical microbiology laboratory: a perfect marriage? *J Clin Microbiol* 2006; 44: 3469-3470. 2006/09/07. DOI: 10.1128/JCM.01017-06.
248. Sontakke S, Cadenas MB, Maggi RG, et al. Use of broad range 16S rDNA PCR in clinical microbiology. *J Microbiol Methods* 2009; 76: 217-225. 2008/12/03. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.11.002.
249. Mori Y and Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J Infect Chemother* 2009; 15: 62-69. 2009/04/28. DOI: 10.1007/s10156-009-0669-9.
250. Weile J and Knabbe C. Current applications and future trends of molecular diagnostics in clinical bacteriology. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394: 731-742. 2009/04/21. DOI: 10.1007/s00216-009-2779-8.
251. Hillyer CD, Josephson CD, Blajchman MA, et al. Bacterial contamination of blood components: risks, strategies, and regulation: joint ASH and AABB educational session in transfusion medicine. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2003: 575-589. 2003/11/25. DOI: 10.1182/asheducation-2003.1.575.
252. Walther-Wenke G. Incidence of bacterial transmission and transfusion reactions by blood components. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46: 919-925. 2008/07/09. DOI: 10.1515/CCLM.2008.151.
253. Schrezenmeier H, Walther-Wenke G, Muller TH, et al. Bacterial contamination of platelet concentrates: results of a prospective multicenter study comparing pooled whole blood-derived platelets and apheresis platelets. *Transfusion* 2007; 47: 644-652. 2007/03/27. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2007.01166.x.
254. Murphy WG, Foley M, Doherty C, et al. Screening platelet concentrates for bacterial contamination: low numbers of bacteria and slow growth in contaminated units mandate an

alternative approach to product safety. *Vox Sang* 2008; 95: 13-19. 2008/04/09. DOI: 10.1111/j.1423-0410.2008.01051.x.

255. Walther-Wenke G, Schrezenmeier H, Deitenbeck R, et al. Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical follow-up. *Ann Hematol* 2010; 89: 83-91. 2009/06/02. DOI: 10.1007/s00277-009-0762-2.

256. Blajchman MA, Beckers EA, Dickmeiss E, et al. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfus Med Rev* 2005; 19: 259-272. 2005/10/11. DOI: 10.1016/j.tmr.2005.05.002.

257. Vamvakas EC and Blajchman MA. Transfusion-related mortality: the ongoing risks of allogeneic blood transfusion and the available strategies for their prevention. *Blood* 2009; 113: 3406-3417. 2009/02/04. DOI: 10.1182/blood-2008-10-167643.

258. McDonald CP, Roy A, Mahajan P, et al. Relative values of the interventions of diversion and improved donor-arm disinfection to reduce the bacterial risk from blood transfusion. *Vox Sang* 2004; 86: 178-182. 2004/04/14. DOI: 10.1111/j.0042-9007.2004.00404.x.

259. Lee CK, Ho PL, Chan NK, et al. Impact of donor arm skin disinfection on the bacterial contamination rate of platelet concentrates. *Vox Sang* 2002; 83: 204-208. 2002/10/09. DOI: 10.1046/j.1423-0410.2002.00219.x.

260. Benjamin RJ, Dy B, Warren R, et al. Skin disinfection with a single-step 2% chlorhexidine swab is more effective than a two-step povidone-iodine method in preventing bacterial contamination of apheresis platelets. *Transfusion* 2011; 51: 531-538. 2010/09/24. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2010.02868.x.

261. de Korte D, Marcelis JH, Verhoeven AJ, et al. Diversion of first blood volume results in a reduction of bacterial contamination for whole-blood collections. *Vox Sang* 2002; 83: 13-16. 2002/07/09. DOI: 10.1046/j.1423-0410.2002.00189.x.

262. de Korte D, Curvers J, de Kort WL, et al. Effects of skin disinfection method, deviation bag, and bacterial screening on clinical safety of platelet transfusions in the Netherlands. *Transfusion* 2006; 46: 476-485. 2006/03/15. DOI: 10.1111/j.1537-2995.2006.00746.x.

263. Seghatchian J and de Sousa G. Pathogen-reduction systems for blood components: the current position and future trends. *Transfus Apher Sci* 2006; 35: 189-196. 2006/11/18. DOI: 10.1016/j.transci.2006.10.002.

264. Lozano M, Cid J and Muller TH. Plasma treated with methylene blue and light: clinical efficacy and safety profile. *Transfus Med Rev* 2013; 27: 235-240. 2013/10/01. DOI: 10.1016/j.tmr.2013.08.001.
265. Garraud O and Lozano M. Pathogen inactivation/reduction technologies for platelet transfusion: Where do we stand? *Transfus Clin Biol* 2018; 25: 165-171. 2018/07/26. DOI: 10.1016/j.tracli.2018.07.001.
266. Bekeris LG, Tworek JA, Walsh MK, et al. Trends in blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Tracks study of 356 institutions. *Arch Pathol Lab Med* 2005; 129: 1222-1225. 2005/10/04. DOI: 10.1043/1543-2165(2005)129[1222:TIBCCA]2.0.CO;2.
267. Surdulescu S, Utamsingh D and Shekar R. Phlebotomy teams reduce blood-culture contamination rate and save money. *Clin Perform Qual Health Care* 1998; 6: 60-62. 1998/03/08.
268. Weinbaum FI, Lavie S, Danek M, et al. Doing it right the first time: quality improvement and the contaminant blood culture. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 563-565. 1997/03/01.
269. Self WH, Talbot TR, Paul BR, et al. Cost analysis of strategies to reduce blood culture contamination in the emergency department: sterile collection kits and phlebotomy teams. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2014; 35: 1021-1028. 2014/07/16. DOI: 10.1086/677161.
270. Mitra R, Mishra N and Rath GP. Blood groups systems. *Indian J Anaesth* 2014; 58: 524-528. 2014/12/24. DOI: 10.4103/0019-5049.144645.
271. Goulet S, Giger U, Arsenault J, et al. Prevalence and Mode of Inheritance of the Dal Blood Group in Dogs in North America. *J Vet Intern Med* 2017; 31: 751-758. 2017/04/10. DOI: 10.1111/jvim.14693.
272. Bailly P, Chiaroni C and Roubinet F. *Les groupes sanguins érythrocytaires*. 1 ed. 2015.
273. Makarovska-Bojadzieva T, Velkova E and Blagoevska M. The Impact of Extended Typing On Red Blood Cell Alloimmunization in Transfused Patients. *Open Access Maced J Med Sci* 2017; 5: 107-111. 2017/05/17. DOI: 10.3889/oamjms.2017.054.
274. Clark CH and Kiesel GK. Longevity of Red Blood Cells in Interspecies Transfusion. *J Am Vet Med Assoc* 1963; 143: 400-401. 1963/08/15.
275. Le Gal A, Thomas EK and Humm KR. Xenotransfusion of canine blood to cats: a review of 49 cases and their outcome. *J Small Anim Pract* 2020; 61: 156-162. 2019/12/24. DOI: 10.1111/jsap.13096.

276. Dupont J, Serteyn D and Sandersen C. Life-Threatening Hemorrhage During Patent Ductus Arteriosus Ligation in a Cat: Xenotransfusion With Canine Blood. *Front Vet Sci* 2020; 7: 133. 2020/03/27. DOI: 10.3389/fvets.2020.00133.
277. Bovens C and Gruffydd-Jones T. Xenotransfusion with canine blood in the feline species: review of the literature. *J Feline Med Surg* 2013; 15: 62-67. 2012/09/18. DOI: 10.1177/1098612X12460530.
278. Priolo V, Masucci M, Spada E, et al. Naturally occurring antibodies in cats against dog erythrocyte antigens and vice versa. *J Feline Med Surg* 2018; 20: 690-695. 2017/08/26. DOI: 10.1177/1098612X17727232.