

Université de Montréal

Le groupe sanguin canin *Dal* : prévalence et immunogénicité

par

STÉPHANIE GOULET

Département de sciences cliniques

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire en vue de

l'obtention du grade de maître ès science (M. Sc.)

en sciences vétérinaires option sciences cliniques

Août 2016

©Stéphanie Goulet, 2016

Résumé

L'objectif de cette étude est de déterminer l'importance clinique de l'antigène érythrocytaire canin *Dal*, en investiguant sa prévalence, son mode d'héritabilité et son immunogénicité.

Un total de 1230 chiens a été recruté à travers l'Amérique du Nord et typés pour le *Dal* en utilisant des allo-anticorps polyclonaux et une technique sur colonne de gel. Des individus *Dal*-négatifs ont été identifiés chez les Dalmatiens (n=15/128), Doberman Pinschers (n=183/432), Shih Tzus (n=12/21), chiens de races croisées (3/122), Beagles (2/100), Lhasa Apso (1/3) et Bichon Frisé (1/6). Six donneurs de sang *Dal*-négatifs ont été identifiés, dont 5 Doberman Pinschers (1/228 donneurs d'une autre race). Tous les autres chiens testés étaient *Dal*-positifs (n=418). La rareté du sang *Dal*-négatif place les chiens *Dal*-négatifs à risque d'incompatibilité transfusionnelle lors de transfusions multiples. Cette étude est la première à identifier des individus *Dal*-négatifs chez des chiens de race autre que Dalmatien et à établir le mode d'héritabilité du *Dal*, soit autosomal dominant.

Par la suite, 2 Beagles *Dal*-négatifs ont été sensibilisés spécifiquement pour le *Dal* en recevant une transfusion *Dal*-positif. Suivant la sensibilisation, des allo-anticorps anti-*Dal* ont été détectés à partir du 4^{ième} jour post-transfusion et sont demeurés détectables jusqu'à 2 ans post-transfusion. Les titres d'agglutination maximaux (1:64 et 1:1024) ont été atteints 2 et 1 mois post-transfusion chez le chien #1 et le chien #2, respectivement. Cette étude a confirmé l'immunogénicité du *Dal* tout en ayant généré une quantité considérable d'allo-anticorps anti-*Dal* permettant de futurs typages sanguins *Dal*.

Mots-clés: *Dal*, typage sanguin, antigène érythrocytaire canin, transfusion, colonne de gel, crossmatch

Abstract

The purpose of this study was to determine the clinical importance of the *Dal* canine erythrocyte antigen by investigating its prevalence, its mode of inheritance and its immunogenicity.

A total of 1230 dogs recruited from North America were blood typed for *Dal* applying a gel column technique using polyclonal canine anti-*Dal* sera. *Dal*-negative dogs were identified mostly in Dalmatians (15/128), Dobermans Pinschers (183/432) and Shih Tzus (12/21), and sporadically in mixed breed dogs (3/122), Beagles (2/100), Lhasa Apso (1/6) and Bichon Frise (1/3). All other dogs tested were *Dal*-positive (n= 418). Six *Dal*-negative blood donors were found, including 5 Doberman Pinschers (1/228 non-Dalmatian and non-Doberman Pinscher blood donors). The scarcity of *Dal*-negative blood donors puts *Dal*-negative patient at higher risk of transfusion incompatibility if requiring multiple blood transfusions. This study was the first to identify *Dal*-negative dogs in other breeds than Dalmatians and to establish an autosomal dominant mode of inheritance of the *Dal*-positive phenotype.

Secondly, 2 *Dal*-negative healthy research Beagles were sensitized specifically for *Dal* with a *Dal*-positive packed red blood cell transfusion. Following sensitization, anti-*Dal* alloantibodies were detected as early as 4 days post-transfusion and remained detectable 2 years post-transfusion, with maximum agglutination titers (1:1024 and 1:64) reached respectively 1 and 2 months post-transfusion in dog #2 and dog #1. Our study confirmed the immunogenicity of the *Dal* and allowed banking of a considerable amount of polyclonal antisera for further *Dal* blood typing.

Keywords: *Dal*, blood typing, dog erythrocyte antigen, transfusion, gel column technology, crossmatch

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	iv
Liste des tableaux	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations	x
Remerciements.....	xi
Introduction	1
Recension des écrits : Médecine de transfusion canine.....	3
Groupes sanguins.....	3
DEA 1.....	5
DEA 3.....	7
DEA 4.....	8
DEA 5.....	8
DEA 6.....	9
DEA 7.....	9
DEA 8.....	10
<i>Dal</i>	10
Autres groupes sanguins.....	11
Mode d'héritabilité	11
Immunogénicité.....	13
ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES	14
Allo-anticorps naturels.....	14
Allo-anticorps acquis ou immuns.....	14
Transfusion incompatible	15
Diminution de la survie des globules rouges transfusés	15
Réaction hémolytique aigue à médiation immunitaire	18
Réaction hémolytique retardée à médiation immunitaire.....	21
Caractérisation des allo-anticorps	22

Titre d'agglutination	22
Classe d'immunoglobuline.....	22
PROCÉDURES DE TRANSFUSION SANGUINE	23
Transfusion sanguine	24
Concentré de globules rouges	24
Don de sang	24
Sélection du donneur.....	24
Prélèvement sanguin	26
Conservation.....	27
Compatibilité entre le donneur et le receveur	27
Typage sanguin	28
Tube	29
Colonne de gel	30
Test de compatibilité croisée (Crossmatch)	33
Auto-contrôle.....	34
Majeur.....	34
Mineur	34
Techniques.....	34
RÉACTIONS TRANSFUSIONNELLES ADVERSES	36
Objectifs.....	39
Articles	40
ARTICLE 1	41
Abstract.....	44
Introduction	45
Materials and Methods.....	45
Animals	45
Blood samples.....	46
Dal Blood Typing	47
DEA 1 Blood Typing.....	47
Detection of Dal-alloantibodies	47
Statistical analysis	47

Results.....	48
Breeds and demographics	48
Dal Type Gel Column Technique and Prevalence	49
Dal type in Blood Donors	49
Evaluation for Anti-Dal alloantibodies.....	49
Risk Factor Analysis Related to Dal Type	49
Mode of inheritance	50
Discussion	50
Conclusions	54
References	56
Tables Article 1.....	59
Figure Article 1	63
ARTICLE 2	65
Abstract.....	67
Introduction	67
Materials and Methods.....	69
Animals	69
Pre-sensitization steps.....	69
Sensitization of Dal- dogs.....	70
Persistence of transfused RBC	71
Rate of appearance of alloantibodies and agglutination titers	71
Immunoglobulin class	72
Concordance of Dal blood typing	72
Stability through freezing	73
Results.....	73
Pre-sensitization steps.....	73
Sensitization of Dal- dogs.....	73
Persistence of transfused RBC	73
Rate of appearance of alloantibodies and agglutination titers	74
Immunoglobulin class	74
Concordance of Dal blood typing	74

Stability through freezing	74
Discussion	75
Conclusions	79
References	80
Tables Article 2.....	83
Figures Article 2	84
Discussion générale	86
Conclusion et perspectives	96
Bibliographie.....	98
Annexe	xii

Liste des tableaux

Tableau I. Prévalence des groupes sanguins canins reconnus internationalement chez des chiens de plusieurs races en fonction de la région et de l'année d'étude.	4
Tableau II. Prévalence des groupes sanguins canins reconnus internationalement chez des races précises de lévrier en fonction de la région et de l'année d'étude.	5
Tableau III. Groupes sanguins canins : Prévalence et importance clinique ¹³	5
Tableau IV. Caractéristiques des allo-anticorps anti-DEA 1, 3, 4, 5 et <i>Dal</i> ^{3,8,9}	22
Tableau V. Résumé des réactions transfusionnelles aiguës ^{28,60,61}	37
Tableau VI. Résumé des réactions transfusionnelles retardées ²⁸	38
Tableau VII (Table I, Article 1). Prevalence with 95% confidence intervals (C.I.) of the <i>Dal</i> + blood type in Dalmatians, Doberman Pinschers, and other breeds from various areas of North America.	59
Tableau VIII (Table II, Article 1). Percentage of <i>Dal</i> + dogs in breeds represented by ≥ 20 individuals or in which <i>Dal</i> - dogs identified in North America.....	60
Tableau IX (Table III, Article 1). Descriptive statistics of evaluated risk factors, including sex, age, coat color, DEA 1 status, region, for <i>Dal</i> - status. For each breed, one dog was randomly selected per breeder. For some dogs, the information was not available.	61
Tableau XI (Table IV, Article 1). Proportion of <i>Dal</i> + and <i>Dal</i> - offspring depending on the <i>Dal</i> status of matings (<i>Dal</i> + x <i>Dal</i> +, <i>Dal</i> + x <i>Dal</i> - or <i>Dal</i> - x <i>Dal</i> -).	62
Tableau XII (Table I, Article 2). Laboratory testing performed on several occasion post-transfusion in dog #1 and dog #2.	83
Tableau XIII (Table II, Article 2). <i>Dal</i> typing using serum from dog #1 and serum from dog #2 in parallel with serum from the index dog showing 100% concordant results.....	83
Tableau XIV. Distribution du phénotype <i>Dal</i> parmi les portées de Dalmatians et de Doberman Pinschers.....	89

Liste des figures

Figure 1. Pedigrees de chiens avec différentes combinaisons de DEA 1+ et DEA 1-.....	13
Figure 2. Survie des globules rouges lors d'une première et d'une deuxième transfusion chez le même chien.	16
Figure 3. Survie des globules rouges DEA 1.1 (A ₁) et DEA 1.2 (A ₂) transfusés au même chien DEA 1-négatif préalablement sensibilisé avec des globules rouges DEA 1.1.	17
Figure 4. Survie des globules rouges DEA 3 (B), DEA 4 (C) et DEA 5 (D) transfusés à 3 receveurs préalablement sensibilisés.....	18
Figure 5. Suivi de la température rectale et de l'hématocrite chez un chien ayant développé une réaction hémolytique aigue associée au DEA 1.....	19
Figure 6. Réaction hémolytique aigue post-transfusionnelle causée par un allo-anticorps contre un antigène érythrocytaire fréquent non-caractérisé.....	20
Figure 7. Structure des immunoglobulines érythrocytaires.	23
Figure 8. Systèmes de prélèvement sanguin lors d'un don de sang.	27
Figure 9. Dispositifs de typage sanguin DEA 1 disponibles commercialement.	29
Figure 10. Typage sanguin par technique en tube.	30
Figure 11. Matériel nécessaire à la technique sur colonne de gel.	31
Figure 12. Microtube contenant une chambre de réaction et une colonne de gel dextran-acrylamide.	32
Figure 13. Interprétation du typage sanguin sur colonne de gel.	32
Figure 14. Typage sanguin <i>Dal</i> utilisant un anticorps polyclonal et les globules rouges de 5 chiens. ...	33
Figure 15 Test de compatibilité croisée (crossmatch) sur tube de gel.	35
Figure 16 (Figure 1, Article 1). <i>Dal</i> blood typing results using the gel column technology yielded easily interpretable agglutination reactions, with either no (grade 0) or strongly positive agglutination reactions (3+ or 4+). Dog 1, 2, 4, 5 and 6 are <i>Dal</i> + and Dog 3 is <i>Dal</i> -.	63
Figure 17 (Figure 2, Article 1). Pedigree analysis of the <i>Dal</i> phenotype in Dalmatian (A) and Doberman Pinscher families (B-H).....	64
Figure 18 (Figure 1, Article 2). Example of agglutination titer (1:16) with a two-fold serum dilution and known <i>Dal</i> + RBC. Fresh serum from dog #1 at 5 months post-transfusion.	84
Figure 19 (Figure 2, Article 2). Persistence of transfused RBC in dog #2 assessed by gel column technology in duplicate with anti- <i>Dal</i> reagents on several occasions post-transfusion. No agglutination reaction was detected pre-transfusion (Day 0). A weak agglutination reaction (1+) was detected on Day 1 to 10 and Day 14, but not detected anymore on Day 21.	85
Figure 20 (Figure 3, Article 2). Graph showing agglutination titers post-sensitization in dog#1 and dog #2 over a 1 year period (52 weeks).	85

Liste des abréviations

2-ME	2-mercaptoéthanol
AHMI	Anémie hémolytique à médiation immunitaire
DEA	Dog erythrocyte antigen / Antigène érythrocytaire canin
DTT	Dithiothréitol
ISBT	International Society of Blood Transfusion / Société internationale de transfusion sanguine
IgG	Immunoglobuline de type G
IgM	Immunoglobuline de type M
PBS	Phosphate-buffered saline solution / Solution saline tampon
PCV	Packed cell volume / Hématocrite
TRALI	Transfusion-related acute lung injury / Syndrome respiratoire aigu post-transfusionnel

Remerciements

J'aimerais remercier ma directrice de maîtrise Marie-Claude Blais qui m'a fait confiance pour travailler sur cet important projet dès le début. Elle a fait preuve d'une patience, d'une disponibilité et d'une empathie exemplaire à mon égard. Elle était toujours là pour m'encourager dans les moments les plus difficiles. Elle a contribué à ce que je dépasse mes limites et que j'accomplisse ce que je ne n'aurais jamais cru capable d'accomplir. Elle est plus qu'une directrice de maîtrise pour moi. Merci du fond du cœur!

J'adresse un merci particulier à toute ma famille et à mes amis. Merci Tilou, mon meilleur ami, mon complice de tous les jours et surtout l'amour de ma vie pour ta patience et tes encouragements durant toutes ces années. Merci papa et maman pour votre appui inconditionnel. Merci maman d'être venue chez moi une journée par semaine durant mon été de rédaction pour me cuisiner des petits plats, faire mon ménage et prendre soin de mes fleurs. Merci papa d'être toujours disponible lorsque j'ai un pépin et d'avoir pris soin de Becky, de ma voiture et de mes millions de projets de bricolage et de rénovations. Merci à mes grands-parents d'avoir été les premiers à m'encourager à poursuivre des études aux cycles supérieurs et d'être si fiers de moi. Merci à mes amies Catherine, Emmanuelle, Lee-Zian, Nadia, Roxane, Sandrine et Valérie pour votre écoute exemplaire, votre générosité et pour la qualité des moments que je passe en votre compagnie. Merci à mes nouvelles collègues de travail pour leur écoute, leur patience et leur souplesse.

Merci à tous, je suis choyée de vous avoir dans ma vie!

Introduction

La médecine de transfusion canine a grandement évolué au cours des soixante dernières années. Les avancements en médecine humaine ont permis de raffiner les techniques de médecine de transfusion chez le chien, en commençant par la collecte de sang du donneur jusqu'à la transfusion sanguine au receveur, mais également au niveau des tests de compatibilité sanguine.

Les premiers groupes sanguins canins ont été découverts en investiguant les allo-anticorps produits suite à des transfusions sanguines expérimentales entre des chiens. De nombreux groupes sanguins ont été identifiés chez le chien.¹⁻⁵ Parmi ceux-ci, 7 sont reconnus internationalement, soit Dog Erythrocyte Antigen (DEA) 1, 3, 4, 5, 6, 7 et 8.⁶ Aujourd'hui encore, les groupes sanguins canins sont différenciés d'après leurs allo-anticorps respectifs.

Le chien ne possède pas d'anticorps naturels d'importance clinique contre les groupes sanguins connus.^{4,7} Ainsi, une première transfusion incompatible n'a généralement pas d'importance clinique, mais celle-ci aura pour effet de sensibiliser l'animal (production d'allo-anticorps immun).^{2,8,9} Une deuxième transfusion incompatible peut quant à elle résulter en une destruction plus ou moins rapide des globules rouges transfusés.⁸ Des réactions hémolytiques aiguës ont été décrites pour DEA 1, DEA 4 et un antigène fréquent non-caractérisé.¹⁰⁻¹²

En 2007, Blais *et al.* ont identifié le groupe sanguin *Dal* suite à un cas d'incompatibilité transfusionnelle chez un Dalmatien, qui s'est avéré être *Dal*-négatif.⁹ Comme pour la majorité des groupes sanguins canins, un individu peut être soit positif (*Dal*+) ou négatif (*Dal*-) pour le *Dal*. Le *Dal* a été associé à la production d'allo-anticorps anti-*Dal*, ce qui peut mener à une transfusion inefficace ou à une réaction hémolytique. Deux autres cas d'incompatibilité transfusionnelle chez des Doberman Pinschers anémiques *Dal*- ont été observés, ce qui a mené à investiguer davantage la prévalence du groupe sanguin chez les Doberman Pinschers.

Lors de sa découverte, il a été spéculé que le *Dal* soit un antigène à haute fréquence^a étant donné sa très haute prévalence au sein de la population canine. La prépondérance des individus *Dal+* engendre une problématique considérable pour les individus *Dal-* ayant besoin de sang compatible de façon répétée.⁹ L'identification de donneurs de sang canins *Dal-* pourrait faciliter l'accès à du sang compatible lors d'un futur cas d'incompatibilité transfusionnelle reliée au *Dal*.

Comme pour une majorité de groupes sanguins canins, le typage sanguin *Dal* est effectué en utilisant un antisérum polyclonal obtenu suite à la sensibilisation d'un individu *Dal-*. Cette quantité de réactif est limitée par la rareté d'un chien *Dal-* pouvant être sensibilisé. Aussi, peu d'informations sont connues concernant la vitesse de production et le titre d'agglutination dans le temps de l'anticorps anti-*Dal* suite à la sensibilisation d'un individu *Dal-*.

Les principaux objectifs de cette étude sont de 1) déterminer la prévalence et le mode d'héritabilité du groupe sanguin *Dal* chez les chiens, notamment les Dalmatiens et les Doberman Pinschers de 2) identifier des donneurs de sang *Dal-* et enfin 3) de sensibiliser des individus *Dal-* afin de mieux caractériser l'allo-anticorps anti-*Dal*, notamment sa vitesse d'apparition, son titre d'agglutination dans le temps et sa classe d'immunoglobuline.

Afin de mettre notre étude en perspective, une revue de littérature sur la médecine de transfusion canine sera d'abord présentée. Ainsi, les principaux groupes sanguins canins seront revus en mettant l'emphase sur leur importance clinique. Ensuite, nous présenterons l'immunogénicité des divers groupes sanguins et les réactions post-transfusionnelles observées. Les procédures de typage sanguin et de transfusions sanguines chez le chien seront enfin discutées. Notre étude prospective sur le groupe sanguin *Dal* comprend deux volets distincts sous forme d'articles: 1) Prévalence et mode d'héritabilité du groupe sanguin *Dal* chez les chiens; 2) Caractérisation des allo-anticorps anti-*Dal* suivant la sensibilisation de 2 chiens *Dal-*. Enfin, une discussion générale précédera la conclusion de cet ouvrage.

^a Selon la Société internationale de transfusion sanguine (ISBT) en médecine humaine, pour être considéré à haute fréquence, un antigène doit respecter les critères suivants : 1- avoir une incidence de > 90% dans la plupart des populations testées, 2- être distinct des autres antigènes à haute fréquence et 3- être manquant chez minimum 2 enfants issus de mêmes parents, donc le phénotype négatif est transmis génétiquement.

Recension des écrits : Médecine de transfusion canine

Groupes sanguins

Les groupes sanguins canins sont des antigènes (glycoprotéines ou glycolipides) présents à la surface des globules rouges. Très peu d'information additionnelle est disponible sur leurs propriétés biochimiques ou leurs fonctions. Ils sont décrits principalement d'après leurs allo-anticorps respectifs.¹³

Les groupes sanguins canins sont parmi les premiers à être découverts chez une espèce autre que l'homme. Des anticorps naturels contre certains groupes sanguins canins ont été identifiés, mais une importance clinique n'a pas encore été établie.^{7,13} Vu l'absence d'anticorps naturels d'importance clinique chez le chien, une première transfusion incompatible ne cause généralement pas de signe d'incompatibilité. Dans le passé, la médecine vétérinaire utilisait rarement des transfusions sanguines multiples dans un but thérapeutique. Des expérimentations animales ayant pour but l'avancement de la médecine humaine par le biais de transfusions sanguines multiples et de transplantation d'organes/de moelle osseuse ont suscité l'investigation des groupes sanguins canins et des tests de compatibilité. Les premiers systèmes de groupes sanguins canins ont ainsi été identifiés en investiguant les allo-anticorps produits suite à des transfusions sanguines expérimentales entre des chiens.¹⁻⁴

Les premiers groupes sanguins à être identifiés ont été nommés par des lettres de A à G, sans relation connue avec les systèmes sanguins humains portant les mêmes lettres.⁴ Des études subséquentes ont mené à la découverte de plusieurs autres groupes sanguins dont He et Tr.^{5,8} En 1976, 7 systèmes de groupes sanguins ont été reconnus internationalement et ainsi renommés Dog Erythrocyte Antigens (DEA) 1, 3, 4, 5, 6, 7 et 8.^{6,14} Le **Tableau I** présente un résumé des études de prévalence concernant ces groupes sanguins canins reconnus internationalement en fonction de la région et de l'année d'étude chez des chiens de races variées. D'autres études de prévalence effectuées chez des races précises de lévriers sont présentées dans le **Tableau II**. À noter que les lévriers sont généralement d'excellents donneurs de sang, en raison de leur conformation (minceur et veine jugulaire facilement accessible), de leur bon tempérament et de leur hémocrite élevé par rapport à d'autres races.¹⁵ Ceci explique pourquoi des études de prévalence visant spécifiquement les lévriers ont été effectuées.

Tableau I. Prévalence des groupes sanguins canins reconnus internationalement chez des chiens de plusieurs races en fonction de la région et de l'année d'étude.

Ancienne nomenclature	Groupes sanguins							
	A ₁	A ₂	B	C	D	F	Tr	He
	DEA 1.1	DEA 1.2	DEA 3	DEA 4	DEA 5	DEA 6	DEA 7	DEA 8
DEA 1 ¹⁶								
Région et année								
New York (USA), 1961 ⁴								
Nombre de chiens testés	332	332	867	947	764	165	NT	NT
Pourcentage de chiens positifs	45	19	6	98	22	99		
Michigan (USA), 1971 ⁵								
Nombre de chiens testés	218	218	218	218	218	NT	218	NT
Pourcentage de chiens positifs	45	22	11	99	51		54	
New York (USA), 1972 ¹⁷								
Nombre de chiens testés	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Pourcentage de chiens positifs	40	20	5	98	25	98	45	40
Californie (USA), 1975 ¹⁸								
Nombre de chiens testés	61	99	57	57	57	45	45	NT
Pourcentage de chiens positifs	36	29	10	87	12	67	82	
Pays-Bas, 1976 ⁶								
Nombre de chiens testés	31	12	31	31	31	30	19	29
Pourcentage de chiens positifs	38	4	5	56	8	74	31	17
Japon, 1986 ¹⁹								
Nombre de chiens testés	545	545	448	NT	448	455	NT	NT
Pourcentage de chiens positifs	44	22	24		10	60		
Pennsylvanie (USA), 1993 ¹⁰								
Nombre de chiens testés	224	224	NT	145	NT	NT	145	NT
Pourcentage de chiens positifs	33	7		97			8	
Michigan (USA), 1995 ¹³								
Nombre de chiens testés	NR	NR	NR	NR	NR	NT	NR	NT
Pourcentage de chiens positifs	42	20	6	98	23		45	
Afrique du Sud, 2002 ²⁰								
Nombre de chiens testés	233	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Pourcentage de chiens positifs	47 [†]							
Michigan (USA), 2008 ²¹								
Nombre de chiens testés	9570	9570	9570	9570	9570	NT	9570	NT
Pourcentage de chiens positifs	42	12	7	98	11		20	
Ohio (USA), 2010 ¹⁵								
Nombre de chiens testés	66	46	24	24	20	NT	46	NT
Pourcentage de chiens positifs	61 [†]	0	21	100	20		41	
Pennsylvanie (USA), 2010 ²²								
Nombre de chiens testés	43	NT	75	75	NT	NT	75	NT
Pourcentage de chiens positifs	47 [†]		11	100			23	
Brésil, 2011 ²³								
Nombre de chiens testés	100	100	100	100	100	NT	100	NT
Pourcentage de chiens positifs	61 [†]	22	7	100	9		16	
Portugal, 2011 ²⁴								
Nombre de chiens testés	274	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Pourcentage de chiens positifs	57 [†]							
Turquie, 2011 ²⁵								
Nombre de chiens testés	178	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Pourcentage de chiens positifs	65 [†]							
Prévalence	33-65	0-29	5-24	56-100	8-51	60-99	8-82	17-40

NT : non testé; NR : non-rapporté ; USA : États-Unis d'Amérique

†Études utilisant l'anticorps monoclonal DEA 1

Tableau II. Prévalence des groupes sanguins canins reconnus internationalement chez des races précises de lévrier en fonction de la région et de l'année d'étude.

Ancienne nomenclature	Groupes sanguins							
	A ₁	A ₂	B	C	D	F	Tr	He
Nouvelle nomenclature ⁶	DEA 1.1	DEA 1.2	DEA 3	DEA 4	DEA 5	DEA 6	DEA 7	DEA 8
Race, région et année								
Lévriers anglais* Ohio (USA), 2010 ¹⁵								
Nombre de chiens testés	206	206	113	113	74	NT	206	NT
Pourcentage de chiens positifs	13 [†]	3	25	100	23		30	
Lévriers espagnols Espagne, 2014 ²⁶								
Nombre de chiens testés	206	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Pourcentage de chiens positifs	53 [†]							
Lévriers d'Ibiza Espagne, 2016 ²⁷	DEA 1 ¹⁶							
Nombre de chiens testés	92		NT	92	NT	NT	92	NT
Pourcentage de chiens positifs	75 [†]			99			25	

* Dans cette étude, les lévriers présentaient une prévalence plus faible de DEA 1+ comparé aux autres races.

†Études utilisant l'anticorps monoclonal

Les groupes sanguins sont des marqueurs génétiques dont l'immunogénicité (capacité de produire une réponse immunitaire) et l'importance clinique varient tel que présenté dans le **Tableau III.**²⁸

Tableau III. Groupes sanguins canins : Prévalence et importance clinique¹³

Groupes sanguins	Prévalence (%)	Anticorps naturels	Réactions transfusionnelles post sensibilisation ^b
DEA 1	47-65 ^{20,22,24,25}	Non	Réaction hémolytique aigue
DEA 3	5-24 ^a	Oui	Retardée, perte des globules rouges, sans hémolyse
DEA 4	56-100 ^a	Non	Réaction hémolytique aigue
DEA 5	8-51 ^a	Oui	Retardée, perte des globules rouges, sans hémolyse
DEA 6	60-99 ^a	Non	Inconnu
DEA 7	8-82 ^a	Oui	Retardée, perte des globules rouges, sans hémolyse
DEA 8	17-40 ^a	Non	Inconnu
<i>Dal</i>	81-100 ^{9,22}	Non	Réaction hémolytique aigue ^c

^a Se référer au **Tableau I**

^b À noter que les réactions transfusionnelles n'ont pas été documentées avec les anticorps naturels, mais bien suite à une sensibilisation.

^c Données non-publiées, communication personnelle (Marie-Claude Blais)

DEA 1

Initialement désigné par la lettre A, le système DEA 1 est le plus important cliniquement chez le chien étant donné son immunogénicité bien documentée, sa proportion quasi équivalente d'individus positifs et négatifs et l'existence de plusieurs systèmes de typage

sanguin disponibles commercialement.^{6,10,14,29} Jusqu'à tout récemment, le système DEA 1 était nommé selon ses sous-types : DEA 1.1, DEA 1.2, DEA 1.3 et DEA 1-négatif. Cette nomenclature a été substituée par DEA 1+ et DEA 1-.¹⁶ Voici une revue de littérature chronologique présentant les principales investigations du système DEA 1.

L'étude de Swisher et Young publiée en 1961 montrait que l'antigène A semble exister en différents niveaux de réactivité. L'anticorps anti-A possède des propriétés hémolytiques et/ou agglutinantes et celles-ci étaient très variables d'une réaction à une autre. À l'époque, 2 types d'antigène avaient été identifiés (type A₁ et type A₂) basé sur la réactivité d'un sérum à certains chiens du groupe A (les chiens du groupe A₁) et l'absence de réactivité chez d'autres chiens (A-négatif). L'anticorps anti-A, quant à lui, réagissait à la fois avec les cellules sanguines A₁ et A₂. Au cours de la même étude, 3 chiens de type A₂ ont été sensibilisés avec des globules rouges de type A₁ et l'anticorps produit réagissait avec les globules rouges de type A₁. Des cellules sanguines faiblement positives pour A₂ ont été transfusées à un individu A-négatif à plusieurs reprises pour une période de 1 an et l'immunisation n'a pas réussi. Ainsi, les auteurs ont conclu que l'antigène A₂ est peu réactif et pourrait être très faiblement antigénique.⁴ Selon la nomenclature internationale établie dans les années 1970, les antigènes A₁ et A₂ correspondent respectivement à DEA 1.1 et DEA 1.2.⁶

En 1991, Symons et Bell ont décrit un sous-type de plus au système DEA 1 : DEA 1.3. La théorie génétique qui était proposée est un système de 4 allèles avec l'ordre de dominance suivant : DEA 1.1 > DEA 1.2 > DEA 1.3 > DEA 1-. DEA 1.3 a été décrit seulement en Australie et était commun chez les Bergers Allemands.³⁰

En 1995, Giger *et al.* ont documenté pour la première fois une réaction hémolytique aigüe post-transfusionnelle chez un patient canin dans un contexte clinique.¹⁰ Le patient DEA 1.1-négatif (DEA 1.1-) avait été sensibilisé à DEA 1.1 auparavant via une première transfusion sanguine pour ensuite recevoir 3 ans plus tard une seconde transfusion de sang DEA 1.1-positif (DEA 1.1+). La publication de ce cas clinique a mis l'accent sur l'importance de la compatibilité DEA 1.1 entre le donneur et le receveur avant toute transfusion. Les chiens non typés et les chiens DEA 1.1- devraient recevoir uniquement du sang DEA 1.1-.¹⁰

La production d'un anticorps monoclonal murin immunoglobuline de type M (IgM) anti-DEA 1.1³¹ et la mise en marché de dispositifs de typage sanguin faciles à utiliser^{b,c,d} ont rendu accessible le typage sanguin DEA 1.1 à partir de 1995.²⁹ Plusieurs études de prévalence ont été effectuées dans divers pays et celles-ci ont montré respectivement une prévalence DEA 1+ variant de 47% à 65%^{19,22,24,25} chez des chiens de races variées, tel que présenté précédemment dans le **Tableau III**. En utilisant des techniques d'immunoprécipitation avec ce même anticorps monoclonal anti-DEA 1.1, 2 protéines membranaires de 50 et 200 kD ont été identifiées.³¹

Récemment, la nomenclature DEA 1.1, 1.2, 1.3 et DEA 1- a été substituée par DEA 1+ et DEA 1-. L'analyse de l'antigène DEA 1 par immunochromatographie et cytométrie de flux (utilisant le même anticorps monoclonal décrit précédemment) a montré que l'expression du DEA 1 est un continuum de réactions allant de négatif à fortement positif. Les chiens qui avaient été typés DEA 1.2 seraient en réalité des chiens DEA 1+ avec une faible expression antigénique, plutôt que présentant un épitope morphologiquement différent. Ainsi, tous les allèles du système DEA 1 auraient un épitope similaire reconnu par cet anticorps monoclonal.¹⁶ Le mode d'hérédité est autosomal dominant avec ≥ 4 allèles : DEA 1 négatif, DEA 1 positif (faible, intermédiaire et fort).³²

DEA 3

Ce groupe sanguin est désigné par la lettre B dans l'ancienne nomenclature⁶ et par D₁ dans la littérature japonaise.³³ Dans la population canine générale aux États-Unis, l'incidence est basse, soit seulement 6 à 11% des chiens sont DEA 3-positif (DEA 3+).^{4,5,13,17,18,21} Deux études menées au Japon ont montré que certaines races japonaises comme les Akita, Shikoku, Shiba et races croisées présentent davantage d'individus DEA 3+. Au contraire, les races dont l'origine n'est pas japonaise, étaient majoritairement DEA 3-négatif (DEA 3-).^{19,34} Parmi 122 Labrador Retrievers testés en Australie, tous étaient DEA 3-.³⁵ Dans une récente étude aux États-Unis, 25% des Greyhounds testés (n=113) étaient DEA 3+.¹⁵

^b RapidVet – (Canine 1.1) test, DMS Laboratories, Flemington, New Jersey, USA

^c ID-Gel-Test Canine DEA 1.1, DiaMed Microtyping System, Cressier-sur-Morat, Switzerland

^d Quick Test DEA 1.1, Alvedia, Lyon, France

Des anticorps naturellement préformés anti-DEA 3 ont été identifiés chez 2% des chiens DEA 3-.⁴ Lors d'une transfusion expérimentale de sang DEA 3+ à un chien DEA 3- préalablement sensibilisé, une séquestration et une destruction des globules rouges a été observée dans les 5 jours suivant la transfusion.⁴ Étant donné la vitesse de perte de globules rouges, ce type de réaction post-transfusionnelle retardée est seulement significative si la capacité de produire des globules rouges du receveur est compromise.¹³

Le poids moléculaire des protéines membranaires a été déterminé en utilisant un anticorps monoclonal murin spécifique pour DEA 3 (non disponible commercialement) : 5 bandes entre 34 et 71 kD.³⁶ Seuls des anticorps polyclonaux canins anti-DEA 3 sont disponibles commercialement, mais leur accessibilité demeure limitée, menace la pérennité du typage DEA 3.^e

DEA 4

Anciennement nommé C, DEA 4 est un antigène à haute fréquence avec une prévalence de plus de 97% dans la majorité des populations testées.^{4,5,10,13,15,21-23} Une réaction hémolytique aigüe post-transfusionnelle a été rapportée chez un chien DEA 4-négatif (DEA 4-) ayant préalablement été sensibilisé dans un contexte clinique.¹² L'importance clinique de ce groupe sanguin vient de sa haute prévalence qui place les chiens DEA 4- à haut risque d'incompatibilité transfusionnelle s'ils doivent recevoir une transfusion de globules rouges et de la possibilité de réaction hémolytique aigüe lors de transfusions subséquentes. Les techniques d'immunoprécipitation ont montré que DEA 4 est une protéine de 32 à 40 kD présente en une seule bande.³⁷

DEA 5

La prévalence du DEA 5, anciennement D, est faible (généralement moins de 25%).^{4,6,13,15,17-19,21,23} Des anticorps naturellement préformés anti-DEA 5 ont été identifiés chez 10% des chiens DEA 5-négatif (DEA 5-).⁴ Swisher et al ont rapporté une séquestration et une perte de globules rouges en moins de 3 jours chez des chiens DEA 5- préalablement sensibilisés recevant des globules rouges DEA 5-positifs (DEA 5+), ce qui montre l'évidence d'une réaction

^e Animal Blood Resources International (ABRI), Stockbridge, MI, USA, <http://www.abrint.net/>

hémolytique retardée.⁸ Tout comme DEA 3, la pérennité du typage sanguin DEA 5 est menacée par l'accessibilité limitée aux anticorps polyclonaux disponibles commercialement.^f

DEA 6

Anciennement nommé F, DEA 6 était suspecté initialement d'être un antigène à haute fréquence avec une prévalence de plus de 98%.^{4,17} Suivant la sensibilisation d'un individu DEA 6-négatif, une vitesse de destruction modérée des globules rouges sans signe clinique a été observée. Cet individu ne possédait pas d'anticorps naturels en circulation avant la sensibilisation.⁴ Des études subséquentes ont montré une prévalence du DEA 6 entre 60 et 74%.^{6,18,19} Il n'est plus possible de typer pour DEA 6 étant donné que les réactifs ne sont plus disponibles. La dernière étude de prévalence remonte à 1986.^{7,19}

DEA 7

Anciennement nommé Tr, DEA 7 a été initialement identifié chez environ 50% des chiens et l'allo-anticorps produit montrait une réactivité croisée avec l'antigène A humain.⁵ Contrairement aux autres groupes sanguins canins identifiés, le DEA 7 est un antigène soluble absorbé sur la membrane cellulaire.³⁸ Ce système possède 3 phénotypes : $Tr^{Tr} > Tr^o > Tr^-$.³⁹ Le poids moléculaire du DEA 7 a été déterminé par immunoprécipitation, soit 3 bandes de 57, 58 et 63 kD.³⁷

La présence d'allo-anticorps naturels chez les chiens DEA 7-négatif (DEA 7-) semble controversée, mais lorsque présents, leur titre est plutôt faible (rarement au-delà de 1 :8). Un chien DEA 7- préalablement transfusé avec des globules rouges DEA 7+ a montré une séquestration irréversible et une perte des globules rouges transfusés en 3 jours, sans évidence d'hémolyse toutefois.¹³ L'importance clinique du DEA 7 en matière de réactions transfusionnelles s'apparente donc au DEA 3 et DEA 5.

^f Animal Blood Resources International (ABRI), Stockbridge, MI, USA, <http://www.abrint.net/>

DEA 8

DEA 8, anciennement He, était présent chez 17 à 40% des chiens testés dans les années 1960-70.^{6,17} L'importance transfusionnelle du DEA 8 n'a jamais été étudiée. Tout comme DEA 6, il n'est plus possible de typer pour DEA 8. La dernière étude de prévalence remonte à 1976.^{6,7}

Dal

La découverte d'un allo-anticorps acquis suite à une transfusion sanguine incompatible chez un Dalmatien a permis à Blais *et al.*, en 2007, d'identifier un nouveau groupe sanguin canin : le *Dal*.⁹

Une femelle stérilisée Dalmatien de 4 ans (chien index) souffrant d'anémie non-régénérative reçut une première transfusion sanguine compatible pour DEA 1.1. Quarante jours après la transfusion, des crossmatchs majeurs (test de compatibilité entre le plasma du receveur et les globules rouges du donneur) ont été effectués chez 55 donneurs de sang canins non-Dalmatiens et tous étaient incompatibles. Ceci suggérait la production d'un allo-anticorps dirigé contre un antigène commun. La compatibilité a aussi été vérifiée chez 25 Dalmatiens, sans lien de parenté avec le chien index, et 4 étaient compatibles, suggérant qu'il leur manquait le même antigène. Le chien index a été typé DEA 1.1, 3, 4 et 5 positif, mais DEA 7 négatif. Aucune association n'a pu être établie entre les allo-anticorps du patient et les groupes sanguins testés. Le nouveau groupe sanguin ainsi identifié a donc été appelé *Dal*.⁹

Le sérum du chien index a été investigué pour mieux caractériser l'anticorps anti-*Dal*. Le titre d'agglutination est établi à 1 :8 à 1 :16 avec 5 échantillons sanguins de chiens *Dal+* d'après la méthode de crossmatch en tube standard en utilisant des dilutions en série du sérum dans le PBS (Phosphate-buffered saline solution). Le type d'anticorps, immunoglobuline de type G (IgG), a été déterminé en comparant le titre d'agglutination du sérum seul au titre d'agglutination du sérum exposé à des composés sulhydriques.⁹

Selon des données non-publiées, 2 cas d'incompatibilité transfusionnelle reliée au *Dal* sont survenus chez des Doberman Pinschers. L'un de ces chiens, un mâle intact de 5 ans qui souffrait d'anémie aplasique, de cardiomyopathie dilatée et de fibrillation atriale a reçu une première transfusion sanguine compatible pour DEA 1. Lors de la deuxième transfusion

quelques jours plus tard, malgré une incompatibilité du crossmatch majeur, le chien a été transfusé résultant en une réaction hémolytique, observée par un retour à la valeur de l'hématocrite pré-transfusion (7%) en moins de quelques heures. Une fois l'anémie contrôlée et avec le consentement du propriétaire, cet individu a ensuite été prélevé de petits volumes de sang (2 à 5 ml) à plusieurs reprises et son sérum (réactif polyclonal) est dorénavant utilisé pour effectuer le typage sanguin *Dal*.⁸

En 2010, Kessler *et al.* ont typé 63 chiens de races variées avec la technologie sur colonne de gel et tous étaient *Dal+*.²² Les chiens *Dal-*, c'est-à-dire ceux qui ne présentent pas l'antigène *Dal*, sont très rares. À date, ils ont été identifiés chez les Dalmatiens,⁹ et chez les Doberman Pinschers selon les données menant aux présentes études. Vu la rareté des donneurs de sang *Dal-*, les chiens *Dal-* recevant une transfusion sanguine sont fortement à risque de subir une incompatibilité transfusionnelle.

Autres groupes sanguins

Plusieurs autres groupes sanguins ont été identifiés d'après leurs allo-anticorps produits, mais ceux-ci n'ont jamais été reconnus internationalement et aucune étude n'a permis de déterminer si ceux-ci sont réellement distincts.^{35,40}

Mode d'héritabilité

La majorité des groupes sanguins canins montrent une héritabilité Mendélienne simple autosomale dominante du phénotype positif et sont hérités de façon indépendante.^{14,35,41} L'exception à cette règle serait le système DEA 1, pour lequel un mode d'héritabilité autosomal dominant avec ≥ 4 allèles a été suggéré.³²

En 1953, Cohen et Fuller étaient les premiers à étudier l'héritabilité des groupes sanguins A, B, C et D, respectivement DEA 1, 3, 4 et 5 selon la nomenclature internationale. D'après l'analyse du pedigree, ils conclurent à un mode d'héritabilité Mendélien simple dominant. Aucune évidence de lien entre les groupes sanguins ou d'allèles multiples n'a été observée. La distribution des antigènes semblait essentiellement la même chez les chiens de

⁸ Communication personnelle (Marie-Claude Blais)

race croisée ou de race pure, suggérant que les groupes sanguins font partie d'un vieil héritage évolutif chez cette espèce.⁴¹

Une étude ayant pour objectif de déterminer la prévalence des groupes sanguins D, L et M (sans relation connue avec les DEA reconnus internationalement) au Japon en 1978 a montré que deux parents positifs $L(+)$ x $L(+)$ ou $M(+)$ x $M(+)$ pouvaient donner naissance à des descendants positifs $L(+)$ ou $M(+)$ et négatifs $L(-)$ ou $M(-)$, mais que deux parents négatifs $L(-)$ x $L(-)$ ou $M(-)$ x $M(-)$ ne donnaient jamais naissance à des descendants positifs $L(+)$ ou $M(+)$. Ces résultats reflètent un mode d'héritabilité Mendélienne simple autosomal dominant.⁴²

En 1961, Swisher et Young ont identifié 2 sous-types au groupe A (DEA 1), soit (A_1 et A_2). D'après leurs observations, ils ont suggéré que le système A ait une héritabilité Mendélienne dominante avec 3 phénotypes (A_1 , A_2 et A-négatif) et 2 allèles (A_1 et A_2), dont possiblement un allèle A-négatif. L'allèle A_1 serait dominant sur l'allèle A_2 .⁴

En 1991 et 1992, Symons and Bell ont proposé une expansion du système A (DEA 1) en ajoutant un troisième sous-type. L'ordre de dominance des allèles serait $1.1 > 1.2 > 1.3 > \text{DEA 1-négatif}$.³⁰ Ils ont aussi confirmé un mode d'héritabilité Mendélien autosomal dominant des antigènes érythrocytaires canins par l'analyse du pedigree d'antigènes érythrocytaires sans lien connu avec les DEA reconnus internationalement.³⁵

Plus récemment, Polak *et al.* ont étudié le système DEA 1 et ils ont typé les chiens en utilisant le même anticorps monoclonal murin IgM anti-DEA 1 (auparavant nommé DEA 1.1). Sans contredire ce qui avait préalablement été décrit d'un point de vue génétique, ils ont changé la perception du groupe sanguin DEA 1 d'un point de vue phénotypique en observant différentes forces d'expression antigénique (négatif ou 0, faible ou 1+, intermédiaire ou 2+ et fort ou 3-4+) transmises génétiquement. D'après l'analyse du pedigree présenté dans la **Figure 1**, ils ont conclu à un mode d'héritabilité Mendélien autosomal dominant avec ≥ 4 allèles (DEA 1-, DEA 1+ faible, DEA 1+ intermédiaire, DEA 1+ fort).³²

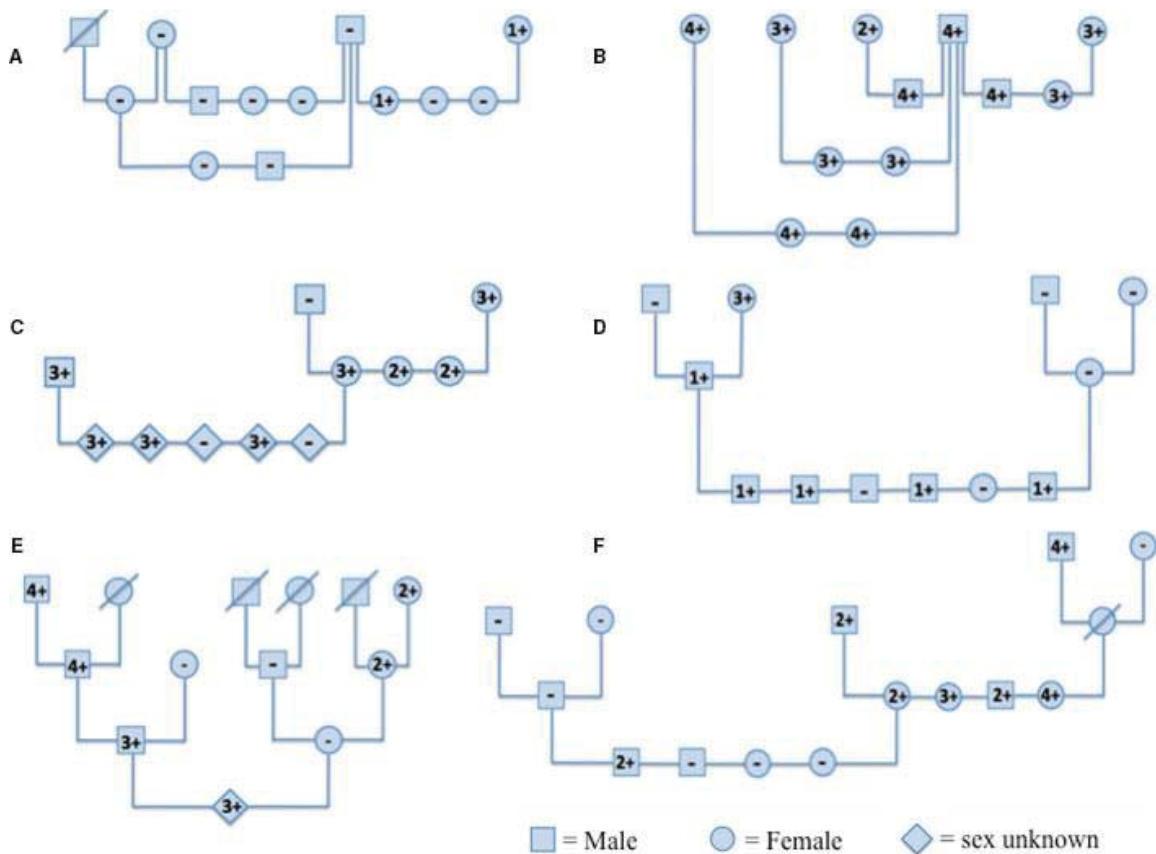


Figure 1. Pedigrees de chiens avec différentes combinaisons de DEA 1+ et DEA 1-.

(A) Croisements entre des chiens principalement DEA 1-, (B) croisements entre des chiens DEA 1+, et (C) croisements DEA 1+ et DEA 1- chez une famille de chiens de race croisée. (D) Croisements DEA 1+ et DEA 1- chez des Beagles et (E et F) chez une famille de chiens de race croisée. Tiré de Polak et al., 2015³²

Immunogénicité

L'immunogénicité est la capacité que possède un antigène d'induire une réponse immunitaire (production d'anticorps). Le groupe sanguin DEA 1 est hautement immunogène avec la production de forts allo-anticorps anti-DEA 1 (titre d'agglutination $\geq 1:256$) après sensibilisation de plusieurs chiens. L'antigène DEA 4 semble aussi être fortement antigénique avec un titre de 1:256. Les antigènes DEA 3 et 5 sont moins efficaces pour induire une réponse immunitaire même si des transfusions répétées sont administrées, par conséquent ils sont moins immunogènes.⁸ Certains allo-anticorps ont la capacité de diminuer la durée de vie des globules rouges transfusés de façon plus ou moins rapide. Ceci sera discuté en détail dans la prochaine section.

ANTICORPS ANTI-ÉRYTHROCYTAIRES

Les anticorps contre les globules rouges sont des IgG ou des IgM. Ils peuvent être présents naturellement en circulation ou être acquis (ou immuns) suite à une transfusion incompatible (i.e. sensibilisation). La présence ou la production de ces anticorps érythrocytaires peut causer une destruction plus ou moins rapide des globules rouges transfusés.

Allo-anticorps naturels

Certaines espèces possèdent des anticorps naturels capables d'induire une réaction hémolytique dès la première transfusion incompatible. Ceci est le cas pour le système ABO chez l'humain et le système AB chez le chat.⁴³⁻⁴⁵ Chez le chien, des anticorps naturels contre certains groupes sanguins canins ont été identifiés (DEA 3, 5 et 7 seulement), mais leur importance clinique n'a pas encore été démontrée.^{7,13} En 1961, Swisher et Young ont identifié des anticorps naturels contre DEA 3, DEA 5 et un groupe sanguin inconnu chez respectivement 2%, 10% et 3% des 145 chiens étudiés. Ces anticorps naturels étaient présents avec un faible titre d'agglutination et ils étaient probablement incapables de produire une hémolyse ou une agglutination significative.⁴ Initialement, des anticorps naturels anti-DEA 7 avaient été identifiés chez 50% des chiens DEA 7-.¹³ En 1995, une étude n'a pas confirmé l'existence d'anticorps anti-DEA 7,¹⁰ alors qu'une autre étude suggère la présence d'allo-anticorps naturels anti-DEA 7 chez 20 à 50% des chiens DEA 7- (titre maximal de 1 :8).¹³ Bien que ces études se contredisent, il est généralement accepté qu'un certain pourcentage des chiens DEA 7- possèdent des allo-anticorps naturels anti-DEA 7 en circulation. Aucune étude n'a réussi à montrer la présence d'allo-anticorps naturels anti-DEA 1 et 4.^{3,4} Concernant le *Dal*, l'étude originale n'a pas identifié d'allo-anticorps naturels chez 4 Dalmatiens *Dal*- n'ayant jamais reçu de transfusion.⁹

Allo-anticorps acquis ou immuns

Puisque la gestation n'induit pas de sensibilisation chez la chienne,⁴⁶ les transfusions sanguines incompatibles demeurent la principale source d'allo-anticorps érythrocytaires acquis ou immuns chez le chien. Contrairement au cheval ou à l'humain,⁴⁷⁻⁵⁰ aucune évidence de sensibilisation gestationnelle n'a été rapportée chez le chien. Des différences anatomiques dans le type de placentation pourraient expliquer en partie cette différence entre les espèces. L'humain possède un placenta de type hémochorial faisant en sorte que le l'épithélium

chorionique fœtal est en étroit contact avec le sang maternel. Chez le chien, la placentation endotheliochoriale contient une couche supplémentaire d'endothélium maternel utérin qui sépare l'épithélium chorionique fœtal du sang de la mère. Cela dit, la sensibilisation gestationnelle est bien documentée chez le cheval et ce, malgré une placentation épitheliochoriale où 3 couches de tissu séparent l'épithélium chorionique fœtal du sang de la mère. Chez cet espèce, le mécanisme exact permettant la sensibilisation gestationnelle n'a pas encore été élucidé, mais les principales hypothèses demeurent l'occurrence de maladies placentaires et de trauma utérin lors de la parturition. Vu l'absence d'évidence de sensibilisation gestationnelle, les chiennes ayant déjà été gestantes peuvent être utilisées de façon sécuritaire comme donneur de sang et que des tests de compatibilité pré-transfusionnels additionnels ne sont pas nécessaires.⁴⁶ D'un autre côté, de l'isoérythrolyse néonatale a été observée (associée au groupe sanguin DEA 1 seulement) chez des chiots DEA 1+ nés de chiennes DEA 1- préalablement sensibilisées par une transfusion incompatible DEA 1+, explicable par l'absorption intestinale d'allo-anticorps anti-DEA 1 dans le colostrum maternel.⁵¹ Ainsi, les allo-anticorps ne sont pas transmis de la mère aux chiots durant la gestation, mais ils ont la possibilité de l'être via le colostrum durant les 24 premières heures de vie.⁷

Transfusion incompatible

Les allo-anticorps produits suite à des transfusions incompatibles expérimentales ont mené à la découverte des groupes sanguins canins connus jusqu'à présent. Ces études ont été effectuées majoritairement avant les années 1970 et elles ont montré que les allo-anticorps acquis montrent des propriétés agglutinantes et parfois hémolytiques et que leur vitesse d'apparition, leur force (titre d'agglutination ou titre d'hémolyse) et leur capacité de détruire les globules rouges transfusés varient.^{1,2,8} La production d'allo-anticorps peut réduire la durée de vie des globules rouges transfusés lors d'une première transfusion et mener à des réactions hémolytiques aiguës ou retardées lors de transfusions subséquentes.

Diminution de la survie des globules rouges transfusés

La demi-vie des globules rouges hétérologues compatibles transfusés varie de 21 à 43 jours et une transfusion devrait être efficace pour 4 à 6 semaines.^{52,53} En utilisant une technique de biotinylation des globules rouges *in vitro*, des transfusions autologues ont montré une durée de vie moyenne des globules rouges de $104,3 \pm 2,2$ jours chez 3 Beagles et une durée de vie

significativement plus courte chez 5 Greyhounds ($53,6 \pm 6,5$ jours). Cette différence pourrait être expliquée par des différences dans la structure membranaire des globules rouges chez les Greyhounds, faisant en sorte d'augmenter la vitesse de destruction des globules rouges transfusés.⁵⁴

Les études expérimentales ont montré que des allo-anticorps peuvent être produits à partir de 4 à 14 jours suivant une transfusion incompatible.^{2,55-57} Ces allo-anticorps acquis peuvent augmenter la vitesse de destruction des globules rouges transfusés. Ce phénomène a été observé suivant la sensibilisation de chiens DEA 1- avec du sang DEA 1+ où une disparition rapide des globules rouges transfusés a été notée 1 à 2 semaines post-transfusion.² La **Figure 2** montre la vitesse de destruction des globules rouges lors d'une première transfusion incompatible et lors d'une deuxième transfusion incompatible pour un même antigène inconnu.⁸

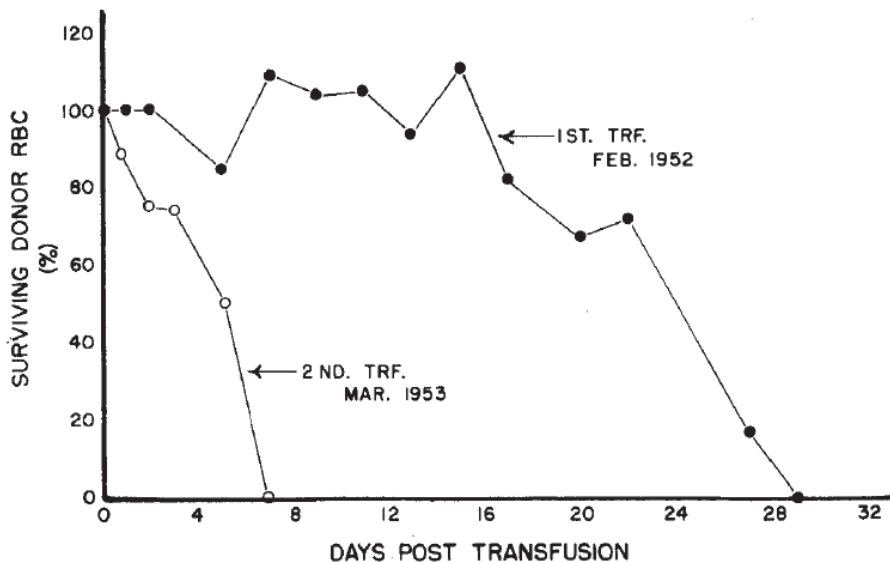


Figure 2. Survie des globules rouges lors d'une première et d'une deuxième transfusion chez le même chien.

La spécificité des allo-anticorps produits est inconnue. Durant la première transfusion, les globules rouges du donneur ont survécu jusqu'au 14^e jour à partir duquel la vitesse de destruction des globules rouges a augmenté, ce qui suggère une sensibilisation. À ce moment, le sérum contenait un allo-anticorps avec un titre de 1:4. Une deuxième transfusion en utilisant le sang du même donneur a été administrée environ 1 an plus tard. Une destruction plus rapide des globules rouges s'est produite immédiatement après la transfusion. *Tiré de Swisher et al., 1962*⁸

Chez des chiens préalablement sensibilisés, une deuxième transfusion incompatible peut mener à une réaction hémolytique aigue, retardée ou une simple diminution de la survie des globules rouges transfusés. Une grande variation existe dans la rapidité et la sévérité des réactions hémolytiques post-transfusionnelles en fonction de l'antigène érythrocytaire impliqué. La **Figure 3** montre cette différence au sein du système DEA 1 entre les antigènes DEA 1.1 et DEA 1.2. En considérant que les chiens DEA 1.2+ sont en réalité des chiens DEA 1+ exprimant moins d'antigènes à la surface des globules rouges, il n'est pas surprenant que les globules rouges exprimant moins d'antigènes DEA 1 soient détruits moins rapidement. La **Figure 4** montre cette différence entre les antigènes érythrocytaires DEA 3, 4 et 5.⁸

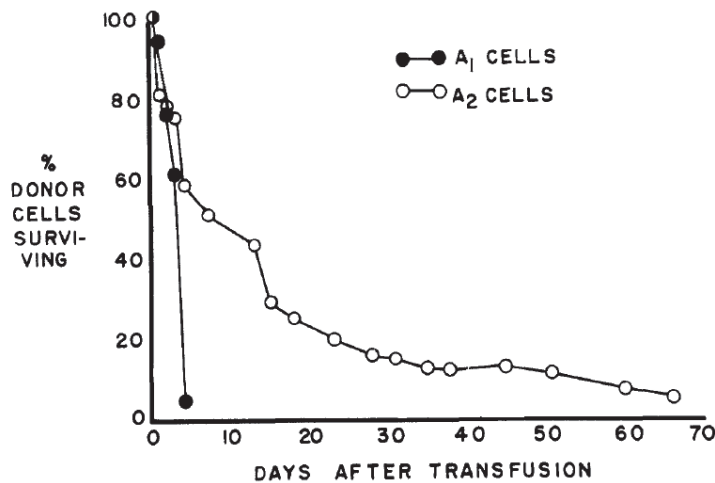


Figure 3. Survie des globules rouges DEA 1.1 (A₁) et DEA 1.2 (A₂) transfusés au même chien DEA 1-négatif préalablement sensibilisé avec des globules rouges DEA 1.1.

Chez un chien DEA 1-négatif préalablement sensibilisé avec des globules rouges DEA 1.1, les globules rouges DEA 1.1 ont une très courte survie et de l'hémoglobinémie se développe rapidement après la transfusion. D'un autre côté, les globules rouges DEA 1.2 sont détruits beaucoup plus lentement. *Tiré de Swisher et al., 1962*⁸

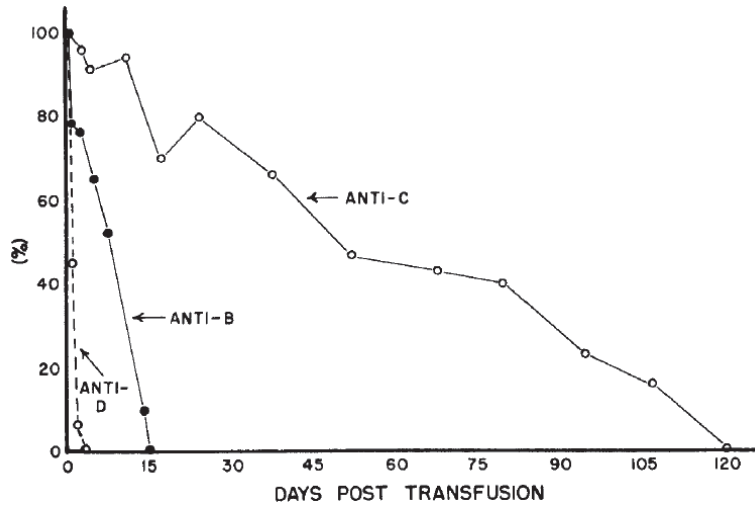


Figure 4. Survie des globules rouges DEA 3 (B), DEA 4 (C) et DEA 5 (D) transfusés à 3 receveurs préalablement sensibilisés.

Des volumes comparables ont été transfusés. Les allo-anticorps anti DEA 3, 4 et 5 montrent des caractéristiques semblables *in vitro* et leurs titres étaient presque équivalents. Malgré ces similitudes, il existe une grande variabilité dans la capacité de destruction des globules rouges incompatibles *in vivo* par les différents allo-anticorps. Lors de cette expérience, les allo-anticorps anti-DEA 4 n'ont pas diminué la durée de vie des globules rouges DEA 4 transfusés. *Tiré de Swisher et al., 1962*⁸

Réaction hémolytique aigüe à médiation immunitaire

Lors d'une réaction hémolytique aigüe à médiation immunitaire, il se produit une destruction rapide des globules rouges transfusés par les allo-anticorps en circulation. Les signes cliniques sont dus principalement à l'hémolyse et ils se manifestent dans les 24 heures suivant le début de la transfusion. Des études expérimentales ont d'abord montré qu'une transfusion DEA 1+ à un individu DEA 1- préalablement sensibilisé résulte rapidement en hémolyse avec des signes cliniques relativement sévères.² De la détresse respiratoire, des vomissements et de l'incontinence urinaire ou fécale accompagnent souvent ces réactions et surviennent de quelques minutes à quelques heures après le début de la transfusion. Ensuite, de la fièvre et de l'hémoglobinurie sont communément observés. Malgré ces signes cliniques assez sévères, les transfusions sanguines sont rarement fatales et les dommages rénaux sont peu fréquents.⁵⁸ Une transfusion de plasma contenant des allo-anticorps anti-DEA 1 chez un receveur DEA 1+ a causé une réaction hémolytique aigüe et des signes cliniques semblables.²

Dans un contexte clinique, des réactions hémolytiques aiguës post-transfusionnelles associées à la production d'allo-anticorps contre DEA 1, DEA 4 et un antigène fréquent non-caractérisé ont été rapportées.¹⁰⁻¹² Ces articles seront présentés succinctement dans les prochains paragraphes.

En 1995, Giger *et al.* ont rapporté une réaction hémolytique aiguë post-transfusionnelle chez un patient DEA 1.1 négatif préalablement sensibilisé 3 ans auparavant par 2 transfusions de sang entier (compatibilité non-testée). Ce chien souffrait d'anémie hémolytique à médiation immunitaire (AHMI) et recevait des traitements immunosuppresseurs. Il a été transfusé avec un concentré de globules rouges (compatibilité non-testée). Une heure après le début de la transfusion (100 ml administrés), le chien a développé de l'hyperthermie (39,8 °C) et de la léthargie, et par conséquent, la transfusion a été arrêtée. La température a continué d'augmenter jusqu'à 41,5 °C après 5 heures et de l'hémoglobinémie et hémoglobinurie ont été observées. Après 14 heures, la température est retournée à la normale et la pigmenturie s'est résolue (**Figure 5**). Le titre d'agglutination était 1:16 et il est descendu à 1:4 trois ans post-transfusion (basé sur la technique en tube). Le titre d'hémolyse était 1 :128.¹⁰

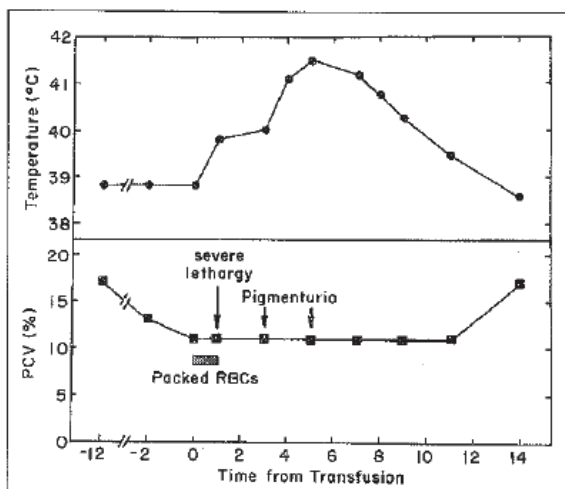


Figure 5. Suivi de la température rectale et de l'hématocrite chez un chien ayant développé une réaction hémolytique aiguë associée au DEA 1.

Un chien DEA 1.1- qui avait préalablement été transfusé a reçu par inadvertance du sang DEA 1.1+. L'hématocrite est représenté par le PCV (Packed cell volume). Tiré de Giger *et al.*, 1995¹⁰

En 1995, Callan *et al.* ont rapporté une réaction hémolytique aigue associée à un antigène fréquent et non-caractérisé qui n'était pas relié aux DEA 1.1, 1.2, 3, 4, 5 et 7. Un Whippet ayant reçu 1 unité de sang entier et 1 unité de concentré de globules rouges au Jour 0 a montré de l'hémoglobinurie sans augmentation de son hématocrite 2 heures post-transfusion (14 %) lors d'une 3^{ème} transfusion (concentré de globules rouges) au Jour 14. Le jour suivant (Jour 15), le chien a reçu 1 unité de concentré de globules rouges incompatible au crossmatch majeur et 0,25 mg/kg de dexaméthasone IV avant la transfusion. Aucun signe clinique n'a été observé, mais l'hématocrite a augmenté légèrement (17 %) puis est retourné à la valeur pré-transfusion en 12 heures. Au Jour 17, l'hématocrite avait encore diminué (10 %). Une autre unité de concentré de globules rouges a été administrée, puis une tachypnée et de l'hémoglobinurie ont été notées commençant 2 heures après le début de la transfusion. La transfusion a été arrêtée, puis l'hémoglobinurie s'est résolue en 9 heures. La **Figure 6** présente l'évolution de l'hématocrite en fonction du temps.

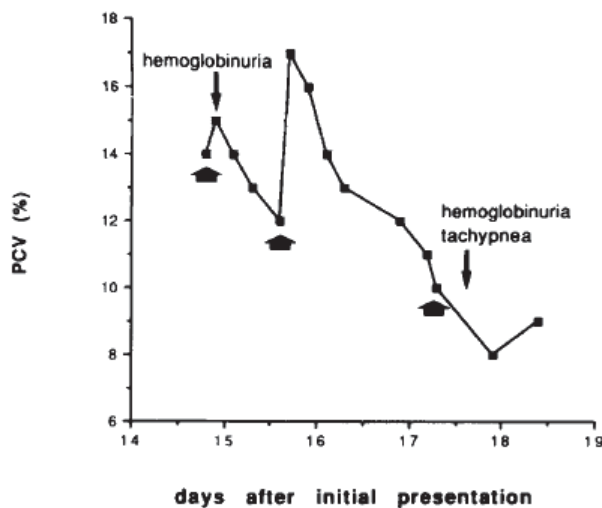


Figure 6. Réaction hémolytique aigue post-transfusionnelle causée par un allo-anticorps contre un antigène érythrocytaire fréquent non-caractérisé

Le Whippet avait préalablement été sensibilisé par une transfusion sanguine. Les flèches courtes montrent le début des transfusions de concentré de globules rouges et les longues flèches montrent les réactions adverses. Tiré de Callan *et al.*, 1995¹¹

Malgré les efforts d'identifier un donneur de sang compatible, aucun chien n'a pu être identifié et le patient a été euthanasié. Par la suite, seulement 1 chien compatible a été

identifié. Ce chien avait les mêmes parents que le patient. Ceci suggérait qu'un allo-anticorps contre un antigène commun manquait chez ces 2 chiens et que cet allo-anticorps est responsable de l'incompatibilité transfusionnelle observée.¹¹

En 2003, Melzer *et al.* ont rapporté une réaction hémolytique aigue post-transfusionnelle associée au DEA 4 chez un patient souffrant d'AHMI recevant des traitements immunosuppresseurs. Un chien DEA 4- a été sensibilisé 17 jours auparavant par 2 transfusions de concentré de globules rouges DEA 4+ à 2 jours d'intervalle, sans complication observée. Lors de la 3^e transfusion, de l'hémolyse a été détectée par de l'hémoglobinémie de 3 à 24 heures post-transfusion et une diminution de l'hématocrite post-transfusion de 35 à 32 %. Lors de la 4^e transfusion 2 semaines plus tard, de l'hémoglobinémie, une diminution de l'hématocrite post-transfusion de 35 à 20 %, des vomissements, de l'ictère et de la léthargie ont été observés. La production d'un allo-anticorps anti-DEA 4 a causé une réaction hémolytique aigue lors de la 3^e transfusion et une réaction encore plus sévère lors de la 4^e transfusion 2 semaines plus tard.¹²

Réaction hémolytique retardée à médiation immunitaire

Il ne semble pas y avoir de consensus concernant la définition exacte d'une réaction hémolytique retardée. Certains auteurs proposent une diminution rapide de l'hématocrite de 3 à 5 jours post-transfusion, sans signe clinique aigu d'hémolyse.^{28,52} D'autres auteurs proposent la présence d'hémolyse extravasculaire dans les 2 à 21 jours post-transfusion avec des signes moins sévères de réaction hémolytique aigue.^{59,60} Plusieurs autres auteurs proposent une définition plus globale, soit une augmentation de la vitesse de destruction des globules rouges observée par une diminution rapide de l'hématocrite dans les jours ou semaines suivant la transfusion (\pm signes cliniques, \pm hémolyse intravasculaire ou extravasculaire).^{10,61,62} Bien qu'il y ait des divergences, deux critères semblent faire consensus : 1- survenir plus de 24 heures post-transfusion et 2- une augmentation de la vitesse de destruction des globules rouges doit être observable, soit par une diminution rapide de l'hématocrite ou par une évidence d'hémolyse intra ou extravasculaire.

Des réactions hémolytiques retardées associées aux DEA 3, 5 et 7 lors d'une deuxième transfusion et au DEA 1 lors d'une première transfusion ont été observées dans un contexte expérimental.⁸

Caractérisation des allo-anticorps

Les allo-anticorps peuvent être caractérisés *in vitro* en déterminant notamment leur titre d'agglutination et leur classe d'immunoglobuline. Aussi, d'autres caractéristiques sont présentées dans le **Tableau IV**. Les allo-anticorps anti-DEA 1 présentent des caractéristiques différentes des allo-anticorps DEA 3, 4, 5 et *Dal*, notamment l'observation d'hémolyse *in vitro*, la fixation du complément et la réaction au test de Coombs.

Tableau IV. Caractéristiques des allo-anticorps anti-DEA 1, 3, 4, 5 et *Dal*^{3,8,9}

	Allo-anticorps anti-				
	DEA 1 ⁸	DEA 3 ⁸	DEA 4 ⁸	DEA 5 ⁸	<i>Dal</i> ⁹
Agglutination <i>in vitro</i>	X	X	X	X	X
Titre maximal observé	1:1024 ³	1:64 ³	1:256 ³	1:16 ³	1:16
Hémolyse <i>in vitro</i>	X				
Fixation du complément*	X				
Réagit au test de Coombs	X				
Température optimale					
37°C	X				X
4-25°C		X	X	X	

*Les globules rouges DEA 1.1 sont hémolysés *in vitro* par des allo-anticorps anti-DEA 1 en présence du complément.

Titre d'agglutination

Le titre d'agglutination est défini comme la plus grande dilution de sérum à laquelle on observe une réaction positive, i.e. une agglutination sans équivoque.⁶³ Il est déterminé à la suite de dilutions en série par un facteur de 2 du sérum ou du plasma à tester.^{9,10} Il peut être déterminé en tube ou sur colonne de gel.

Dans la littérature, le plus haut titre rapporté lors de transfusions expérimentales est de 1 :1024, alors qu'il est de 1:16 lors des cas d'incompatibilité transfusionnelle dans un contexte clinique.^{3,10} Concernant le *Dal*, le titre rapporté est 1:8 à 1:16 (technique en tube) suivant une première transfusion incompatible chez un patient.⁹

Classe d'immunoglobuline

Les anticorps produits sont des immunoglobulines (Ig) sécrétées par les plasmocytes en réponse à une stimulation antigénique. L'Ig est une unité symétrique contenant 4 chaînes d'acides aminés : 2 chaînes lourdes et 2 chaînes légères. Ces chaînes forment une structure en « Y » et sont liées par des ponts disulfures. Pour un anticorps donné, les 2 chaînes lourdes sont

identiques, même principe pour les chaînes légères. Les chaînes lourdes déterminent la classe d'Ig: IgM, IgG, IgA, IgD et IgE.^{28,63} Les anticorps érythrocytaires sont des IgG ou IgM (**Figure 7**).

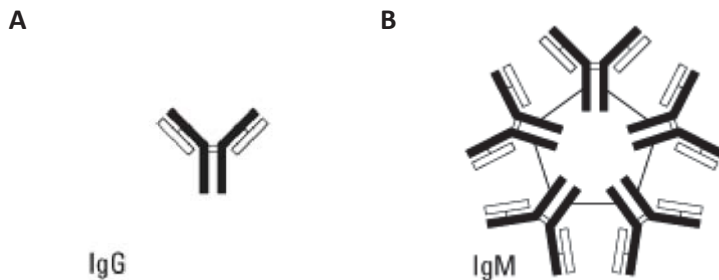


Figure 7. Structure des immunoglobulines érythrocytaires. (A) IgG et (B) IgM. Tiré de <https://www.thermofisher.com/ca>

En laboratoire, il est possible de déterminer la classe d'immunoglobuline (IgG ou IgM) à l'aide de composés sulfhydrés, soit le 2-mercaptoéthanol (2-ME) et le dithiothreitol (DTT). Le traitement des IgM à l'aide de ces composés sulfhydrés brise les liens disulfides et abolit l'agglutination et la fixation du complément des IgM, ce qui rend l'anticorps inactif. L'observation du titre d'agglutination avant et après traitement avec des composés sulfhydrés permet de confirmer ou d'infirmer la présence d'IgM.⁶⁴ Les allo-anticorps contre les groupes sanguins testés jusqu'à présent (DEA 1 et *Dal*) sont des IgG.^{9,10}

PROCÉDURES DE TRANSFUSION SANGUINE

La médecine de transfusion chez le chien a grandement évolué grâce aux expérimentations ayant pour objectif l'avancement de la médecine humaine. Au cours des dernières décennies, l'utilisation de transfusions dans un but thérapeutique est devenue plus accessible avec l'augmentation de la qualité des soins vétérinaires offerts et l'amélioration des procédures, notamment le stockage des produits sanguins et les tests de compatibilité. Les procédures de transfusion sanguine seront présentées brièvement dans les prochains paragraphes, en commençant par le don de sang, jusqu'à la transfusion en soi, en passant par les tests de compatibilité donneur/receveur. L'emphasis sera mise sur la transfusion de concentré de globules rouges étant donné qu'il s'agit de la procédure utilisée dans notre étude. Enfin, les réactions adverses possibles seront présentées brièvement.

Transfusion sanguine

Les produits sanguins transfusés incluent : les produits de globules rouges (sang entier et concentré de globules rouges) et les produits de plasma (plasma, plasma riche en plaquettes, concentré de plaquettes et cryoprécipité). Ici, seule la transfusion de concentré de globules rouges sera abordée.

Concentré de globules rouges

Généralement, le volume moyen de concentré de globules rouges administré lors d'une transfusion est 6 à 12 ml/kg.⁶⁰ La règle générale est qu'une transfusion de 1 ml de concentré de globules rouges par 1 lb (0,45 kg) du receveur augmente l'hématocrite de 2 %.⁵²

Trois principales méthodes d'administration du sang sont couramment utilisées en médecine vétérinaire : par gravité, par pompe à perfusion volumétrique ou par pompe à perfusion avec seringue standard.⁵³ Dans tous les cas, un filtre est utilisé pour éliminer les caillots sanguins et d'autres amas cellulaires pouvant causer une embolie chez le receveur.⁶⁰

Les produits sanguins sont administrés à un débit de 5-10 ml/kg/hr. Le débit maximal est 22 ml/kg/hr et il devrait être utilisé seulement en situation d'urgence. Le débit initial est cependant plus lent (0,25-1 ml/kg/hr) pour les premières 15 à 30 minutes afin de détecter une réaction transfusionnelle aigüe potentiellement sévère. Cette mesure préventive ne remplace en rien les tests de compatibilité (typage sanguin et crossmatch) et elle est inappropriée comme unique mesure. Si la transfusion est bien tolérée, le débit peut être augmenté pour administrer le contenu en un maximum de 4 heures. L'administration du contenu sur une période de plus de 4 heures augmente le risque de prolifération bactérienne.^{52,60}

Don de sang

Sélection du donneur

Les critères de sélection des donneurs de sang canins sont généralement les suivants : en santé, bon tempérament, entre 1 et 8 ans d'âge, vaccination à jour et poids minimal de > 23

kg (en utilisant un sac de collection de 450 ml comme celui utilisé en médecine humaine).^{60,h,i} Les chiens ne devraient pas être sous médication au moment du don de sang (à l'exception des antiparasitaires préventifs) et ne doivent pas avoir reçu de vaccin dans les 10-14 jours précédant le don de sang. Les chiens ayant déjà reçu une transfusion sanguine ou dont le passé transfusionnel est inconnu ne devraient pas être utilisés étant donné le risque qu'ils possèdent des allo-anticorps en circulation. Les femelles ayant eu des portées peuvent être utilisées, puisque la gestation ne semble pas induire la production d'allo-anticorps.⁴⁶ Le tempérament du chien est très important, puisqu'il doit être capable de rester en place avec un minimum de contention idéalement sans sédation pour toute la durée du don, soit environ 10 minutes.⁶⁰ Étant donné l'absence d'allo-anticorps naturels cliniquement significatifs, la majorité des banques de sang n'investiguent pas leurs donneurs de sang canins dont l'historique transfusionnel est connu (i.e. aucune transfusion reçue à vie).

L'évaluation de l'état de santé comprend notamment les antécédents médicaux, l'examen physique et divers tests sanguins. Ces tests incluent au minimum un bilan sanguin annuel (hématologie et biochimie) et des tests de dépistage de maladies infectieuses transmises par le sang pour lesquelles le risque d'infection varie selon la région.⁶⁰ Dans les régions où un agent infectieux est endémique, il est recommandé de faire subir des tests de dépistage sensibles aux potentiels donneurs et d'exclure les animaux positifs. Les agents infectieux ciblés sont les suivants : *Anaplasma spp.*, *Babesia spp.*, *Bartonella spp.*, *Dirofilaria immitis*, *Ehrlichia spp.*, *Hemoplasmas*, *Hepatozoon spp.*, *Leishmania spp.*, *Neorickettsia risticii*, *Rickettsia felis*, and *Trypanosoma cruzi*. Pour plus d'informations sur les plus récentes recommandations en matière de dépistage de maladies infectieuses chez les donneurs de sang, se référer au dernier consensus de l'ACVIM.⁶⁵

Lorsque disponible, le typage sanguin extensif des donneurs de sang peut être effectué dans l'objectif d'identifier de potentiels « donneurs universels ». La définition de « donneur universel » ne fait pas l'unanimité auprès des experts dans le domaine. La définition la plus acceptée est que les chiens DEA 4+, mais négatifs pour DEA 1, 3, 5 et 7 sont considérés des donneurs universels.^{7,13} La haute prévalence du DEA 4 rend difficile l'identification de donneurs

^h Canadian Animal Blood Bank (CABB). <http://www.canadiananimalbloodbank.ca/index.php/en/pet-owners/our-blood-donors>

ⁱ Centre hospitalier universitaire vétérinaire (CHUV). <http://chuv.umontreal.ca/le-chuv/hopital-des-animaux-de-compagnie/services-offerts-a-lhopital-des-animaux-de-compagnie/banque-de-sang/>

DEA 4-. Ainsi, le terme « donneur universel » en médecine de transfusion canine serait sans doute à proscrire, puisqu'il apporte un faux sentiment de sécurité. De façon idéale, il est recommandé d'utiliser des chiens DEA 1-. Toutefois, la prévalence du DEA 1 chez environ 50% des chiens rend difficile le recrutement de chiens DEA 1- respectant tous les autres critères énumérés plus haut. Pour cette raison, des chiens DEA 1+ sont aussi recrutés en pratique, mais ce sang ne peut être administré qu'à des chiens DEA 1+.

Prélèvement sanguin

Il existe principalement 2 systèmes de prélèvement sanguin : fermé et ouvert (**Figure 8**). Dans un système fermé, le contenu du sac est exposé à l'air (contamination possible) seulement lorsque l'aiguille est dégainée pour la ponction veineuse. Des systèmes fermés sont disponibles commercialement et consistent en un système de sacs permettant de prélever 450 ml de sang. Ces sacs contiennent préalablement des anticoagulants et des préservatifs permettant ensuite la séparation des différents produits sanguins (plasma vs concentré de globules rouges).^j Dans un système ouvert, il y a un ou plusieurs sites additionnels où une contamination est possible. Des systèmes utilisant des seringues ou des transferts dans des sacs de collection sont considérés ouverts. Les systèmes ouverts peuvent être utiles lorsque de plus petits volumes de sang doivent être collectés, notamment pour de plus petits patients. Un volume de sang équivalent à 20 % du volume sanguin du chien peut être prélevé de façon sécuritaire toutes les 3 à 4 semaines.⁶⁰ Ce volume correspond approximativement à 16-18 ml/kg.⁵² Un « don de sang standard » correspond à 450 ml ± 45 ml (426-521 g), ce qui est communément nommé « 1 unité ». Pour obtenir un concentré de globules rouges, le sang prélevé est centrifugé et les globules rouges sont séparés du plasma. Le BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine décrit les procédures techniques plus en détails.^{52,60}

^j Teruflex blood bag system anticoagulant citrate phosphate dextrose (CPD) and Optisol (AS-5) red cell preservative, Terumo Corporation, Tokyo, Japan

(A)



(B)



Figure 8. Systèmes de prélèvement sanguin lors d'un don de sang.

(A) Système de collection fermé (anticoagulant citrate phosphate dextrose – CPD) avec sacs satellites permettant la séparation en composés sanguins : concentré de globules rouges (solution nutritive Adsol) et plasma. (B) Système ouvert utilisant des seringues avec anticoagulant (CPD) et une valve à trois voies. Photographies gracieuseté de M-C Blais

Conservation

Le sang collecté dans un système ouvert peut être conservé seulement 24 heures au réfrigérateur (1-6 °C), comparé à 21-28 jours pour du sang collecté dans un système fermé, dépendant de l'anticoagulant et du préservatif utilisés.⁶⁰ L'entreposage des globules rouges dans des conditions optimales est primordial, puisqu'un mauvais entreposage peut mener à des réactions hémolytiques aiguës sévères parfois fatales.⁶⁶

Compatibilité entre le donneur et le receveur

La compatibilité entre le donneur et le receveur peut être déterminée à l'aide du typage sanguin et des tests de compatibilité croisée (ou couramment nommés « crossmatch »). Voici les recommandations actuelles en matière de compatibilité entre le donneur et le receveur avant toute transfusion de concentré de globules rouges:

1- La compatibilité DEA 1 devrait toujours être respectée vu le risque de réaction hémolytique retardée lors d'une première transfusion et le risque de réaction hémolytique aiguë lors de transfusions subséquentes. Si le statut DEA 1 du receveur est inconnu, il devrait recevoir uniquement du sang DEA 1-.¹⁰

2- Un crossmatch majeur doit être fait à partir de 4 jours post-transfusion et pour toute la vie de l'animal chez les chiens préalablement transfusés ou chez tous les chiens dont l'historique transfusionnel est inconnu.^{10,60,67,68}

Typage sanguin

Le typage DEA 1 est recommandé de routine avant toute transfusion afin de s'assurer de la compatibilité DEA 1 entre le donneur et le receveur.¹⁰ Pour des raisons de coût, d'accessibilité et de temps, le typage sanguin extensif, c'est-à-dire pour les autres groupes sanguins, n'est généralement pas effectué de routine. Il sera effectué notamment pour typer certains donneurs de sang, pour investiguer des cas d'incompatibilité transfusionnelle ou dans un contexte expérimental.

Le typage sanguin humain et vétérinaire consiste à mettre en contact des anticorps (monoclonaux ou polyclonaux) ou des lectines spécifiques au groupe sanguin testé avec les globules rouges devant être typés, puis d'observer l'hémagglutination.²² La présence ou l'absence d'agglutination permet de déterminer respectivement si l'individu est positif ou négatif pour le groupe sanguin testé. Certains anticorps ont des propriétés hémolytiques et l'observation d'hémolyse sera également considérée comme un résultat positif. Quoiqu'utilisées chez l'humain et chez le chat,^{69,70} les lectines ne se sont pas avérées efficaces pour différencier les différents groupes sanguins canins.⁷¹

Pour la plupart des groupes sanguins canins, le typage sanguin dépend de la disponibilité d'allo-anticorps polyclonaux obtenus en isolant le plasma ou le sérum d'un individu négatif ayant été sensibilisé.²² La disponibilité de ces réactifs peut être très limitée, surtout lorsqu'il s'agit d'un antigène à haute fréquence. L'exception à cette règle est le groupe sanguin DEA 1 pour lequel un anticorps monoclonal a été produit et des tests commerciaux sont disponibles (**Figure 9**).^{29,31}

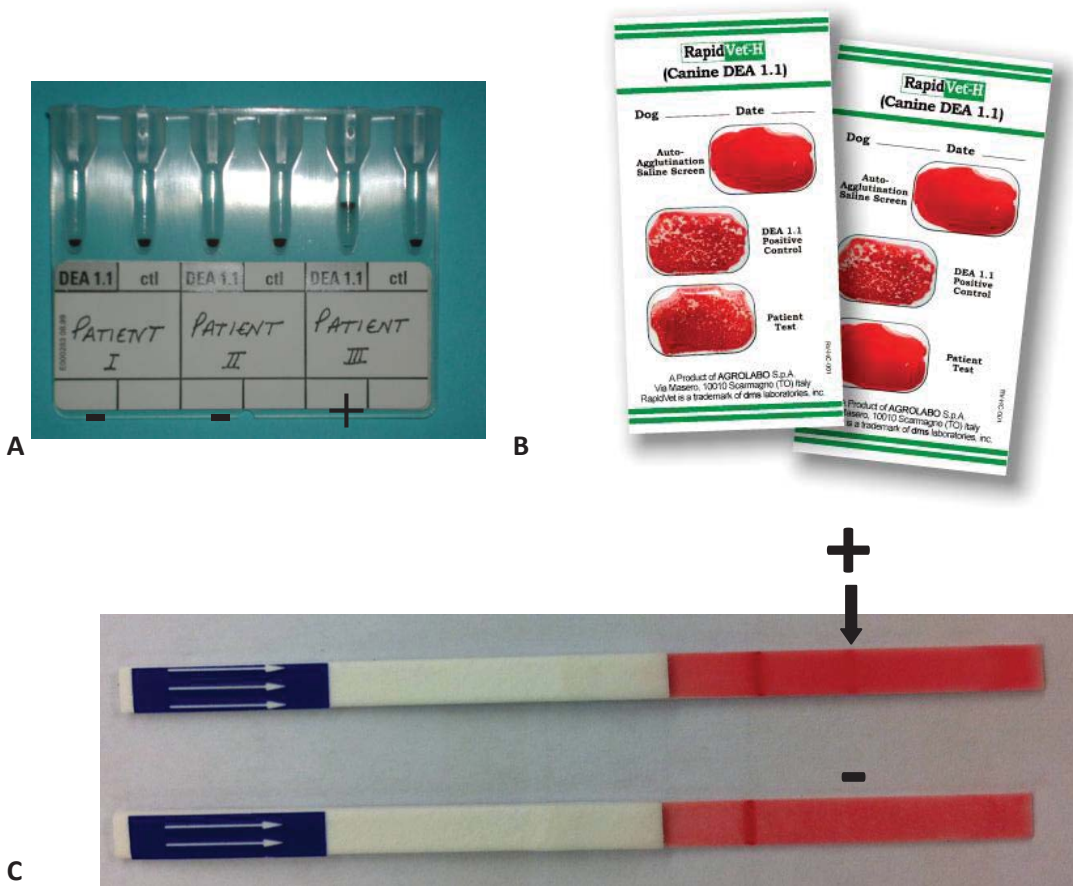


Figure 9. Dispositifs de typage sanguin DEA 1 disponibles commercialement.

(A) Colonne de gel.^k Les patients I et II sont DEA 1- alors que le patient III est DEA 1+. (B) Carte de typage.^l Le patient à gauche est DEA 1+ et celui à droite est DEA 1-. Tiré de <http://druginfos.com/rapidvet-h-feline-canada/> (C) Cartouche immunochromatographique.^m Le patient du haut est DEA 1+ et celui du bas, DEA 1-.

Les techniques en tube et sur colonne de gel utilisent des anticorps polyclonaux ou monoclonaux.²² Des réactifs polyclonaux pour DEA 4 et 7 sont disponibles commercialement.ⁿ La disponibilité pour DEA 3, 5 et *Dal* est limitée à certains laboratoires et comme mentionné précédemment, il n'est plus possible d'obtenir des anticorps pour DEA 6 et 8.

Tube

La technique en tube est la première à être développée et elle est encore considérée comme le « gold standard ». Cette technique a été décrite par plusieurs auteurs.^{9,10,22,46,72} La

^k ID-Gel-Test Canine DEA 1.1, DiaMed Microtyping System, Cressier-sur-Morat, Switzerland

^l RapidVet – (Canine 1.1) test, DMS Laboratories, Flemington, New Jersey, USA

^m Quick Test DEA 1, Alvedia, Lyon, France

ⁿ Animal Blood Ressources International (ABRI), Stockbridge, MI, USA, <http://www.abrint.net/>

Figure 10 présente un exemple de réaction positive et négative en utilisant la technique en tube. Bien que les réactions fortement positives montrent une forte agglutination, les réactions faiblement positives laissent place à beaucoup de subjectivité dans l'interprétation. Cette technique nécessite donc du personnel qualifié, mais a l'avantage de nécessiter peu de matériel et d'être très peu coûteuse.

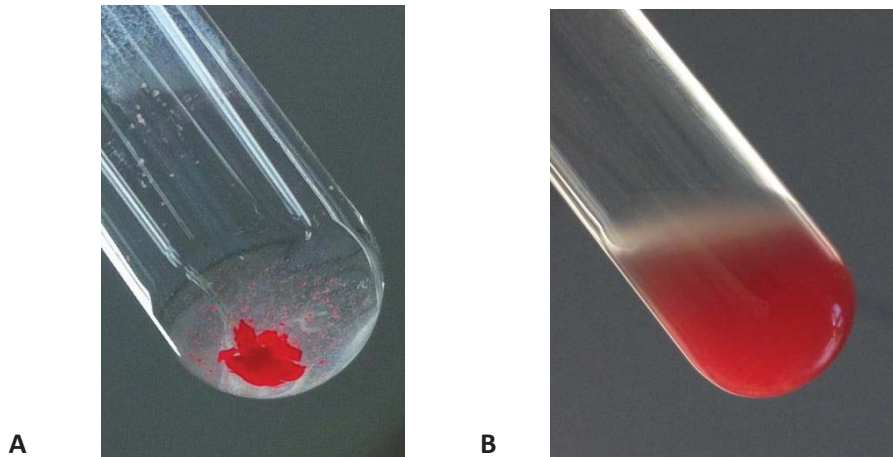


Figure 10. Typage sanguin par technique en tube.
(A) Positif (4+), (B) Négatif (0).

Colonne de gel

Cette technique a été développée par Lapierre *et al.* en 1988 dans l'optique d'obtenir une réaction d'agglutination plus stable et reproductible comparée à la technique en tube.⁷³ Il existe plusieurs avantages à utiliser la méthode sur colonne de gel : elle est plus rapide, standardisée, facile d'interprétation et plus sensible. Les réactions sont stables et peuvent être révisées par d'autres personnes jusqu'à 3 jours plus tard.^{28,74,75} De plus, elle nécessite une moins grande quantité de réactif,²² ce qui est particulièrement avantageux pour le typage sanguin canin étant donné que l'accessibilité à certains réactifs est limitée. Cette technique est rarement utilisée dans un contexte clinique étant donné qu'elle nécessite du matériel spécialisé et dispendieux (**Figure 11**).



A



B



C

Figure 11. Matériel nécessaire à la technique sur colonne de gel.

(A) Carte contenant 6 micro-colonnes de gel, (B) incubateur et (C) centrifugeuse.

Une carte de plastique contenant 6 microtubes est disponible commercialement.^o Chaque microtube contient une chambre de réaction au sommet et une colonne de gel dextran-acrylamide (**Figure 12**).

^o ID-MTS Micro Typing system, Ortho-Clinical Diagnostics, Pompano Beach, FL, USA

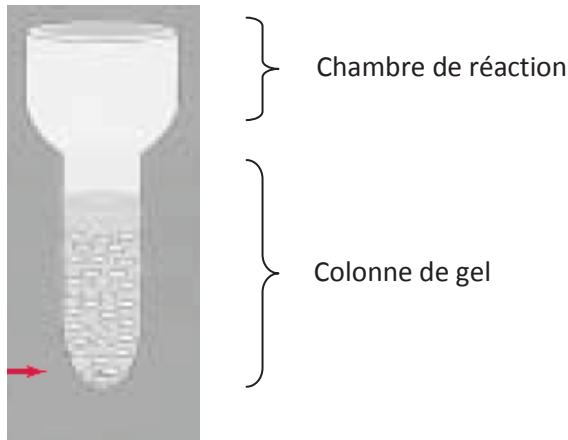


Figure 12. Microtube contenant une chambre de réaction et une colonne de gel dextran-acrylamide.

Tiré de Harmening et al., 2012 ⁷⁴

La technique de typage sur colonne de gel a été décrite par plusieurs auteurs. ^{9,22,72} Brièvement, les globules rouges du patient à tester et le réactif sont placés au sommet dans la chambre de réaction. La carte est ensuite incubée et centrifugée. Lorsqu'il se produit une agglutination, les globules rouges restent pris au sommet ou dans le gel. Le résultat est ensuite interprété de façon standardisée et gradé selon le niveau d'agglutination observé de 0 à 4+ (**Figure 13**).

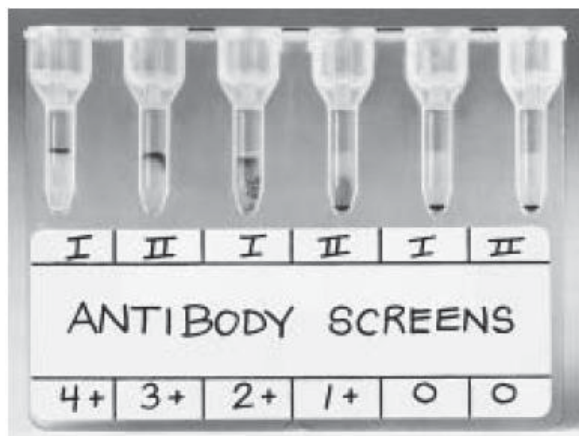


Figure 13. Interprétation du typage sanguin sur colonne de gel.

Lorsque les globules rouges sont pris au sommet ou dans la colonne de gel, le résultat est positif et gradé de 1+ à 4+. Lorsque les globules rouges passent à travers la colonne de gel, formant un amas au fond, le résultat est négatif (0). *Tiré de Harmening et al., 2012* ⁷⁴

En 2010, Kessler *et al.* ont publié une étude ayant pour objectif d'adapter la technique sur colonne de gel au typage sanguin canin DEA 1, 3, 4, 5, 7 et *Dal*. Les résultats ont montré une bonne concordance entre les 2 techniques et des résultats plus facilement interprétables sur colonne de gel.²² Il est à noter que les résultats du typage sanguin *Dal* sont généralement clairement négatif (0) ou fortement positif (3-4+), laissant peu de place à la subjectivité (**Figure 14**).^{9,22}

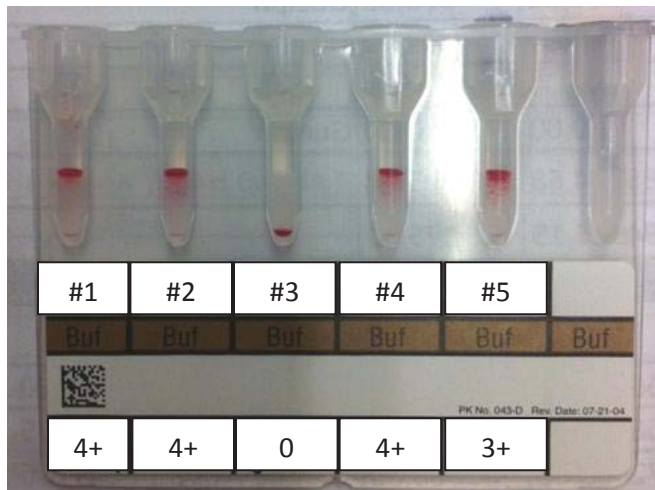


Figure 14. Typage sanguin *Dal* utilisant un anticorps polyclonal et les globules rouges de 5 chiens.

Les chiens #1, #2, #4 et #5 sont *Dal*+, alors que le chien #3 est *Dal*-.

Test de compatibilité croisée (Crossmatch)

Un des risques associés aux transfusions sanguines est qu'un antigène étranger soit introduit dans le sang du receveur. Si le receveur possède des allo-anticorps contre cet antigène (naturels ou acquis), une réaction transfusionnelle à médiation immunitaire pourrait avoir lieu, ce qui a pour effet de diminuer l'efficacité de la transfusion par une réaction hémolytique aigue ou retardée. Les crossmatchs ont comme objectif de prévenir les réactions transfusionnelles en déterminant la compatibilité entre le sang du donneur et du receveur au moment de la transfusion.²⁸ Lorsqu'on effectue un crossmatch majeur et/ou mineur, il est aussi essentiel d'effectuer un auto-contrôle.

Auto-contrôle

L'auto-contrôle consiste à incuber les globules rouges du receveur avec son propre plasma. Un résultat positif signifie la présence d'auto-anticorps dans le sérum du receveur ou encore une agglutination non-spécifique. Dans un tel cas, les résultats du crossmatch majeur et mineur doivent être interprétés avec précaution.

Majeur

Le crossmatch majeur sert à déterminer la compatibilité entre les globules rouges du donneur et le plasma du receveur au moment de la transfusion. Pour ce faire, les globules rouges du donneur sont incubés avec le plasma du receveur. Si une incompatibilité est observée, c'est-à-dire une agglutination ou une hémolyse visible, les globules rouges du donneur ne devraient pas être transfusés au receveur.^{28,60} Les recommandations actuelles suggèrent d'effectuer un crossmatch majeur à partir de 4 jours post-transfusion et pour toute la vie de l'animal chez les chiens préalablement transfusés ou chez tous les chiens dont l'historique transfusionnel est inconnu.^{10,60,67,68}

Mineur

Le crossmatch mineur détermine la compatibilité entre le plasma du donneur et les globules rouges du receveur au moment de la transfusion.²⁸ Le crossmatch mineur n'est pas requis si le receveur reçoit un concentré de globules rouges.⁶⁰

Techniques

Plusieurs techniques existent : sur lame, en tube, sur tube de gel et sur colonne de gel. Les techniques en tube et sur colonne de gel ont déjà été discutées plus haut et les principes restent les mêmes en cas de crossmatch. La méthode sur lame ne sera pas discutée dans le cadre de notre étude, puisqu'elle est nettement moins sensible. La technique sur tube de gel est un bon compromis en clinique entre la technique en tube et celle sur colonne de gel, puisqu'elle possède l'avantage d'être facile d'interprétation, sans le désavantage de nécessiter plusieurs appareils spécialisés et coûteux. La technique sur tube de gel est présentée dans la **Figure 15**. Le BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine décrit toutes ces techniques en détail.⁶⁰

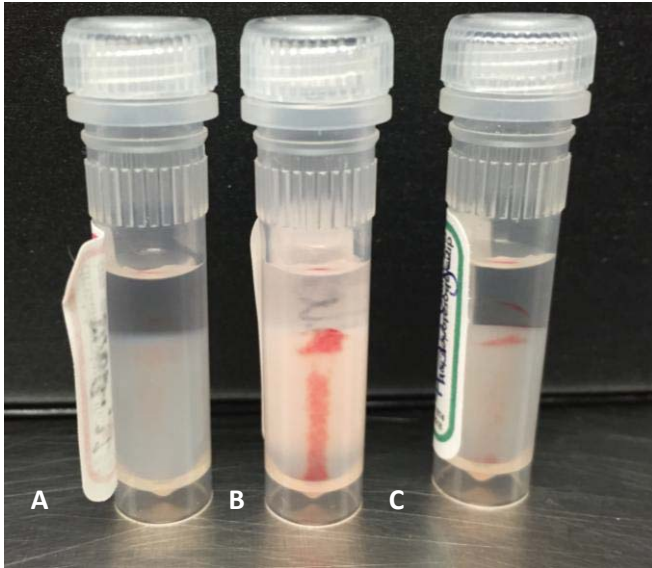


Figure 15 Test de compatibilité croisée (crossmatch) sur tube de gel.

Le résultat est considéré positif lorsqu'on observe une agglutination, i.e. les globules rouges sont pris au sommet ou dans le tube de gel. (A) L'auto-contrôle est négatif, (B) le crossmatch majeur est clairement positif et (C) le crossmatch mineur est faiblement positif.

RÉACTIONS TRANSFUSIONNELLES ADVERSES

Les réactions transfusionnelles adverses peuvent être aiguës ou retardées et immunitaires ou non-immunitaires.^{60,76} Le suivi de près du patient durant et après la transfusion est très important pour identifier une potentielle réaction adverse. Les réactions hémolytiques à médiation immunitaires ont déjà été présentées en détails précédemment en lien avec les allo-anticorps acquis. La reconnaissance des réactions hémolytiques à médiation immunitaire n'est pas toujours simple, car d'autres réactions adverses peuvent avoir des signes cliniques similaires. À titre comparatif, les principales réactions adverses et leurs signes cliniques respectifs sont présentés brièvement dans les **Tableaux V et VI**.

Tableau V. Résumé des réactions transfusionnelles aiguës^{28,60,61}

		Aigues	
		Causes	Signes cliniques
Immunitaires	Hémolyse		
	GR		Fièvre, tachycardie, dyspnée, vomissement, faiblesse, salivation, incontinence, tremblements musculaires, hypotension, hémolyse IV (hémoglobinémie, hémoglobinurie), hémolyse EX (bilirubinémie, bilirubinurie)
	Réaction fébrile		
	Plaquettes		Fièvre (augmentation > 1°C), frissons
	GB		
	Réaction allergique		
	Protéines plasmatiques		Choc anaphylactique, urticaire, angioedème, prurit, érythème, vomissement, dyspnée, hypotension
Non-immunitaires	Choc septique		
	Contamination bactérienne		Fièvre, hypotension, choc septique
	Hémolyse		
	Manutention inappropriée		Hémolyse IV, œdème
	Surcharge vasculaire		
	Surcharge vasculaire		Dyspnée, cyanose, œdème pulmonaire, tachycardie, hypotension
Intoxication au citrate			
Hypocalcémie		Vomissement, tremblements musculaires, tétanie, changements à l'ECG	
Embolie gazeuse			
Transfusion d'air		Toux, dyspnée, choc	
TRALI			
Inconnue		Fièvre, dyspnée, œdème pulmonaire, hypotension	

GR : Globule rouge; GB : Globule blanc; IV : Intravasculaire, EX : Extravasculaire, ECG : Électrocardiogramme; TRALI : Transfusion-related acute lung injury

Tableau VI. Résumé des réactions transfusionnelles retardées²⁸

Retardées		
	Causes	Signes cliniques
Immunitaires	Hémolyse GR	Asymptomatique, fièvre, diminution de l'hématocrite, hémolyse IV (hémoblobinémie, hémoglobinurie), hémolyse EX (bilirubinémie, bilirubinurie)
	Purpura post-transfusionnel Plaquettes	Thrombocytopénie
Non-immunitaire	Maladies infectieuses	
	Virus	Variés dépendant de l'agent en cause
	Bactérie	
	Parasite intracellulaire	

GR : Globule rouge; IV : Intravasculaire; EV : Extravasculaire

En résumé, selon la revue de littérature et les données préliminaires, le *Dal* pourrait être un antigène érythrocytaire à haute fréquence et des individus *Dal*⁻ ont été identifiés chez quelques Dalmatiens et Doberman Pinschers. Le *Dal* a été associé à la production d'allo-anticorps anti-*Dal* suite à une première transfusion incompatible et à une réaction hémolytique aigue lors d'une deuxième transfusion incompatible. Notre étude prospective comporte 2 volets distincts avec leurs propres objectifs respectifs présentés dans la prochaine section.

Objectifs

L'objectif général de notre étude est de déterminer l'importance clinique du groupe sanguin canin *Dal* en investiguant sa prévalence et son immunogénicité. Notre étude prospective comporte 2 volets :

Le premier volet consiste à recruter et à typer des centaines de chiens dans l'objectif de 1) déterminer la prévalence et 2) le mode d'héritabilité du *Dal*. L'emphase est mise sur les Dalmatiens et les Doberman Pinschers vu que des individus *Dal*- ont déjà été identifiés au sein de ces 2 races. Aussi, des donneurs de sang canins ont été recrutés dans le but de 3) identifier des donneurs de sang *Dal*-.

Le deuxième volet permet de déterminer l'importance clinique du *Dal* en médecine de transfusion. Pour ce faire, une transfusion *Dal*+ est administrée à un chien *Dal*- dans l'objectif de mieux caractériser les allo-anticorps anti-*Dal* produits, notamment 1) leur vitesse d'apparition, 2) leur titre d'agglutination dans le temps et 3) leur classe d'immunoglobuline.

Le compte rendu de ces 2 volets est présenté sous la forme de 2 articles : « Prévalence et mode d'héritabilité du groupe sanguin *Dal* chez les chiens » et « Caractérisation des allo-anticorps anti-*Dal* suivant la sensibilisation de 2 chiens *Dal*- ».

Articles

ARTICLE 1

Contribution

J'ai contribué à l'élaboration du protocole et à la réalisation des tâches techniques dont le recrutement des chiens (90%), les prises de sang (80%), les typages sanguins en laboratoire (90%) et la compilation des données (100%). J'ai participé aux analyses statistiques (40%) et à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit (90%).

Publication

Cet article a été soumis au « Journal of Veterinary Internal Medicine » le 2 novembre 2016.

Prevalence and mode of inheritance of the *Dal* blood type in Dalmatians, Doberman Pinschers
and other breeds

Authors:

Stéphanie Goulet, DVM, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe

Urs Giger, DVM, Dipl. ACVIM, ECVIM & ECVCP, University of Pennsylvania, Philadelphia

Julie Arsenault, DVM, MSc, PhD, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe

Anthony Abrams-Ogg, DVM, Dipl. ACVIM, University of Guelph, Guelph

Catharina C. Euler, DVM, University of Pennsylvania, Philadelphia

Marie-Claude Blais, DVM, Dipl. ACVIM, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe

Université de Montréal

Short title: *Dal* blood type in dogs

Keywords: Dog erythrocyte antigen; Blood typing; Transfusion; Hemolysis

Abbreviations: AKC: American Kennel Club, CHUV: Centre hospitalier universitaire vétérinaire,
DEA: Dog erythrocyte antigen, EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid, FMV: Faculté de
médecine vétérinaire, OVC : Ontario Veterinary College, RBC: Red blood cell, vWD: von
Willebrand Disease

Corresponding author: Marie-Claude Blais, Département de sciences cliniques, Faculté de
médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada; e-mail:
mc.blais@umontreal.ca.

This study was supported by the AKC Canine Health Foundation Inc. In addition, studies at PennGen were supported in part by NIH # OD 010939 and a fellowship to CCE from Laboklin, Germany.

Presented, in part, at the Forum of the American College of Veterinary Internal Medicine, Nashville, TN, June 2014.

PennGen and the Small Animal Blood Bank of the FMV offer blood typing and compatibility testing services.

Acknowledgments: The authors thank the veterinarians, technicians, veterinary students, and dog owners for their assistance. Special thanks go to Alison Downie of the OVC, Mélissa Caron of the CHUV, Chantal Gélinas of the Centre vétérinaire Rive-Sud and Dr. Kelly Flannigan of the Dalmatian Club of America Health & Research Committee.

Abstract

Background: The *Dal* blood group system was identified a decade ago following the accidental sensitization of a *Dal*- Dalmatian with a *Dal*+ blood transfusion. Similar *Dal*-related blood incompatibilities have been suspected in other Dalmatians, Doberman Pinschers and other breeds.

Objectives: To determine the prevalence and mode of inheritance of the *Dal* antigen expression in dogs.

Animals: A total of 1130 dogs including 128 Dalmatians, 432 Doberman Pinschers, 21 Shih Tzus and 549 dogs of other breeds including 228 blood donors were recruited from North America between 2008 and 2015.

Methods: Dogs were blood typed for *Dal* applying a gel column technique using polyclonal canine anti-*Dal* sera. Pedigrees from 8 typed families were analyzed.

Results: The prevalence of the *Dal*+ blood type varied between 85.6 to 100% in Dalmatians and 43.3 to 78.6% in Doberman Pinschers depending on geographical area. *Dal*- dogs were identified mostly in Dalmatians (15/128; 11.7%), Dobermans Pinschers (183/432; 42.4%) and Shih Tzus (12/21; 57.1%); and sporadically in mixed-breed dogs (3/122; 2.5%), Lhasa Apsos (1/6) and Bichon Frises (1/3). Only 6/245 (2.4%) blood donors were found to be *Dal*-, including 5 Doberman Pinschers. The mode of inheritance of the *Dal*+ phenotype was determined to be autosomal dominant.

Conclusions and Clinical Importance: The high percentage of *Dal*- Doberman Pinchers, Dalmatians and Shih Tzus increases their risk of being sensitized following a blood transfusion from the common *Dal*+ donor. Extended *Dal* typing is recommended in those breeds and in patients when blood incompatibility problems arise following initial transfusions.

Introduction

Many blood group systems have been described in dogs using immunohematological studies. Among these, 7 have been recognized internationally and are referred to as Dog Erythrocyte Antigen (DEA) 1, 3, 4, 5, 6, 7 and 8.¹⁻⁴ Dogs do not possess clinically important naturally occurring alloantibodies.^{3,5,6} Thus, a first mismatched transfusion is not expected to lead to an acute hemolytic transfusion reaction. However, alloantibodies produced following sensitization by mismatched blood may result in ineffective transfusion or acute hemolytic transfusion reaction, if a second transfusion is administered to a previously sensitized dog.⁷⁻¹¹

A decade ago, the erythrocytic *Dal* antigen was described following accidental sensitization of an anemic Dalmatian patient by a DEA 1 matched transfusion. Four other *Dal*-Dalmatians were identified.¹² However, a high prevalence of *Dal*+ was seen among blood donor dogs, which suggested that *Dal* may be a high frequency red blood cell (RBC) antigen rather than a blood group system similar to DEA 4,⁹ but a larger survey in dogs was lacking. *Dal*- anemic dogs will likely be sensitized via their first transfusion with blood from the common *Dal*+ blood type dog,¹² and if requiring further blood transfusions, compatible *Dal*- blood donors may be very difficult to find.

The objectives of this study were to determine the mode of inheritance of the *Dal* antigen expression and to define the prevalence of *Dal*+ and *Dal*- blood in Dalmatians, Doberman Pinschers and some other breeds of dogs including blood donors in North America.

Materials and Methods

Animals

From 2008 to 2015, Dalmatians, Doberman Pinschers and dogs of other breeds, including canine blood donors, were recruited from the veterinary clinics of 3 Universities (University of Guelph/Ontario Veterinary College [OVC], University of Montreal/Centre hospitalier universitaire vétérinaire [CHUV] and University of Pennsylvania [PennVet]), dog shows and private blood banks in Canada and the United States. Dogs recruited from the

veterinary clinics were either patients or healthy dogs admitted for screening of subclinical disorders or routine health evaluation.

Dalmatians and Doberman Pinschers - The majority of dogs recruited from OVC were asymptomatic Doberman Pinschers enrolled in a study of dilated cardiomyopathy. In addition to dogs recruited from the veterinary clinics, breeders were approached at dog shows to obtain blood samples from their Dalmatians and Doberman Pinschers. In order to establish the mode of inheritance of the *Dal* blood group system, some breeders were also asked to submit samples from families including dam, sire and offspring. Most Dalmatians in the USA were recruited at the Dalmatian Club of America National Specialty show in Huron, Ohio in 2015.

Shih Tzus - Following recognizing a blood incompatibility in a *Dal*- Shih Tzu at OVC, additional Shih Tzu patients were recruited from that clinic.

Dogs of other breeds and blood donors - Canine blood donors (>23 kg, 2-8 years old) were recruited from the 3 university blood banks listed above as well as from private blood banks in Canada and the United States. Dogs of other breeds that were not blood donors were recruited from the 3 universities, and represented either dogs in need of a blood transfusion or dogs with blood incompatibility following a prior transfusion, or left-over blood samples from PennVet or CHUV.

Information including the medical history, breed, color, sex and age of dog was obtained, in addition to the DEA 1 type, official registration name and number, and geographic location of dog at time of collection when available. Dalmatian and Doberman Pinscher owners were asked if their dog was already enrolled in a blood donor program: if so, the information was used for descriptive data of the blood donor group, but the individual dog remained within its specific breed group for statistical purposes. The study was approved by the institutional animal care and use committees of the Universities of Guelph, Montreal and Pennsylvania.

Blood samples

Ethylene-diaminetetraacetic acid (EDTA)-anticoagulated blood samples were collected from the jugular or cephalic vein following owner consent, or represented left-over samples submitted to the universities' clinical laboratories.

Dal Blood Typing

Dal blood typing was performed using neutral buffered gel column cards from Diamedⁱ and Ortho Clinical Diagnostic.^{ii,12,13} Sera containing polyclonal anti-*Dal* antibody obtained following an accidental sensitization of a *Dal*- Doberman Pinscher from Tufts University in 2007ⁱⁱⁱ and of a sensitized *Dal*- research Beagle from the University of Montreal in 2013 were used undiluted.^{iv,14} Both sera were similarly active against the *Dal* antigen when compared to the serum from the original index *Dal*- Dalmatian.¹²

Briefly, a 0.8% RBC suspension was prepared by adding 10 µL of packed and washed RBCs to 1 mL of low ionic strength saline solution.^{v,vi,12} Fifty µL of this RBC suspension was placed in the chamber on top of the gel column in addition to 25 µL of anti-*Dal* serum, and then the card was incubated at 37°C for 15 minutes.^{vii} The gel column card was then centrifuged^{viii} for 10 minutes, and the degree of agglutination was read.¹² If the RBCs migrated to the bottom of the gel column, the result was negative, and the dog was typed as *Dal*-. If the RBCs were trapped on top or within the gel column, the results were positive and graded from 1+ to 4+.^{15,16}

DEA 1 Blood Typing

If the DEA 1 information was not already available from the medical record, dogs were also blood typed for DEA 1 using either commercially available gel column tests^x or, when they became unavailable in 2011, immunochromatographic strips,^x according to the manufacturer's instructions.¹⁷ Both techniques use the same monoclonal anti-DEA 1 antibody.¹⁸

Detection of Dal-alloantibodies

Plasma samples from *Dal*- dogs identified at PennVet, and from a *Dal*- Shih Tzu from OVC with transfusion-related incompatibilities, were examined for anti-*Dal* antibodies using the gel column technology and known *Dal*+ RBCs.^{13,18}

Statistical analysis

The prevalence of the *Dal*+ blood type with a 95% confidence interval was estimated for selected breed groups with larger sample size and for which *Dal*- dogs were identified (i.e. Dalmatians, Doberman Pinschers, Shih Tzus and other breeds) per geographical areas (Ontario

[Canada], Quebec [Canada], and USA). For Dalmatians and Doberman Pinschers, 1 puppy per litter was randomly selected (using a pseudo-random number generator in SAS v.9.4)^{xi} for prevalence estimations, and statistical adjustments were made for potential clustering of dogs within breeders and geographic regions.^{xii} Therefore, 24 Dalmatian puppies from 5 litters and 63 Doberman Pinscher puppies from 14 litters were excluded from estimation of geographic prevalences. Because of its clinical importance, risk factors were evaluated for the *Dal*- phenotype. Multivariate exact logistic regressions¹⁹ were used to determine if the *Dal*- blood type was significantly associated with sex, age, coat color, DEA 1 type and geographical area, and were performed separately for each breed with a sufficient sample size and in which *Dal*- dogs were detected. One dog per breeder was randomly selected for inclusion in these analyses. A forward selection procedure was used to build each model, using a $p < 0.05$ as criteria for inclusion of variables (exact test).^{xiii} Pedigree analysis was built based on the *Dal*+ or *Dal*- type and was analyzed for simple Mendelian inheritance patterns.²⁰

Results

Breeds and demographics

From 2008 to 2015, 1130 dogs were typed for *Dal* including 128 Dalmatians, 432 Doberman Pinschers, 21 Shih Tzus and 549 dogs of other breeds. This included 228 non-Dalmatian and non-Doberman Pinscher blood donors from the following volunteer blood donor programs: CHUV and 2 associated local private blood banks (n=69), OVC (n=98), and PennVet, which also received samples from blood donors at Hemopet^{xiv} and the Ohio State University^{xv} (n=61). The 321 non-blood donor dogs represented various breeds in need of blood transfusions or from which left-over samples were available at PennVet or CHUV. Overall, the age of the selected dogs ranged from 1 month to 15 years. The description of the selected population for the prevalence study, i.e. following exclusion of randomly selected puppies, is detailed in **Table I**.

Dal Type Gel Column Technique and Prevalence

All *Dal* blood typing results using the gel column technology yielded easily interpretable agglutination reactions, with either no (grade 0) or strongly positive agglutination reactions (3+ or 4+) (**Figure 1**).

The prevalence of the *Dal+* phenotype varied among breeds and geographical area (**Table I and II**). *Dal-* dogs were identified mostly in Dalmatians (12%), Dobermans Pinschers (42%), Shih Tzus (57%) and few other breeds. All other purebred dogs were *Dal+* except for 1 Bichon Frise and 1 Lhasa Apso. Three *Dal-* dogs were detected among 122 mixed-breed dogs (**Table II**).

Dal type in Blood Donors

Of the 228 non-Dalmatian and non-Doberman Pinscher blood donors 227 were *Dal+*, including commonly recruited breeds such as Greyhounds (n=73), Labrador Retrievers (n=23), German Shepherd Dogs (n=18) and Golden Retrievers (n=14). All non-blood donor dogs of these same 4 breeds were *Dal+* (**Table II**). Only 1 *Dal-* mixed-breed blood donor was identified (at OVC).

Of all the Doberman Pinschers tested, 16 had been enrolled in a blood donor program, and 5 of them were *Dal-*. Only 1 Dalmatian was already part of a blood donor program and was *Dal+*.

Evaluation for Anti-Dal alloantibodies

No anti-*Dal* alloantibodies were detected in plasma of the 23 *Dal-* dogs tested without prior transfusion history. However, the plasma from the previously transfused *Dal-* Shih Tzu, found to be incompatible to regular donors, showed strong anti-*Dal* alloantibodies by the gel column method (4+).

Risk Factor Analysis Related to Dal Type

Risk factors for *Dal-* blood type were examined for Dalmatians and Doberman Pinschers (**Table III**). No variables were significantly different for *Dal+* and *Dal-* Dalmatians. For Doberman Pinschers, *Dal-* blood type did not vary by sex, coat color, or DEA 1 status ($p>0.05$ for all

analyses), but varied significantly by geographic region; the probability of *Dal-* was significantly greater in Quebec compared to Ontario, Canada (odds ratio of 2.01 p=0.01).

Mode of inheritance

One Dalmatian and 7 Doberman Pinscher families comprised of 117 dogs (60 *Dal-* and 57 *Dal+*) were studied (**Table IV** and **Figure 2**). As the proportion of *Dal+* phenotype did not vary significantly by gender in these families, or within the breeds (Table 3), an X-chromosomal mode of inheritance could be excluded. When both parents were *Dal-*, only *Dal-* offspring were found. *Dal+* dogs bred with *Dal-* dogs produced more *Dal+* than *Dal-* puppies (ratio 19:14). If both parents were *Dal+*, they produced all *Dal+* offspring, except for 2 litters where 3 *Dal-* puppies were identified among 12 offspring. These observations support an autosomal dominant mode of inheritance for *Dal* antigen expression and the *Dal+* type. In addition to these families, 4 litters including 12 offspring but missing one or both parents for the pedigree analysis showed distributions consistent with an autosomal dominant mode of inheritance.

Discussion

The *Dal* blood group was initially described in an anemic *Dal-* Dalmatian that was incompatible with other dogs except to several Dalmatians, but a larger survey was required to establish its prevalence in Dalmatians as well as in other breeds.¹² By using a gel column technology and polyclonal *anti-Dal* antibodies, we blood typed 1130 dogs from North America and obtained either strong *Dal+* or *Dal-* typing reactions with no naturally occurring *anti-Dal* antibodies detected in non-transfused *Dal-* dogs tested.^{12,13} This study is the first to identify *Dal-* dogs in breeds other than Dalmatians, notably in Doberman Pinschers and Shih Tzus, but also in Lhasa Apsos, Bichon Frises and mixed breed dogs, aside the *Dal-* beagle whose serum served as typing reagent. The *Dal* was initially thought to be a high incidence antigen,¹² but based on this study it should be actually classified as a blood group system where *Dal+* is dominantly inherited over *Dal-*. *Dal-* dogs are not exclusive to the Dalmatian breed and the *Dal* type should be investigated when facing transfusion incompatibility in any breed.

The proportion of *Dal+* and *Dal-* individuals did not vary significantly by gender. In addition, *Dal-* parents produced only *Dal-* offspring, and *Dal-* offspring were rare if both parents were *Dal+*. Consequently, the pedigree analyses revealed an autosomal dominant mode of

inheritance of the *Dal*⁺ phenotype similar to what has been found with other canine blood groups investigated to date.^{6,20-22} In 1953, Cohen and Fuller were the first to study inheritance of canine blood types A, B, C and D (which likely correspond to DEA 1, 3, 4 and 5, respectively, using the current international nomenclature) and they concluded that blood groups are inherited as simple Mendelian dominants with no evidence of association.^{1,21} In 1992, Symons and Bell suggested a dominant inheritance for several canine RBC antigens for which relations were not established with internationally recognized DEA, but no formal pedigree analysis were presented.²² Most recently, Polak et al²⁰ reported a multiallelic (≥ 4) autosomal dominant blood group system for DEA 1, after they observed a heritable pattern of varied antigenic expression, ranging from a complete lack (DEA 1-) to various degrees of positivity (agglutination reactions ranging from 2+ to 4+). In the current study, all *Dal* typing results yielded either a clear negative (0) or a strong positive (3+ or 4+) agglutination reaction, supporting a simpler 2 allele model with the *Dal*⁺ allele being dominant over the *Dal*⁻ allele.

This study identified numerous *Dal*⁻ dogs in Dalmatians as well as in Doberman Pinschers. Moreover, we also discovered several *Dal*⁻ Shih Tzus while investigating a blood incompatibility in a recently transfused anemic patient. Although only a small number of Lhasa Apsos and Bichon Frises were typed, 1 *Dal*⁻ of each breed were identified, which deserves further prevalence investigation. According to the International Federation of Cynology,^{xvi} both Shih Tzus and Lhasa Apsos originate from Tibet and likely share some common ancestry, but the others have no close ancestors and thus the *Dal*⁻ blood type may be far more wide spread. In addition, 1 *Dal*⁻ dog was identified after screening 57 research Beagles.^d These findings suggest a more ancestral mutation and thereby more breeds with *Dal*⁻ dogs are likely to be found.

Whereas all Dalmatians recruited in Canada were *Dal*⁺ (n=26), the prevalence of the *Dal*⁺ phenotype in Dalmatians (n=90) in the USA was 85.6%. In comparison, the original *Dal* survey conducted in 2005 showed a similar ratio with 5 *Dal*⁻ out of 26 Dalmatians (80.8%) recruited from various geographical areas in the USA (Pennsylvania, New York, Illinois and Texas) and some dogs were known to be related.¹²

The clinical importance of *Dal* in Doberman Pinschers might be considerable given that 42% are *Dal*⁻. In addition, the high prevalence of von Willebrand Disease (vWD) in Doberman Pinschers²³ creates a particular challenge for this breed. This primary hemostatic disorder puts

Doberman Pinschers at higher risk of bleeding which may lead to the need for multiple transfusions, including fresh whole blood, packed RBC, fresh frozen plasma and/or cryoprecipitate,^{24,25} increasing their risk of being sensitized to the *Dal* antigen. Unfortunately for *Dal*- patients, there is a scarcity of *Dal*- blood donors (1 mixed breed dog and 5 Doberman Pinschers among all typed donors) based upon this survey of blood donors and the original publication on *Dal*.¹²

Doberman Pinschers and Dalmatians are not commonly recruited as blood donors.^{12,26} In the original *Dal* report, of the 55 privately owned canine blood donors, only 1 was a Doberman Pinscher and none were Dalmatians.¹² Similarly, in a study including 66 non-Greyhounds screened as potential blood donors, only 1 Doberman Pinscher and no Dalmatians were investigated.²⁶ In addition to Greyhounds, the most common purebred dogs were Borzois, German Shepherd Dogs, Golden Retrievers and Labrador Retrievers.^{12,26} In the current study, only 1 Dalmatian and 16 Doberman Pinschers were enrolled active blood donors. Similarly to the aforementioned study,²⁶ in addition to mixed-breed dogs, the most common purebred dogs recruited as blood donors were Greyhounds, Labrador Retrievers, German Shepherd dogs, and Golden Retrievers, all of which were *Dal*+ (as were all dogs of these same breeds which were not blood donors). The near absence of Dalmatians as blood donors may be due to their weight generally being borderline for recruitment criteria (>23 kg recommended when using standard collection bags)²⁷ and their perceived apprehensive demeanor in veterinary clinics. The low number of Doberman Pinschers as blood donors may be due to the high prevalence of vWD in the breed and the associated cost of screening, as well as potential concerns about blood donation accelerating cardiomyopathy. The scarcity of Doberman Pinschers and Dalmatians as blood donors amplifies the rarity of *Dal*- blood in blood banks leading to the almost certain sensitization of *Dal*- patients and consequently risk of acute hemolytic transfusion reactions if subsequent transfusions are required. Thus, the specific recruitment of *Dal*- Doberman Pinschers and Dalmatians as blood donors may be desirable.

When discovered, *Dal* was thought to be a high-incidence antigen, as the incidence of *Dal*+ was >90% in the population tested and seemed to be missing in only one breed and in only a few individuals of that breed.¹² According to the International Society of Blood Transfusion (ISBT) in human medicine, the criteria for inclusion as a high-incidence antigen are: 1) an incidence of > 90% in most populations tested, but usually > 99%; 2) distinction from all other

high-incidence specificities; and 3) demonstration that the antigen is lacking in at least 2 siblings, giving evidence that the negative phenotype is genetically determined.²⁸ Studies identifying high-incidence antigens usually report only a few individuals lacking the antigen.²⁹⁻³¹ In this study, the prevalence of the *Dal*- minor allele was >10% in several breeds and thus the *Dal* antigen seems to be a true blood group system rather than a high-incidence antigen.

Given the dominant inheritance pattern and the scarcity of *Dal*- dogs within the general canine population, the most promising sources of compatible blood for a *Dal*- recipient, would be littermates, family members, or dogs from the same breed, in that order.^{12,32} Indeed, in the family studies reported herein, if 1 *Dal*- dog was detected in a litter, there was a 60% chance that another randomly selected littermate was also *Dal*- (based on 78 dogs from 13 litters with at least 1 *Dal*- dog). If needed, compatible smaller breed dogs, for instance Shih Tzu, Lhasa Apso and Bichon Frise, could also serve as blood donors by collecting an appropriate volume of blood similar to standard blood donation in cats.²⁷ When considering such *Dal*- dogs as donors, following blood banking standards regarding general health status and infectious disease screening remains of the outmost importance.^{32,33}

Canine blood groups have been reported to vary geographically.^{8,26} In this study, the prevalence of *Dal*- varied significantly only between Ontario and Quebec, and in Doberman Pinschers. Unfortunately, no risk factors (i.e. sex, age, coat color and DEA 1) for the *Dal*- phenotype within a breed were identified. DEA 1 blood typing has been recommended prior to any blood transfusion in dogs for decades.⁸ As there is no relationship between DEA 1 status and *Dal*, DEA 1 blood compatibility unfortunately does not predict compatibility for *Dal* or any other blood groups.^{12,18} Because *Dal* testing is not routinely available as is DEA 1 testing, the crossmatch (starting 4 days post-transfusion and for the animal's lifetime) remains currently the better mean to help rule out clinically relevant *Dal* incompatibility.

We could not find any evidence of naturally occurring anti-*Dal* alloantibody within the plasma of untransfused *Dal*- dogs, which is concordant with the original *Dal* study.¹² However, anti-*Dal* alloantibodies were found in the plasma of a *Dal*- Shih Tzu facing a transfusion incompatibility after being previously transfused, reinforcing that *Dal* is actually a blood group system.²⁸ That said, little is known about the clinical importance of anti-*Dal* alloantibodies in eliciting a hemolytic transfusion reaction in a previously transfused dog. The discovery of *Dal*

was possible because of the production of anti-*Dal* alloantibodies in a clinically anemic patient, but thereafter, the patient was never transfused with incompatible blood. Similarly, the anemic Shih Tzu patient described above was not further transfused once the incompatibility was recognized. However, the Doberman Pinscher from Tufts University, whose serum was used for typing purpose in part of this study, was originally investigated in 2007 because of an acute hemolytic transfusion reaction attributed to *Dal*.

Like with most blood typing in dogs, except for DEA 1, Kai 1 and Kai 2,¹⁸ *Dal* blood typing remains dependent on the availability of polyclonal reagents produced following the sensitization of *Dal*- dogs, and thus may remain limited in supply. For *Dal* typing, both tube and gel column techniques can be used.^{12,13} The gel column technology is easier to interpret, but requires kits and equipment.³⁴ With DEA 1, the production of a monoclonal antibodies and commercial typing kits extended the availability and standardization of DEA 1 typing.^{17,35} In that perspective, production of monoclonal antibodies could increase the availability of *Dal* blood typing in dogs, and would facilitate its commercial availability.

Conclusions

This study showed that the *Dal* blood type has an autosomal dominant mode of inheritance and identified several breeds with *Dal*- dogs in addition to the previously reported Dalmatians, notably in Doberman Pinschers and in Shih Tzus. Because most purebred breeds tested are *Dal*+, including all Greyhounds, Golden and Labrador retrievers and German Shepherd dogs, *Dal*- blood donors are rare and *Dal*- patients are at high risk of transfusion incompatibility when in need of blood on more than one occasion. In addition to the current recommendation to crossmatch dogs when patient was previously transfused, extended *Dal* typing, although limited by its commercial availability, is recommended in Dalmatians, Doberman Pinschers, and Shih Tzus, particularly when requiring transfusions over more than a few days.

-
- ⁱ DiaMed AG, Cressier FR, Switzerland
- ⁱⁱ ID-MTS Buffered Cards, Ortho Clinical Diagnostic, Ontario, Canada
- ⁱⁱⁱ Goulet S, Blais MC, Abrams-Ogg ACG. Prevalence of the Dal blood type in Doberman Pinschers and in canine blood donors. *J Vet Intern Med* 2014;28:1054
- ^{iv} Goulet S, Blais MC. Production and characterization of anti-Dal antibodies following sensitization of a Dal-negative dog. *J Vet Intern Med* 2015;29:1193.
- ^v LISS ID-Diluent “Vet 1”, DiaMed AG, Switzerland
- ^{vi} Antibody Enhancement Solution, Ortho Clinical Diagnostic, Ontario, Canada
- ^f ID-incubator 37S I, DiaMed Microtyping System, Switzerland
- ^g ID-centrifuge 12S II, DiaMed Microtyping System, Switzerland
- ^h DiaMed-Vet ID Card DEA 1.1, DiaMed AG, Switzerland
- ⁱ DEA 1 Alvedia lab test, Alvedia, Lyon, France
- ^{xi} RANUNI function, SAS statistical software v.9.4, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA
- ^j SURVEYFREQ procedure, SAS statistical software v.9.4, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA
- ^k LOGISTIC procedure, SAS statistical software v.9.4, SAS Institute Inc. Cary, NC, USA
- ^l Hemopet, Garden Grove, CA, USA
- ^m Veterinary Medical Center, Columbus, OH, USA
- ⁿ Federation Cynologique Internationale, <http://www.fci.be/en/>

References

1. Vriesendorp HM, Albert ED, Templeton JW, et al. Joint report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics. *Transplant Proc* 1976;8:289-314.
2. Vriesendorp HM, Westbroek DL, D'Amato J, et al. Joint report of 1st International Workshop on Canine Immunogenetics. *Tissue Antigens* 1973;3:145-163.
3. Hohenhaus AE. Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals. *Transfus Med Rev* 2004;18:117-126.
4. Giger U. Blood typing and crossmatching to ensure blood compatibility. In: Bonagura JD, Twedt DC, eds. *Kirk's Current Veterinary Therapy*, 15th ed. St.-Louis, MO: Elsevier Saunders; 2014.
5. Ottenberg R, Kaliski DJ, Friedman SS. Experimental agglutinative and hemolytic transfusions. *J Med Res* 1913;28:141-163.
6. Swisher SN, Young LE. The blood grouping systems of dogs. *Physiol Rev* 1961;41:495-520.
7. Young LE, Ervin DM, Yuile CL. Hemolytic reactions produced in dogs by transfusion of incompatible dog blood and plasma. I. Serologic and Hematologic Aspects. *Blood* 1949;4:1218-1231.
8. Giger U, Gelens CJ, Callan MB, et al. An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog. *J Am Vet Med Assoc* 1995;206:1358-1362.
9. Callan MB, Jones LT, Giger U. Hemolytic transfusion reactions in a dog with an alloantibody to a common antigen. *J Vet Intern Med* 1995;9:277-279.
10. Melzer KJ, Wardrop KJ, Hale AS, et al. A hemolytic transfusion reaction due to DEA 4 alloantibodies in a dog. *J Vet Intern Med* 2003;17:931-933.
11. Swisher SN, Young LE, Trabold N. In vitro and in vivo studies of the behavior of canine erythrocyte-isoantibody systems. *Ann N Y Acad Sci* 1962;97:15-25.
12. Blais MC, Berman L, Oakley DA, et al. Canine Dal blood type: A red cell antigen lacking in some Dalmatians. *J Vet Intern Med* 2007;21:281-286.
13. 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.

14. Goulet S, Blais MC. Characterization of anti-Dal alloantibodies following sensitization of two Dal-negative dogs. *Veterinary Pathology* 2016.
15. Giger U, Stieger K, Palos H. Comparison of various canine blood-typing methods. *Am J Vet Res* 2005;66:1386-1392.
16. Harmening DM, Walker PS. Alternative technologies and automation in routine blood banking testing, Chapter 15. In: *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*, 5th ed 2012:293-302.
17. Seth M, Jackson KV, Winzelberg S, et al. Comparison of gel column, card, and cartridge techniques for dog erythrocyte antigen 1.1 blood typing. *Am J Vet Res* 2012;73:213-219.
18. 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.
19. Mehta CR, Patel NR. Exact logistic regression: theory and examples. *Stat Med* 1995;14:2143-2160.
20. 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.
21. Cohen C, Fuller JL. The inheritance of blood types in the dog. *Journal of Heredity* 1953;44:225-228.
22. Symons M, Bell K. Canine blood groups: description of 20 specificities. *Anim Genet* 1992;23:509-515.
23. Riehl J, Okura M, Mignot E, et al. Inheritance of von Willebrand's disease in a colony of Doberman Pinschers. *Am J Vet Res* 2000;61:115-120.
24. Stokol T, Parry B. Efficacy of fresh-frozen plasma and cryoprecipitate in dogs with von Willebrand's disease or hemophilia A. *J Vet Intern Med* 1998;12:84-92.
25. Ching YN, Meyers KM, Brassard JA, et al. Effect of cryoprecipitate and plasma on plasma von Willebrand factor multimers and bleeding time in Doberman Pinschers with type-I von Willebrand's disease. *Am J Vet Res* 1994;55:102-110.
26. Iazbik MC, O'Donnell M, Marin L, et al. Prevalence of dog erythrocyte antigens in retired racing Greyhounds. *Vet Clin Pathol* 2010;39:433-435.

27. Gibson G, Abrams-Ogg ACG. Canine transfusion medicine. In: Day MJ, Kohn B, eds. BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine, 2nd ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2012:289-307.
28. Daniels GL, Fletcher A, Garratty G, et al. Blood group terminology 2004: from the International Society of Blood Transfusion committee on terminology for red cell surface antigens. Vox Sang 2004;87:304-316.
29. Montgomery WM, Jr., Nance SJ, Donnelly SF, et al. MAM: a "new" high-incidence antigen found on multiple cell lines. Transfusion 2000;40:1132-1139.
30. Lomas-Francis C, Vege S, Velliquette RW, et al. Expansion of the Kell blood group system: two new high-prevalence antigens and two novel K0 (Kellnull) phenotypes. Transfusion 2013;53:2887-2891.
31. Jensen L, Scott EP, Marsh WL, et al. Anti-Jo(a): an antibody defining a high-frequency erythrocyte antigen. Transfusion 1972;12:322-324.
32. 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.
33. 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.
34. Lapierre 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.
35. Andrews GA, Chavey PS, 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.

Tables Article 1

Tableau VII (Table I, Article 1). Prevalence with 95% confidence intervals (C.I.) of the *Dal+* blood type in Dalmatians, Doberman Pinschers, and other breeds from various areas of North America.

Origin	N	Year of sample submission	Mean age	<i>Dal+</i> Prevalence (%)	
				Estimate	95% C.I.
Dalmatians[†]					
Quebec, Canada					
CHUV	5	2014-2015	4.4	100.0	47.8-100.0
Breeder	7 ^a	2013-2015	2.6	100.0	59.0-100.0
Ontario, Canada					
OVC	2	2010-2015	3.0	100.0	15.8-100.0
USA					
Breeder	90 ^b	2015	3.9	85.6	76.4-94.7
Doberman Pinschers^{††}					
Quebec, Canada					
CHUV	93	2013-2015	4.5	59.1	48.5-69.2
Breeder	104 ^c	2013-2015	3.3	43.3	28.9-57.6
Ontario, Canada					
OVC	158	2008-2013	5.5	72.2	64.5-79.0
USA					
PennVet	14	2015	5.4	78.6	49.2-95.3
Shih Tzus					
Quebec, Canada					
CHUV	2	2014-2015	11.5	100.0	15.8-100.0
Ontario, Canada					
OVC	14	2008-2014	9.0	21.4	4.7-50.8
USA					
PennVet	5	2015	9.1	80.0	28.4-99.5
Other breeds					
Quebec, Canada					
Blood donors	69	2013-2015	3.6	100.0	94.8-100.0
CHUV	27	2013-2015	4.9	100.0	87.2-100.0
Ontario, Canada					
Blood donors	98	2008-2013	4.2	99.0	94.5-100.0
OVC	13	2008-2015	4.3	100.0	75.3-100.0
USA					
Blood donors	61	2015	4.2	100.0	94.1-100.0
PennVet	281	2016	8.1	98.6	96.4-99.6

^a From 6 breeders.

^b From 50 breeders.

^c From 15 breeders.

[†] Including 1 blood donor.

^{††} Including 16 blood donors.

Tableau VIII (Table II, Article 1). Percentage of *Dal+* dogs in breeds represented by ≥ 20 individuals or in which *Dal-* dogs identified in North America.

Breed	Number of dogs			Percentage of <i>Dal+</i> (%)
	Total	<i>Dal+</i>	<i>Dal-</i>	
Dalmatian	128	113	15	88.3
Doberman Pinscher	432	249	183	57.6
Shih Tzu	21	9	12	42.9
Bichon Frise	6	5	1	83.3
Lhasa Apso	3	2	1	66.7
Mixed-breed	122	119	3	97.5
German Shepherd Dog	34	34	0	100
Golden Retriever	32	32	0	100
Greyhound	85	85	0	100
Labrador Retriever	47	47	0	100
Other ^a	220	207	0	100

Breeds in which *Dal-* individuals were identified are presented in bold lettering.

^a Breeds (n) represented by less than 20 individuals and without any *Dal-* dog identified included: Great Dane (13), Standard Poodle (9), Maltese Terrier (9), Yorkshire Terrier (8), English Bulldog (7), Havanese (7), Siberian Husky (7), Rottweiler (7), Boxer (6), Miniature Schnauzer (6), West Highland White Terrier (6), Bernese Mountain Dog (5), Chihuahua (5), American Cocker Spaniel (5), Dachshund (5), Newfoundland Retriever (5), Unknown (5), Airedale Terrier (4), American Pitbull Terrier (4), Australian Shepherd Dog (4), Hound (4), Australian Cattle Dog (3), Bouvier des Flandres (3), Bull Mastiff (3), Jack Russell Terrier (3), Samoyed (3), Beagle (2), Cavalier King Charles Spaniel (2), Flat Coated Retriever (2), Great Pyrenees (2), Irish Wolfhound (2), Kuvasz (2), Mastiff (2), Miniature Dachshund (2), Pitt Bull (2), Pomeranian (2), Pug (2), Redbone Coonhound (2), Saint Bernard (2), Shar Pei (2), Tibetan Terrier (2), Vizsla (2), Weimaraner (2) and 1 each of Afghan Hound, Akita, Anatolian Shepherd Dog, Beauceron, Bloodhound, Border Collie, Borzoi, Bull Terrier, Bulldog, Cairn Terrier, Catahoula Leopard, Chinese Crested, Chow Chow, Collie, Dogue de Bordeaux, English Cocker Spaniel, English Mastiff, English Shepherd Dog, English Springer Spaniel, Griffon Korthal, Italian Greyhound, Japanese Mastiff, Labradoodle, Leonberger, Miniature Pinscher, Norwich Terrier, Old English Sheepdog, Papillon, Pekingese, Pembroke Welsh Corgi, Red Tick Hound, Rhodesian Ridgeback, Saluki, Schipperke, Schnauzer, Shetland Sheepdog, Soft Coated Wheaten Terrier, Spanish Water Dog, Staffordshire Bull Terrier, Whippet.

Tableau IX (Table III, Article 1). Descriptive statistics of evaluated risk factors, including sex, age, coat color, DEA 1 status, region, for *Dal-* status. For each breed, one dog was randomly selected per breeder. For some dogs, the information was not available.

Evaluated Risk Factor	Dalmatian		Doberman Pinschers	
	n	% <i>Dal-</i>	n	% <i>Dal-</i>
Sex				
Male	31	9.7	158	34.2
Female	28	3.6	116	32.8
Age				
<1 year	13	23.1	18	50.0
1-5 years	37	5.4	140	32.1
>5 years	12	0.0	122	33.6
Coat color				
Black white	46	8.7	NA	NA
Liver white	13	7.7	NA	NA
Black	NA	NA	63	47.6
Red	NA	NA	27	51.9
Isabella	NA	NA	5	40.0
Blue	NA	NA	2	0.0
DEA 1				
Positive	59	8.5	52	36.4
Negative	1	0.0	111	60.4
Region				
Ontario (Can)	2	0.0	158	27.8
Quebec (Can)	11	0.0	108	44.4
USA	49	10.2	14	21.4

NA: not applicable

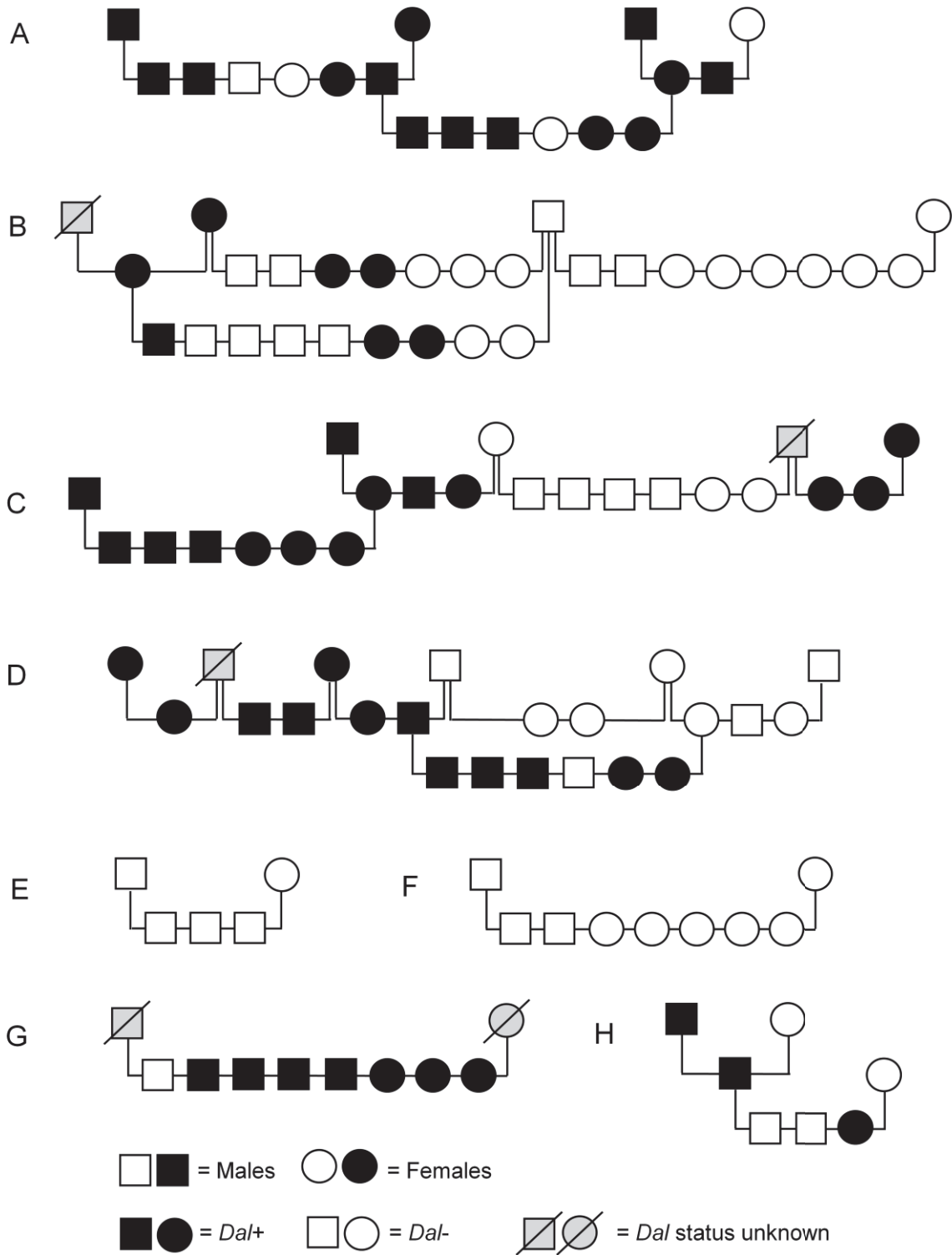
Tableau X (Table IV, Article 1). Proportion of *Dal+* and *Dal-* offspring depending on the *Dal* status of matings (*Dal+* x *Dal+*, *Dal+* x *Dal-* or *Dal-* x *Dal-*).

Matings		Number of offspring (n)	
<i>Dal</i> blood type of parents	n	<i>Dal+</i>	<i>Dal-</i>
<i>Dal+</i> x <i>Dal+</i>	3	15	3
<i>Dal+</i> x <i>Dal-</i>	8	19	14
<i>Dal-</i> x <i>Dal-</i>	5	0	23
Total	16	34	40

Figure Article 1

Figure 16 (Figure 1, Article 1). *Dal* blood typing results using the gel column technology yielded easily interpretable agglutination reactions, with either no (grade 0) or strongly positive agglutination reactions (3+ or 4+). Dog 1, 2, 4, 5 and 6 are *Dal*⁺ and Dog 3 is *Dal*⁻.

Figure 17 (Figure 2, Article 1). Pedigree analysis of the *Dal* phenotype in Dalmatian (A) and Doberman Pinscher families (B-H).



ARTICLE 2

Contribution

J'ai contribué à l'élaboration du protocole (80%) et à la réalisation des tâches techniques dont l'identification de chiens *Dal-* (100%), la sensibilisation (90%) et les épreuves de laboratoire post-sensibilisation (90%). J'ai participé à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit (90%).

Publication

Cet article a été invité pour soumission dans une édition spéciale du « Veterinary Pathology » sur la pathologie des maladies à médiation immunitaire chez les animaux. Cet article a été soumis le 31 août 2016 et il a été accepté pour publication avec corrections mineures. La version présentée inclut les corrections mineures suggérées.

Characterization of anti-*Dal* alloantibodies following sensitization of two *Dal*-negative dogs

Authors:

Stéphanie Goulet, DVM, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe

Marie-Claude Blais, DVM, DACVIM, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe

Short title: Sensitization of *Dal*-negative dogs

Keywords: Agglutination, blood type, crossmatch, dog erythrocyte antigen, transfusion

Abbreviations: 2-ME: 2-mercaptoethanol; CEGEP: Collège d'enseignement général et professionnel; CPD: Citrate Phosphate Dextrose; DEA: Dog Erythrocyte Antigen; DTT: Dithiothreitol; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid; PBS: Phosphate-Buffered Saline; PCV: Packed Cell Volume; RBC: Red Blood Cell; TS: Total Solids

Corresponding author: Marie-Claude Blais, Département de sciences cliniques, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, QC, Canada; e-mail: mc.blais@umontreal.ca.

This study was supported by the Association des médecins vétérinaires du Québec.

Presented, in part, at the Forum of the American College of Veterinary Internal Medicine, Indianapolis, IN, June 2015.

Acknowledgments: The authors thank the employees of the Division ferme et animaleries (FANI) of the Université de Montréal for their assistance.

Abstract

Since its discovery, the immunogenicity of the *Dal* blood type has not been further investigated. The aim of this study was to better characterize anti-*Dal* alloantibodies produced following sensitization of *Dal* negative dogs, notably their rate of appearance, the agglutination titer over time and their immunoglobulin class. A secondary objective was to obtain polyclonal anti-*Dal* alloantibodies to increase the availability of *Dal* blood typing. Of 100 healthy research Beagles tested, 2 *Dal* negative dogs were identified as recipients. Ten healthy dogs were investigated as potential blood donors. All dogs were extensively blood typed for DEA 1, 3, 4, 5 and 7, as well as for *Dal*. To avoid fluid overload, 15 ml/kg of blood was first collected from each recipient. Then, the recipients were transfused uneventfully with 10ml/kg of *Dal* positive, but otherwise compatible, packed red blood cells. Post-transfusion blood samples were collected routinely over a minimum of one year. All immunologic testing used a gel column technology. Anti-*Dal* alloantibodies were detected as early as 4 days post-transfusion and remained detectable 2 years post-transfusion, with maximum agglutination titers reached 1 and 2 months post-transfusion. The immunoglobulin class was IgG. The immunogenicity and clinical significance of the *Dal* blood type were confirmed. The results support the current literature recommending that previously transfused dogs be crossmatched starting 4 days post-transfusion and for the animal's life time. The polyclonal anti-*Dal* antibodies produced will allow blood typing of a significant number of dogs, especially transfused dogs facing blood incompatibilities and canine blood donors.

Introduction

Canine blood types were first identified due to the investigation of alloantibodies produced following experimental blood transfusions in dogs.^{7,31} Dogs do not possess naturally occurring red blood cell (RBC) antibodies of clinical importance.^{18,31,32} However, a blood transfusion containing RBC antigens lacking in the recipient may lead to sensitization, i.e. the production of alloantibodies directed against such antigens.^{3,7,37} Advancements in veterinary medicine have resulted in more frequent multiple blood transfusions in canine patients, increasing the risk of transfusion reactions including hemolytic immune-mediated reactions.

Current transfusion recommendations are to blood type canine recipients for DEA 1 prior to transfusion and to provide DEA 1 type specific blood. When typing is not available, use of DEA 1 negative blood is recommended because of its well-documented immunogenicity and its prevalence in the canine population. Several commercial in-house typing kits are available (DEA 1 Alvedia quick test, provided by Alvedia, Lyon, France; DiaMed-Vet ID Card DEA 1.1, provided by DiaMed (no longer available in North America), Cressier-sur-Morat, Switzerland; RapidVet-H Canine, provided by DMS Laboratories, Flemington, NJ; QuickVet DEA 1.1 Blood typing cartridge/analyzer, provided by Scandinavian Micro Biodevices ApS, Farum, Denmark).^{14,30} Except for DEA 1, canine blood typing relies on the availability of polyclonal reagent produced following the sensitization of negative dogs.¹⁹ Such availability may become problematic when dealing with a high frequency antigen. Currently, there is a limited accessibility to DEA 3, 5 and *Dal* reagents and a complete lack of accessibility to DEA 6 and 8 reagents, threatening the sustainability of canine blood typing.¹⁸ The last studies using DEA 6 and 8 reagents were published in 1986 and 1976 respectively.^{10,34}

Following a first blood transfusion, most authors recommend to crossmatch the recipient to possible blood donors starting 4 days post-transfusion and before every blood transfusion thereafter for the animal's life-time.^{4,13,14,17} Most experimental studies involving incompatible blood transfusions in dogs were published before 1970.^{8,27,32,37-39} Although several recent case reports have documented acute immune-mediated hemolytic transfusion reactions in dogs, notably DEA 1, DEA 4, and a common antigen not further characterized,^{6,14,24} little is known about the production of alloantibodies following sensitization, including the rate of appearance of alloantibodies and their persistence over time.

The *Dal* blood group is an immunogenic red cell antigen associated with the production of anti-*Dal* alloantibodies following a first incompatible *Dal* positive (*Dal*+) transfusion. The *Dal* antigen was identified a decade ago following a blood incompatibility in a *Dal* negative (*Dal*-) Dalmatian.³ *Dal*- dogs are rare and to date they have been identified in Dalmatians and in Doberman Pinschers¹⁵, but little is known about the clinical importance of anti-*Dal* alloantibodies.

We aimed to produce anti-*Dal* alloantibodies following sensitization of *Dal*- dogs in order to better characterize anti-*Dal* alloantibodies, notably the rate of appearance, the

agglutination titer over time and the immunoglobulin class and assess the stability of stored frozen aliquots of polyclonal anti-*Dal* alloantibodies in order to increase the availability of *Dal* blood typing.

Materials and Methods

Animals

In order to identify *Dal*- recipients and *Dal*+ donors, 100 healthy research/teaching Beagles located on the campus of the Faculté de médecine vétérinaire of the University of Montreal were investigated from January 2010 to July 2014. Ten blood donors (>25 kg, 2 to 8-year-old) already enrolled in the canine blood donor program of the University of Montreal were also blood typed extensively in November 2013.

For antibody detection, the plasma of interest was tested against a panel of fresh RBC (EDTA samples \leq 72 hours) from known *Dal*+ and *Dal*- dogs. More precisely, the RBC used on the panel were collected from known *Dal*+ blood donors of the canine blood donor program of the University of Montreal which had already been blood typed as part of a prevalence study.¹⁵ In addition, leftover EDTA canine blood samples from the laboratory were used as needed for additional *Dal*+ control. Finally, two previously identified *Dal*- dogs were used as negative controls.

The study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the University of Montreal.

Pre-sensitization steps

In order to identify *Dal*- recipients and their respective *Dal*+ donor, all dogs were typed for the *Dal*. Briefly, following centrifugation of the EDTA blood, 5 μ l of RBC concentrate were added to 0.5 ml of an antibody enhancement solution (Low Ionic Strength Saline [LISS], Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ, USA) in order to obtain a 0.8% RBC suspension. Fifty μ l of the RBC suspension and 25 μ l of the anti-*Dal* polyclonal antiserum (serum from a sensitized *Dal*- Doberman Pinscher, Tufts University, 2007) were placed on top of a gel column on a buffered saline ID-card (ID-MTS Micro Typing system, Ortho-Clinical Diagnostics, Pompano Beach, FL,

USA). The card was incubated at 37°C for 15 minutes (ID-incubator 37 S I, DiaMed Microtyping System, Switzerland) and then centrifuged for 10 minutes (ID-centrifuge 12 S II, DiaMed Microtyping System, Switzerland). Results were interpreted according to a standardized classification and graded from 1+ to 4+.^{3,16} *Dal*+ agglutination reactions are usually strong i.e. 3 to 4+.^{3,19} Only 2+ or greater agglutination reactions were considered positive.

To assure sensitization specifically for *Dal*, the identified *Dal*- recipients and 10 healthy blood donors were extensively blood typed for DEA 1,² using the Alvedia DEA 1 lab test (Alvedia, Lyon, France) and DEA 1.1 and 1.X reagents (ABRI, Stockbridge, MI, USA), as well as for DEA 3, 4, 5 and 7 (ABRI, Stockbridge, MI, USA; DEA 3 polyclonal antibodies are currently available for research purpose only) using tube and gel column techniques in parallel,¹⁹ according to manufacturer's instructions. Both recipients were blood typed DEA 1+ and 4+ (*Dal*-). The blood donor selected had to be incompatible only for *Dal*, i.e. *Dal*+, but compatible for all other blood types tested. As several blood donors respected this criteria, final selection was based on the donor availability and the strength of the agglutination reaction for *Dal*, i.e. dogs with the maximal agglutination reactions (4+) were selected, which most likely correlates with a higher erythrocyte antigen expression.² Consequently, the two healthy blood donors selected for the study were blood typed DEA 1-, DEA 4+ and *Dal*+ (4+ agglutination reaction).

Sensitization of Dal- dogs

The day before sensitization, blood was collected from the selected blood donor using the standardized procedure of the CHUV canine blood donor program and following owners' consent. A total of 450 ml +/- 15 ml of whole blood was collected from the jugular vein with a sterile vacuum system using appropriate collection bags (Teruflex blood bag system anticoagulant citrate phosphate dextrose (CPD) and Optisol (AS-5) red cell preservative, Terumo Corporation, Tokyo, Japan). The blood collected was centrifuged, and the plasma was separated and frozen for clinical purposes. Packed RBC were stored at 4°C until blood transfusion the day after.

In order to avoid fluid overload, 15 ml/kg of blood was collected prior to transfusion from each recipient following a mild sedation with butorphanol (Torbugesic-SA, Zoetis/Fort Dodge Animal Health, Iowa, USA) (0.2mg/kg IV) on day 0, i.e. November 2013 for dog #1 and January 2015 for dog #2. To mimic the exposure to red cell antigens from a standard blood

transfusion, a total of 10 ml/kg of *Dal*+ packed RBC from the selected donor were transfused over a maximum of 4 hours.

During the transfusion and every 4 hours for the following 24 hours, the dogs were closely monitored including rectal temperature, pulse, respiratory rate, mucous membranes and urine color (e.g. hematuria or hemoglobinuria). Packed cell volume, total solids and serum color were evaluated 2 hours post-transfusion for dog #1 and 1, 2 and 4 hours post-transfusion for dog #2. Hematology and biochemistry profiles, in addition to Coombs tests, were performed pre-transfusion and on several occasions post-transfusion. **(Table I)** More specifically, all Coombs tests were performed using antiserum to canine IgG, IgM and C3 (VMRD, Pullman, WA, USA), and occasionally performed in parallel with Lab test for canine direct antiglobulin test (Alvedia, Lyon, France), according to the manufacturers' instructions.

Persistence of transfused RBC

For dog #2, for each blood sample collected post-transfusion, its RBC were incubated with anti-*Dal* polyclonal reagent using the gel column technology in order to detect the *Dal*+ transfused RBC. This step was performed in duplicate using two anti-*Dal* polyclonal reagents (1- serum from a sensitized *Dal*- Doberman Pinscher, agglutination titer of 8, Tufts University; 2- serum from previously sensitized dog #1, agglutination titer of 32) until *Dal*+ RBC could no longer be detected.

Rate of appearance of alloantibodies and agglutination titers

To detect alloantibodies in the serum or the plasma of the recipients, gel column technology was used. The testing was performed daily for the first week and once a week for the first month until alloantibodies were detected. Briefly, serum or plasma was separated by centrifugation, then 25 µl were added to the incubation chamber in addition to 50 µl of a 0.8% specific RBC suspension. For the auto-control, RBC from the sensitized dog itself were used. For antibody detection, a panel of known *Dal*+ RBC from 2 to 3 dogs were used. Known *Dal*- RBC from 1 to 2 dogs were used as negative control. The gel column card was incubated at 37°C for 15 minutes then centrifuged for 10 minutes. Results were interpreted as follow: anti-*Dal* alloantibodies were considered present when the RBC were trapped on top or within the gel

column containing *Dal*+ RBC (graded 1+ to 4+). If the RBC were able to pass through the gel column forming a pellet at the bottom, the reaction was considered negative.

The agglutination titer is defined as the highest serum dilution where a positive agglutination reaction is observed and should be expressed as the whole number corresponding to the serum dilution. Once anti-*Dal* alloantibodies were detected, agglutination titers were assessed daily for the first week, once a week for the first month, and then once a month for 1 year. In addition, the agglutination titers of dog #1 were reassessed at 1.4 and 2 years post-transfusion. The agglutination titers were determined using a two-fold dilution of the recipients' serum or plasma in phosphate-buffered saline (PBS), against known *Dal*+ RBC, similarly to the antibodies detection steps described above. This step was repeated in duplicate or triplicate to assure repeatability of the results. (**Figure 1**)

Immunoglobulin class

In order to determine the immunoglobulin class, agglutination titer was determined following treatments with sulfhydryl reagents (dithiothreitol (DTT) and 2-mercaptoethanol (2-ME)), which break the disulfide bonds of IgM and abolish their agglutinating and complement-binding activities. For dog #1, a frozen serum aliquot collected 12 weeks post-transfusion was tested 8 weeks later. For dog #2, as soon as antibodies were detected, i.e. day 21 post-transfusion and up to 8 weeks post-transfusion, fresh serum was tested. Serum was incubated in a 1:1 ratio with either PBS, DTT 0.01M or 2-ME 0.1M.^{11,14} The suspensions were incubated at 37°C for 60 minutes, then the agglutination titer was determined as described above.

Concordance of Dal blood typing

To confirm that the antibody produced by the recipient was specific for *Dal*, the sera of both recipients were compared to the anti-*Dal* polyclonal serum from the index dog identified at Tufts University in 2007. In other words, *Dal* typing of 65 and 16 dogs, was performed in duplicate using the index anti-*Dal* polyclonal serum as well as the frozen serum from dog #1 and 2, respectively.

Stability through freezing

At each time point when blood was collected, serum aliquots were frozen at -20°C. Agglutination titers were performed in triplicate on frozen serum aliquots 6 months post-transfusion to evaluate the stability of the polyclonal anti-*Dal* antibodies through freezing.

Results

Pre-sensitization steps

Out of 100 Beagles, only 2 *Dal*⁻ Beagles were identified (i.e. 98/100 Beagles were *Dal*⁺) and they were selected as recipients. Dog #1, a 2-year-old female spayed Beagle, was identified from the CEGEP of Saint-Hyacinthe teaching colony on June 2013. Dog #2, a 3-year-old female intact Beagle from the University of Montreal teaching and research colony was identified on July 2014. Both dogs were originally acquired from Marshall BioResources (North Rose, NY, USA); their closest ancestor shared was a great, great grandsire. Both recipients were healthy based on physical exam, hematology and biochemistry profiles.

*Sensitization of *Dal*⁻ dogs*

Transfusions from the *Dal*⁺ donors to *Dal*⁻ recipients were uneventful with no clinical signs of acute or delayed transfusion reaction observed. Overall, PCV and TS remained stable overtime. No evidence of intravascular hemolysis was noted on serum or urine evaluation. Laboratory results were all within normal range including bilirubin, and all Coombs tests remained negative.

Persistence of transfused RBC

During the 2 weeks following sensitization (samples collected on day 1-10, and on day 14), *Dal*⁺ transfused RBC were detected in the blood sample of dog #2. The agglutination reaction was weak (1+), but detected on days 5, 6, 9, 10 and 14 with anti-*Dal* reagent #1 and detected consistently on days 1 through 10 and 14 with anti-*Dal* reagent #2. However, the agglutination reaction was no longer detected using either reagents on day 21 indicating most likely that no transfused RBC were still present in circulation. (**Figure 2**)

Rate of appearance of alloantibodies and agglutination titers

A positive anti-*Dal* agglutination reaction was first observed on day 4 for dog #1 (titer of 1; 2+ agglutination reaction using undiluted serum) and on day 21 for dog #2 (titer of 64; 4+ agglutination reaction using undiluted serum).

For dog #1, the agglutination titer reached a maximum of 64 eight weeks post-transfusion, decreased to 8 one year later and to 2 two years later. For dog #2, the maximum agglutination titer reached was 1024 four weeks post-transfusion and decreased to 32 one year later. (**Figure 3**) To be noted that once the maximal agglutination titer was reached, all agglutination reactions using undiluted serum/plasma of the recipients yielded 4+ reactions.

Immunoglobulin class

All agglutination titers remained unchanged following treatment with either DTT or 2-ME, which implies that the causative immunoglobulins were not destroyed by the sulfhydryl reagents, i.e. that anti-*Dal* alloantibodies are IgG.

*Concordance of *Dal* blood typing*

All dogs typed in duplicate with either serum from dog #1 or dog #2 had concordant results (*Dal*+ or *Dal*-) (**Table II**) and similar strength of agglutination reactions when positive (i.e. only 3+ or 4+ reactions were observed).

Stability through freezing

For dog #1, anti-*Dal* alloantibodies produced between days 4 and 21 (titer between 1 and 4; agglutination reactions graded 2+ to 3+ with undiluted serum) were no longer detected when tested 6 months post-transfusion. However, freezing did not cause any decrease in agglutination titer of anti-*Dal* antibodies collected on day 28 and thereafter. For dog #2, freezing didn't cause any change in the agglutination titer for all aliquots tested. In all cases, once agglutination titer reached 4+ reaction, aliquots were stable over a 6 month freezing period.

Discussion

Our study highlights the immunogenicity of the *Dal* blood type with the production of anti-*Dal* alloantibodies detectable as soon as 4 days post-transfusion and the capacity to shorten lifetime of transfused RBC. Anti-*Dal* alloantibodies remained detectable as long as 2 years post-transfusion, supporting that they are long lasting. These results are in agreement with the standard of care current literature recommending that, to insure blood compatibility, crossmatching should be performed as early as 4 days following a first blood transfusion and prior to any blood transfusion thereafter for the animal's life.^{4,13,14,17}

Acute immune-mediated hemolytic reactions are characterized by clinical signs that usually develop within minutes to hours after a transfusion is started and generally resolve within 24 hours. These clinical signs vary and may include fever, incontinence of urine and feces, vomiting, salivation, lethargy, icterus, tachypnea, hemoglobinemia, bilirubinemia, pigmenturia, hives and tremors, but are rarely fatal.^{6,14,24,37} As dogs do not possess clinically important naturally occurring alloantibodies^{18,31,32} and as the recipients had never been previously transfused, it is not surprising that both first transfusions of unmatched packed RBC in our study were well tolerated and that no clinical signs of acute hemolysis were detected. For ethical reasons, a second *Dal*-incompatible transfusion was not administered in our study limiting some pertinent clinical data. In the literature, all dogs described with an acute immune-mediated hemolytic transfusion reaction had already been sensitized by a first incompatible blood transfusion. However, acute hemolytic transfusion reaction following a first blood transfusion have been reported and are most likely attributable to improper storage or handling of the units or sepsis.^{5,29}

During and following the *Dal*-mismatched blood transfusions, no signs of delayed transfusion reactions were observed despite close monitoring and laboratory tests. The definition of a delayed hemolytic transfusion reaction tends to vary between authors. Overall, 2 criteria need to be respected: 1- the reaction/adverse event should occur more than 24 hours post-transfusion and 2- an increase in the speed of RBC destruction should be detected by either a rapid drop of PCV or clinical/laboratory signs of intravascular or extravascular hemolysis.^{1,9,12-14,22,33} Despite the detection of alloantibodies as early as Day 4 in dog #1, we were not able to document a delayed hemolytic transfusion reaction using typical clinical and laboratory data. In

fact, the destruction of *Dal*+ RBC could not be indirectly assessed despite repeated PCV and bilirubin measurements overtime. Similarly, all Coombs tests remained negative even once anti-*Dal* alloantibodies were detected. Using the gel column technology, we were able to document in dog #2 the presence of *Dal*+ RBC in circulation until Day 14. However, *Dal*+ RBC could no longer be detected on Day 21 post-transfusion, suggesting that *Dal*+ RBC had been cleared from the recipient's bloodstream or at least had fell below the level of detection. Interestingly, this coincided with the first detection of anti-*Dal* alloantibodies in this recipient.

Using an in vitro biotinylation technique followed by autologous transfusions, the mean RBC lifespan in Beagles (n=3), was determined to be 104.3 ± 2.2 days.²⁶ Comparably, the half-life of compatible transfused RBC is 21 to 43 days and therefore a transfusion is expected to last 4 to 6 weeks.^{1,23} Similarly, during the course of several experiments focused on the life span of donor RBC in previously untransfused recipients, Swisher and Young reported in 1961 evidence of an abrupt increase in the rate of RBC destruction between days 14 and 21 post-transfusion.³¹ However, the method used to monitor RBC destruction was not mentioned. In addition to the presence/production of alloantibodies leading to an immune-mediated hemolysis of transfused RBC, many factors can be responsible for a shortened RBC life span post-transfusion, notably inappropriate storage conditions of blood pre-transfusion and transfusion techniques.^{23,29,37} In our study, storage conditions and transfusion techniques followed strict standardized protocols and the packed RBC transfused were collected the day before the transfusion. As the loss of detection of *Dal*+ transfused RBC after day 21 coincided with the initial detection of anti-*Dal* alloantibodies, an immune-mediated destruction of the *Dal*+ RBC is quite plausible. That said, the use of more sensitive techniques to assess RBC survival time post-transfusion, e.g. chromium-51 or biotin labelled RBC would have been ideal,^{20,21,25,28,35} but were not available for this study. In that regard, the gel column technology proved to be a straightforward, unexpensive and repeatable alternative.

The transfusion of *Dal*+ packed RBC in *Dal*- recipients induced an important antibody production with a maximum agglutination titer as high as 1024, which confirms the vigorous immunogenicity of the *Dal* antigen. The highest reported agglutination titer was also 1024, but was obtained in an experiment study where most DEA 1- dogs were immunized repeatedly using multiple 5 ml DEA 1 incompatible transfusions.⁷ To our knowledge, the highest documented agglutination titer responsible for an acute hemolytic transfusion reaction in a clinical context

was 16 using the tube technique in a dog receiving immunosuppressive drugs.^{6,14,24} Similarly, the original *Dal* study reported an agglutination titer between 8 to 16 in an anemic Dalmatian suffering from chronic kidney disease.³ It should be noted that the gel column technology used in this study has been shown to be more sensitive technique than the tube assay used in previous studies.³⁶ In the present study, the anti-*Dal* immunoglobulins produced were of the IgG class, which is in agreement with the original publication on *Dal* and to other known blood group related alloantibodies described in dogs, although IgM have been described in other species.^{3,14}

The immunogenicity of blood group antigens is quite variable. In experimental studies, some antigens, like DEA 1, are known to produce strong agglutination titers that can clearly result in acute hemolytic transfusion reactions. Other antigens, like DEA 3 and 5, have been reported to produce weak agglutination titers mostly associated with shortened RBC survival in previously sensitized dogs.^{7,32} Generally, the higher the titer, the more severe the hemolytic transfusion reaction.¹ That said, the immunogenicity of the *Dal* was expressed with significant variation between the 2 recipients, notably in the rate of appearance of antibodies (dog #1: day 4; dog #2: day 21), but mostly with the maximum agglutination titer observed (64 and 1024 for dog #1 and #2, respectively) and the moment when it was reached (8 and 4 weeks post-transfusion for dog #1 and #2, respectively). The variable degree of sensitization of the recipients may be explained by numerous factors related to the recipient, including their age, immune system and hormonal status (intact versus spayed) as well as a multitude of environmental or genetic factors. In addition, two different blood donors were used and their level of erythrocytic antigen expression may have differed. For instance, it has been documented that dogs may express different levels of DEA 1 antigens.² However, methods to evaluate the level of antigen expression, e.g. flow cytometry, were not available for the present study. In order to limit the variation of antigen expression, both blood donors were chosen as they showed the strongest agglutination reaction, that is 4+. In addition, both recipients received the same quantity of packed RBC within the same timeframe (10ml/kg within 4 hours to mimic a real blood transfusion). This highlights an obvious limitation of our study. In a clinical context, patients receiving blood transfusions are often in a critical condition requiring multiple treatments including immunosuppressive drugs. Thus, the immunogenicity of the *Dal* observed in the present study is specific to a particular research context and the data cannot be extrapolated to other blood groups and to sick animals, notably if immunosuppressed. For

instance, using healthy dogs may over-estimate the immunogenicity of the *Dal* compared to a clinical setting.

All alloantibodies produced 21 days post-sensitization and thereafter remained stable following a 6-month freezing period, allowing banking of anti-*Dal* sera for future *Dal* blood typing. It is unclear why the same freezing period caused the antibodies produced before 21 days in dog #1 to be no longer detectable despite the fact that they had been originally detected in duplicate. Their agglutination titer was certainly less and therefore possibly their clinical significance.

The lack of access to DEA 6 and 8 could have limited the specificity of the sensitization for *Dal*. Despite their unavailability, both polyclonal alloantibodies produced showed 100% concordance with the original serum from the index dog and easy interpretable *Dal* typing results, i.e. strong negative (0) or strong positive (3 to 4+) agglutination reactions. Nevertheless, the lack of typing reagents, even for research purposes, highlights an existing problematic in veterinary transfusion medicine: by relying solely on polyclonal alloantibodies, the sustainability of blood typing is in peril and comparison studies between already reported blood groups or newly described ones are already impossible. Fortunately, this study led to the production and banking of a considerable amount of anti-*Dal* sera, although not generating a long term solution.

To date, *Dal*⁻ dogs have only been identified in Dalmatians and Doberman Pinschers with a respective prevalence in recent studies of 19.2% (n=26) and 37% (n=310), respectively.^{3,15} Surprisingly, our study identified *Dal*⁻ dogs in an additional breed, i.e. Beagle. In opposition, all dogs of other breeds tested are *Dal*⁺, which means the vast majority of blood donors are *Dal*⁺.¹⁵ Thus, *Dal*⁻ individuals face a high risk of transfusion incompatibility when in need of blood, and when requiring further blood transfusion, compatible *Dal*⁻ blood may be almost impossible to find. The polyclonal anti-*Dal* antibodies produced in this study will permit *Dal*⁻ blood typing for a significant number of dogs, including canine blood donors and previously transfused dogs with incompatible crossmatches prior to subsequent blood transfusion.

As mentioned, the availability to *Dal* blood typing remains limited by the use of polyclonal reagent produced following sensitization of a rare *Dal*⁻ dog. When using a gel column technology, the results are easily interpretable (*Dal*⁺ agglutination reactions are usually strong i.e. 3 to 4+), but the equipment is usually limited to veterinary teaching hospitals, commercial

blood banks and laboratories. The production of a monoclonal antibody would ensure anti-*Dal* reagent sustainability, and could lead to more user friendly typing kits allowing for better description of the *Dal* prevalence in the general canine population, and for characterization of the *Dal* red cell antigens on a molecular level.

Conclusions

Following sensitization of 2 *Dal*- dogs, the strong immunogenicity of *Dal* was documented with anti-*Dal* alloantibodies detected as early as 4 days post-transfusion, maximum titers reached 1 and 2 months post-transfusion and anti-*Dal* alloantibodies still observable up to 2 years post-transfusion. Our results support that to insure blood compatibility, crossmatching should be performed as early as 4 days following a first blood transfusion and thereafter prior to any blood transfusion during the animal's life. Although a hemolytic transfusion reaction was not clinically appreciated, the transfusion of *Dal*-incompatible packed RBC resulted in a shorten RBC lifespan. Given the very high titers of anti-*Dal* alloantibodies produced by the *Dal*-recipients, the likelihood of an acute hemolytic transfusion reaction is considered likely if subsequent incompatible blood transfusions were administered. This poses a considerable challenge for the rare *Dal*- dogs that are almost certainly going to be sensitized via a first blood transfusion, and for which *Dal*-compatible blood may be very difficult to find thereafter. A considerable amount of anti-*Dal* polyclonal reagents stable through freezing was banked for further clinical use and will allow to more readily identify such patients and compatible canine blood donors.

References

1. Abrams-Ogg ACG. Practical blood transfusion. In: Day MJ, Mackin A, Littlewood JD, eds. *BSAVA Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. Gloucester (UK): British Small Animal Veterinary Association; 2000.
2. Acierno MM, Raj K, Giger U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analyzed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. *J Vet Intern Med* 2014;28:592-598.
3. Blais MC, Berman L, Oakley DA, et al. Canine Dal blood type: A red cell antigen lacking in some Dalmatians. *J Vet Intern Med* 2007;21:281-286.
4. Boysen SR, Blais MC. Cross-Match and Blood Typing. In: Cote E, ed. *Clinical Veterinary Advisor: Dogs and Cats, 3rd ed.* St.-Louis, MO Elsevier; 2015:1132-1133.
5. Bruce JA, Kriese-Anderson L, Bruce AM, et al. Effect of premedication and other factors on the occurrence of acute transfusion reactions in dogs. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2015;25:620-630.
6. Callan MB, Jones LT, Giger U. Hemolytic transfusion reactions in a dog with an alloantibody to a common antigen. *J Vet Intern Med* 1995;9:277-279.
7. Christian RM, Ervin DM, Young LE. Observations on the in-vitro behavior of dog isoantibodies. *J Immunol* 1951;66:37-50.
8. Christian RM, Stewart WB, Yuile CL, et al. Limitation of hemolysis in experimental transfusion reactions related to depletion of complement and isoantibody in the recipient; observations on dogs given successive transfusions of incompatible red cells tagged with radioactive iron. *Blood* 1951;6:142-150.
9. Couto CG. Anemia. In: Nelson RW, Couto CG, eds. *Small Animal Internal Medicine, 3rd ed.* St.-Louis, MO: Mosby; 2003:1156-1169.
10. Ejima H, Kurokawa K, Ikemoto S. Phenotype and gene frequencies of red blood cell groups in dogs of various breeds reared in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi* 1986;48:363-368.
11. Friday J. Methods section 3: Antibody detection, identification, and compatibility Testing. In: *American association of blood banks technical manual, 16th ed.* Bethesda, MD: 2008.
12. Gibson G. Transfusion medicine. In: King L, Boag A, eds. *BSAVA Manual of Canine and Feline Emergency and Critical Care, 2nd ed.* Gloucester (UK): BSAVA; 2007:215-227.
13. Gibson G, Abrams-Ogg ACG. Canine transfusion medicine. In: Day MJ, Kohn B, eds. *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine, 2nd ed.* Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2012:289-307.
14. Giger U, Gelens CJ, Callan MB, et al. An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog. *J Am Vet Med Assoc* 1995;206:1358-1362.

15. Goulet S, Blais MC, Abrams-Ogg ACG. Prevalence of the Dal blood type in Doberman Pinschers and in canine blood donors. In: ACVIM Forum, Nashville, TN 2014.
16. Harmening DM, Walker PS. Alternative technologies and automation in routine blood banking testing, Chapter 15. In: *Modern Blood Banking & Transfusion Practices, 5th ed* 2012:293-302.
17. Hohenhaus A. Blood transfusions, component therapy, and oxygen-carrying solutions. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine, 7th ed*. St.-Louis, MO: Saunders Elsevier; 2010:537-544.
18. Hohenhaus AE. Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals. *Transfus Med Rev* 2004;18:117-126.
19. 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.
20. Korell J, Coulter CV, Duffull SB. Evaluation of red blood cell labelling methods based on a statistical model for red blood cell survival. *J Theor Biol* 2011;291:88-98.
21. Korell J, Vos FE, Coulter CV, et al. Modeling red blood cell survival data. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2011;38:787-801.
22. Lanevski A, Wardrop KJ. Principles of transfusion medicine in small animals. *Can Vet J* 2001;42:447-454.
23. McDevitt RI, Ruaux CG, Baltzer WI. Influence of transfusion technique on survival of autologous red blood cells in the dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2011;21:209-216.
24. Melzer KJ, Wardrop KJ, Hale AS, et al. A hemolytic transfusion reaction due to DEA 4 alloantibodies in a dog. *J Vet Intern Med* 2003;17:931-933.
25. 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.
26. Novinger MS, Sullivan PS, McDonald TP. Determination of the lifespan of erythrocytes from greyhounds, using an in vitro biotinylation technique. *Am J Vet Res* 1996;57:739-742.
27. Ottenberg R, Kaliski DJ, Friedman SS. Experimental agglutinative and hemolytic transfusions. *J Med Res* 1913;28:141-163.
28. Panzer S, Puchler K, Mayr WR, et al. Haemolytic transfusion reactions due to HLA antibodies. A prospective study combining red-cell serology with investigations of chromium-51-labelled red-cell kinetics. *Lancet* 1987;1:474-478.
29. 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.

30. Seth M, Jackson KV, Winzelberg S, et al. Comparison of gel column, card, and cartridge techniques for dog erythrocyte antigen 1.1 blood typing. *Am J Vet Res* 2012;73:213-219.
31. Swisher SN, Young LE. The blood grouping systems of dogs. *Physiol Rev* 1961;41:495-520.
32. Swisher SN, Young LE, Trabold N. In vitro and in vivo studies of the behavior of canine erythrocyte-isoantibody systems. *Ann N Y Acad Sci* 1962;97:15-25.
33. Tocci LJ. Transfusion medicine in small animal practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010;40:485-494.
34. Vriesendorp HM, Albert ED, Templeton JW, et al. Joint report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics. *Transplant Proc* 1976;8:289-314.
35. Wardrop KJ, Tucker RL, 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.
36. Weisbach V, Ziener A, Zimmermann R, et al. Comparison of the performance of four microtube column agglutination systems in the detection of red cell alloantibodies. *Transfusion* 1999;39:1045-1050.
37. Young LE, Ervin DM, Yuile CL. Hemolytic reactions produced in dogs by transfusion of incompatible dog blood and plasma. I. Serologic and Hematologic Aspects. *Blood* 1949;4:1218-1231.
38. Young LE, O'Brien WA, Swisher SN, et al. Blood groups in dogs--their significance to the veterinarian. *Am J Vet Res* 1952;13:207-213.
39. Yuile CL, Van Zandt TF, Ervin DM, et al. Hemolytic reactions produced in dogs by transfusion of incompatible dog blood and plasma. II. Renal Aspects Following Whole Blood Transfusions. *Blood* 1949;4:1232-1239.

Tables Article 2

Tableau XI (Table I, Article 2). Laboratory testing performed on several occasion post-transfusion in dog #1 and dog #2.

	Dog #1	Dog #2
Hematology	D0, Wk10	D0-7
Biochemistry Bilirubin	D0, D28, Wk10 D0-D7	D0, D7 D0-7, D14, D21, D28, once a month thereafter (1 year)
Coombs tests	D0, D5, D6, Wk10	D0-7, D14, D21, D28, once a month thereafter (1 year)

D: Day; Wk: Week

Tableau XII (Table II, Article 2). *Dal* typing using serum from dog #1 and serum from dog #2 in parallel with serum from the index dog showing 100% concordant results.

	Serum from index dog	
	<i>Dal</i> + (n)	<i>Dal</i> - (n)
Serum from dog#1		
<i>Dal</i> + (n)	40	0
<i>Dal</i> - (n)	0	25
Serum from dog#2		
<i>Dal</i> + (n)	12	0
<i>Dal</i> - (n)	0	4

Figures Article 2

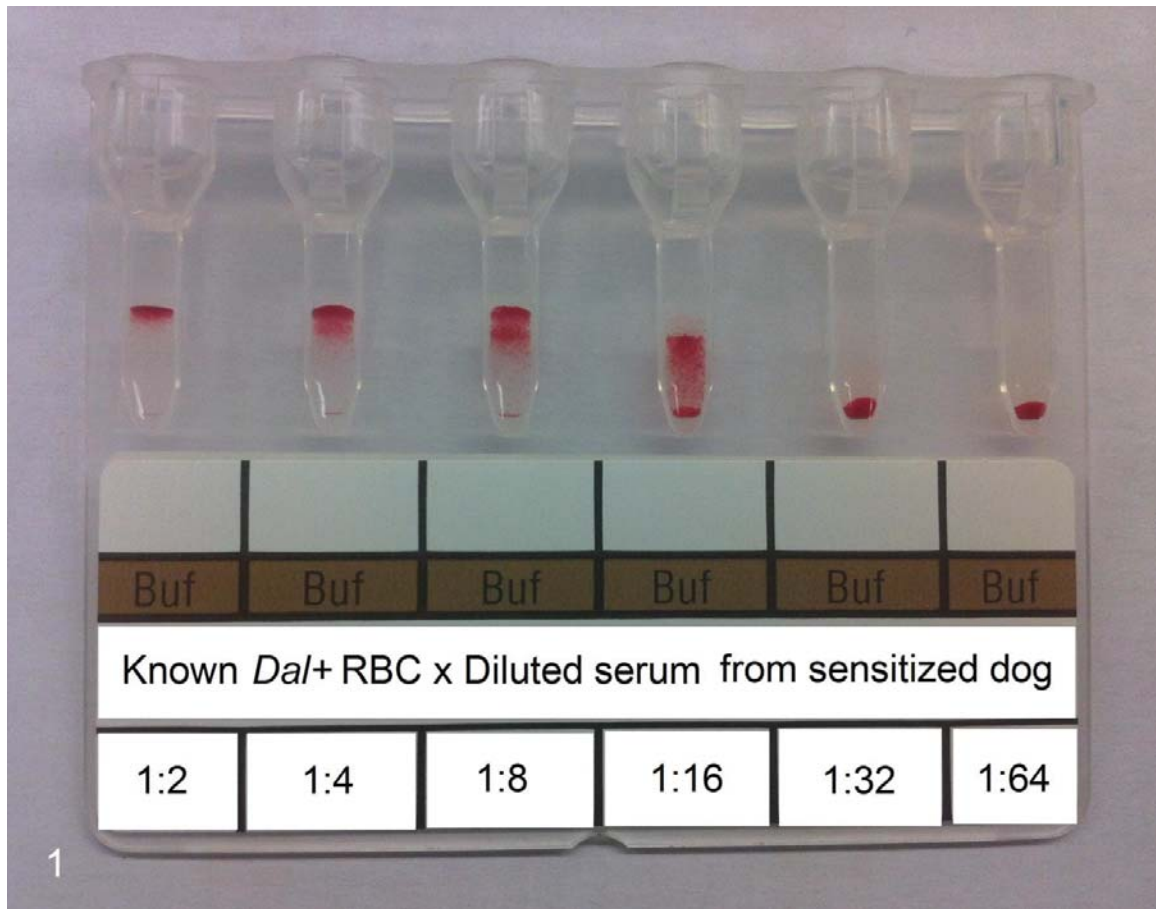


Figure 18 (Figure 1, Article 2). Example of agglutination titer (1:16) with a two-fold serum dilution and known *Dal*+ RBC. Fresh serum from dog #1 at 5 months post-transfusion.

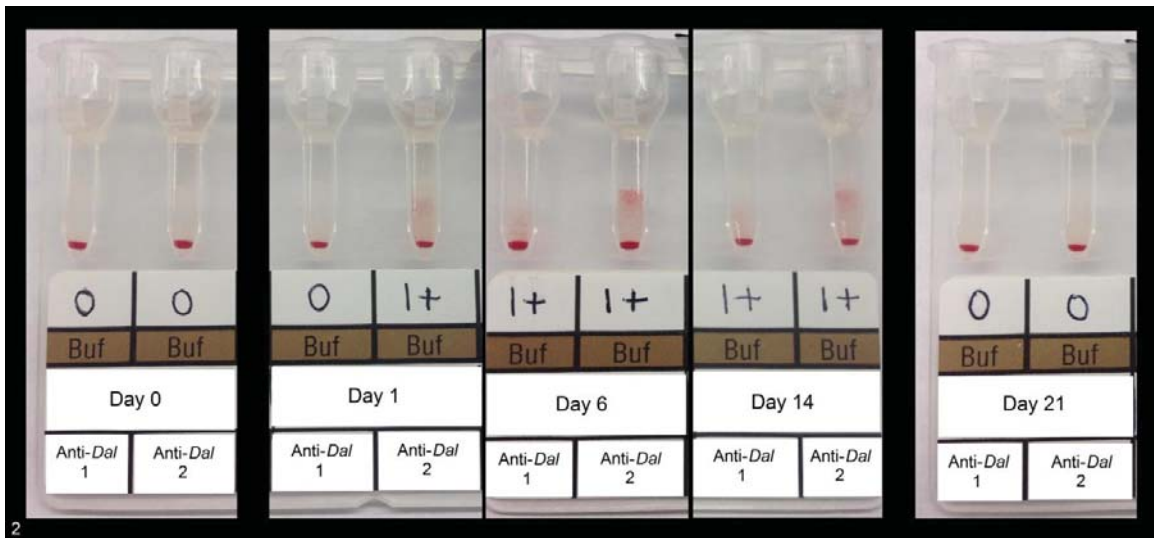


Figure 19 (Figure 2, Article 2). Persistence of transfused RBC in dog #2 assessed by gel column technology in duplicate with anti-Dal reagents on several occasions post-transfusion. No agglutination reaction was detected pre-transfusion (Day 0). A weak agglutination reaction (1+) was detected on Day 1 to 10 and Day 14, but not detected anymore on Day 21.

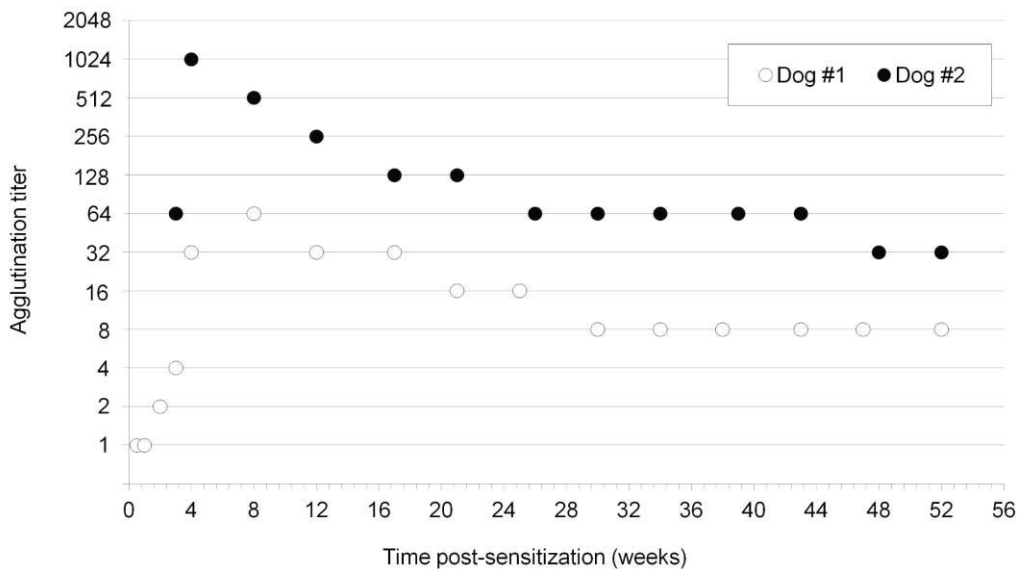


Figure 20 (Figure 3, Article 2). Graph showing agglutination titers post-sensitization in dog#1 and dog #2 over a 1 year period (52 weeks).

Discussion générale

Initialement, l'antigène érythrocytaire *Dal* avait été décrit chez un Dalmatien anémique *Dal-* par l'identification d'allo-anticorps anti-*Dal* produits suite à une première transfusion incompatible *Dal+*.⁹ Peu d'informations étaient connues à propos du *Dal* concernant sa prévalence dans la population canine et l'importance clinique des allo-anticorps anti-*Dal*.

En utilisant une technologie sur colonne de gel et un anticorps polyclonal, nous avons typé plus de 1000 chiens à travers l'Amérique du Nord. Les résultats des typages étaient soit fortement *Dal+* ou clairement *Dal-* et aucun anticorps anti-*Dal* naturel n'a été identifié chez les chiens *Dal-* testés. Notre étude est la première à identifier des individus *Dal-* chez des races autres que Dalmatien. Nous avons identifié plusieurs Doberman Pinschers et Shih Tzu, mais aussi 2 Beagles, 1 Lhasa Apso, 1 Bichon Frisé et 3 chiens de race croisée. Le *Dal* était suspecté d'être un antigène à haute fréquence, mais il s'agit plutôt d'un groupe sanguin à part entière. Les individus *Dal-* ne sont pas exclusifs aux Dalmatiens et le *Dal* devrait être investigué en cas d'incompatibilité transfusionnelle chez toute autre race.

L'analyse du pedigree a montré un mode d'héritabilité autosomal dominant du phénotype *Dal+* et l'analyse des facteurs de risque n'a montré aucune relation entre les statuts *Dal* et DEA 1. Ces trouvailles concordent avec ce qui est rapporté dans la littérature, puisque les groupes sanguins canins montrent une héritabilité autosomale dominante et ils sont hérités de façon indépendante.^{4,32,35,41} Les résultats du typage sanguin *Dal* nettement négatif (0) ou fortement positif (3+ ou 4+) supportent un modèle simple à 2 allèles.

Nous avons confirmé l'immunogénicité du *Dal* avec la détection d'allo-anticorps acquis aussi tôt que 4 jours post-transfusion et l'obtention d'un titre d'agglutination maximal de 1 :1024. De plus, les anticorps anti-*Dal* semblent diminuer la durée de vie des globules rouges transfusés. Les anticorps anti-*Dal* étaient toujours détectables 2 ans post-transfusion. Ces résultats supportent les recommandations actuelles recommandant qu'un crossmatch soit effectué à partir de 4 jours suivant une première transfusion et ensuite pour toute la vie de l'animal.^{59,60,68}

Des chiens *Dal-* ont été identifiés au sein de 6 races pures pour lesquelles aucune origine génétique commune n'a été décrite. Cependant, les races Lhasa Apso et les Shih Tzu sont toutes deux originaires du Tibet selon la Fédération cynologique internationale.^p Étant donné sa présence chez plusieurs races pures sans origine commune, le *Dal* semble être issu d'un vieil héritage évolutionnaire et la présence de chiens *Dal-* chez d'autres races est très probable.

Nous avons identifié plusieurs chiens *Dal-* chez les Dalmatiens et les Doberman Pinschers, mais aussi de façon inattendue chez plusieurs Shih Tzus en investiguant un cas d'incompatibilité transfusionnelle. De façon tout aussi inattendue, nous avons identifié 2 Beagles *Dal-* au sein de 2 colonies de recherche et d'enseignement appartenant à la Faculté de médecine vétérinaire et au CÉGEP Saint-Hyacinthe. Bien que seulement quelques Lhasa Apso et Bichon Frisé aient été typés, nous avons identifié 1 chien *Dal-* par race, ce qui mérite certainement plus d'investigation au sein de ces races. De plus, une population homogène de Beagles de recherche a été échantillonnée dans notre étude. Ces chiens provenaient tous du même centre d'élevage^q et les 2 chiens *Dal-* identifiés possédaient un ancêtre commun. Ainsi, une investigation au sein d'une population plus hétérogène, par exemple les Beagles présentés en clinique, mérite également davantage d'investigation.

Lors de sa découverte, les auteurs suspectaient que le *Dal* soit un antigène à haute fréquence puisque sa prévalence était plus de 90% dans la population testée et que le *Dal* était manquant seulement chez les Dalmatiens.⁹ Selon la Société internationale de transfusion sanguine (ISBT) en médecine humaine, les critères que doivent respecter un antigène pour être reconnu à haute fréquence sont : 1- avoir une incidence de > 90% dans la plupart des populations testées, 2- être distinct des autres antigènes à haute fréquence et 3- être manquant chez un minimum de 2 enfants issus de mêmes parents, donc le phénotype négatif est transmis génétiquement.⁷⁷⁻⁷⁹ Dans notre étude, la prévalence du *Dal* est de plus de 90% dans plusieurs populations testées, mais la taille des échantillons est souvent faible. Aussi, nous avons montré que le phénotype négatif est transmis génétiquement. Cependant, les individus *Dal-* sont plus communs que l'on croyait, puisque des centaines de chiens *Dal-* ont été identifiés chez 6 races pures différentes dans notre étude. Ainsi, le *Dal* semble davantage correspondre à un système

^p Fédération cynologique internationale. <http://www.fci.be/fr/>

^q Marshall BioResources, North Rose, NY, USA

de groupe sanguin plutôt qu'un antigène à haute fréquence. Toutefois, une étude de prévalence impliquant beaucoup plus d'individus par race est nécessaire pour confirmer cette hypothèse.

L'importance du *Dal* est significative chez les Doberman Pinschers puisque 42% des chiens recrutés dans notre étude sont *Dal*-. De plus, la haute prévalence de la maladie de von Willebrand chez cette race augmente leur risque de perdre du sang.⁸⁰ Une perte significative de sang peut nécessiter des transfusions sanguines multiples, incluant des concentrés de globules rouges en plus d'une source de facteur de von Willebrand via le plasma et/ou le cryoprécipité,^{81,82} augmentant leurs chances de sensibilisation pour le *Dal*. Malheureusement, notre étude a montré que les donneurs de sang *Dal*- sont très rares dans les populations testées, puisque seulement 1 chien de race mixte et 5 Doberman Pinschers ont été identifiés parmi les chiens recrutés.

Les Doberman Pinschers et les Dalmatiens sont rarement recrutés dans les banques de sang.^{9,15} Dans notre étude, les banques de sang participant à notre projet étaient au courant de l'emphase que nous portions sur ces deux races. Pourtant, seulement 1 Dalmatien et 16 Doberman Pinschers étaient déjà donneurs de sang. La rareté des Dalmatiens peut être expliquée par leur poids généralement limite par rapport aux critères de recrutement (> 23 kg recommandé en utilisant les sacs de collection standards)^{60,r,s} et leur tendance à montrer un tempérament peu collaboratif en clinique. Pour les Doberman Pinschers, la haute prévalence de la maladie de von Willebrand et le coût des tests de détection associés peuvent expliquer pourquoi ils sont rarement enrôlés comme donneurs de sang. La rareté de Doberman Pinschers et des Dalmatiens comme donneurs de sang amplifie la rareté du sang *Dal*- dans les banques de sang. Ceci implique une sensibilisation presque certaine des patients *Dal*- recevant une transfusion de globules rouges et conséquemment un risque de réaction hémolytique à médiation immunitaire lors de transfusions subséquentes. À titre d'exemple, puisque 43% des Doberman Pinschers sont *Dal*-, si le statut *Dal* du donneur et du receveur est inconnu, 42,8% des Doberman Pinschers sont à risque d'être sensibilisés si un donneur de sang est sélectionné au hasard et 24,5% si le donneur est un Doberman Pinscher. Bien sûr, les autres races chez qui des

^r Canadian Animal Blood Bank (CABB). <http://www.canadiananimalbloodbank.ca/index.php/en/pet-owners/our-blood-donors>

^s Centre hospitalier universitaire vétérinaire (CHUV). <http://chuv.umontreal.ca/le-chuv/hopital-des-animaux-de-compagnie/services-offerts-a-lhopital-des-animaux-de-compagnie/banque-de-sang/>

chiens *Dal-* ont été identifiés ne sont pas couramment recrutées dans les banques de sang étant donné qu'il s'agit de petites races (Shih Tzu, Beagle, Lhasa Apso et Bichon Frisé).

Étant donné le caractère dominant du phénotype *Dal+* et la problématique entourant la rareté des chiens *Dal-* dans la population canine générale, cette étude montre que les chiens de la même portée (ou s'ils ne sont pas disponibles les chiens de la même famille ou de la même race) sont considérés une source potentielle de sang *Dal-* compatible.^{9,83} En effet, la plupart des chiots de la même portée inclus dans notre étude avaient tendance à avoir le même statut *Dal* (**Tableaux VII**). Si nécessaire, des chiens de petite race pourraient aussi donner une quantité de sang sécuritaire pour leur poids en utilisant un système de collecte similaire à celui qui est généralement utilisé chez le chat.^{52,60} Lorsqu'on utilise de tels donneurs, il demeure tout aussi important d'appliquer les standards de médecine de transfusion, notamment en matière de dépistage de maladies infectieuses.⁶⁵

Tableau XIII. Distribution du phénotype *Dal* parmi les portées de Dalmatiens et de Doberman Pinschers

Race	Portées	Chiots		
		<i>Dal+</i> (n)	<i>Dal-</i> (n)	Total (n)
Dalmatien	A	7	0	7
	B	7	0	7
	C	4	2	6
	D	4	2	6
	E	3	0	3
Doberman Pinscher	F	7	1	8
	G	0	4	4
	H	0	5	5
	I	5	0	5
	J	0	7	7
	K	0	6	6
	L	5	1	6
	M	2	5	7
	N	0	8	8
	O	3	6	9
	P	3	0	3
	Q	3	0	3
	R	0	3	3
S	1	2	3	

Les portées dont les chiots avaient tous le même statut *Dal* (12/19 portées) sont présentées en gras.

Tout comme ce qui est rapporté dans la littérature à propos des autres groupes sanguins,^{10,15} la prévalence du *Dal* varie significativement selon la région, raison pour laquelle une prévalence globale est inappropriée et n'a pas été calculée. Ceci met en évidence l'importance des données régionales lorsqu'on considère la prévalence d'un groupe sanguin. Afin d'aider le clinicien à prédire le statut *Dal* avant une transfusion sanguine, nous avons aussi investigué certains facteurs de risque comme le sexe, l'âge, la couleur de robe et le statut DEA 1, mais aucune relation n'a pu être établie avec le statut *Dal*. En raison de sa prévalence et de son immunogénicité bien documentées, DEA 1 est considéré le groupe sanguin canin le plus important cliniquement. Ainsi, le typage sanguin DEA 1 est recommandé avant toute transfusion chez le chien.¹⁰ Étant donné qu'il n'y a pas de relation établie entre les statuts *Dal* et DEA 1, une compatibilité DEA 1 ne prédit pas la compatibilité pour le *Dal* ou pour aucun autre groupe sanguin d'ailleurs. Une prévalence plus faible du phénotype *Dal+* a été observée chez les non-Dalmatiens et non-Doberman Pinschers âgées de plus de 5 ans comparé aux plus jeunes. Ceci pourrait être expliqué par l'âge qui est confondu par la race étant donné que 18 des 21 Shih Tzu recrutés avaient plus de 5 ans.

Nous n'avons pas identifié d'allo-anticorps naturels anti-*Dal* dans le plasma de chiens *Dal-* n'ayant jamais été transfusés, ce qui concorde avec l'étude originale du *Dal*.⁹ Toutefois, nous avons confirmé l'immunogénicité du *Dal* avec la détection d'allo-anticorps anti-*Dal* acquis dans le plasma de chiens *Dal-* ayant reçu une transfusion de concentré de globules rouges *Dal+* dans un contexte clinique (cas d'incompatibilité transfusionnelle chez un Shih Tzu *Dal-*) et dans un contexte expérimental (2 Beagles *Dal-* sensibilisés pour le *Dal*).

Dans notre étude, une transfusion expérimentale de concentré de globules rouges *Dal+* chez un receveur *Dal-* a induit une importante production d'allo-anticorps avec un titre d'agglutination maximal de 1 :1024, ce qui confirme la forte immunogénicité de l'antigène *Dal*. En comparaison, le plus haut titre d'agglutination rapporté était 1:1024 et il avait été obtenu avec la technique en tube dans un contexte expérimental. Dans le cadre de cette étude, 18 chiens DEA 1- avaient été transfusés avec des globules rouges DEA 1+. La plupart des chiens avaient reçu de multiples petites transfusions (5 ml) alors que quelques chiens avaient été immunisés avec un volume plus important. Les titres anti-DEA 1 étaient majoritairement supérieurs à 1:256.³ Dans la littérature, le plus haut titre responsable d'une réaction hémolytique aigue transfusionnelle dans un contexte clinique est 1 :16 en utilisant la technique

en tube chez un chien qui recevait des traitements immunosuppresseurs.¹⁰⁻¹² De façon similaire, l'étude originale du *Dal* rapporte un titre d'agglutination entre 1 :8 à 1 :16 chez un Dalmatien anémique.⁹ Les immunoglobulines anti-*Dal* produites sont des IgG. Ceci concorde avec la publication originale du *Dal* et la publication du DEA 1, bien que des IgM aient été décrits chez d'autres espèces.^{9,10}

Les études expérimentales ont montré que l'immunogénicité des antigènes érythrocytaires est variable. Certains antigènes, comme DEA 1, produisent de forts titres d'agglutination qui peuvent mener à des réactions hémolytiques aiguës transfusionnelles. D'autres antigènes, comme DEA 3 et 5, produisent de faibles titres d'agglutination associés à une diminution de la durée de vie des globules rouges transfusés chez des chiens préalablement sensibilisés ou à des réactions hémolytiques retardées.^{3,8,13} De manière générale, plus haut le titre est, plus forte la réaction sera.⁵²

Notre étude a montré que l'immunogénicité du *Dal* est exprimée avec une grande variation entre les 2 receveurs : d'abord selon la vitesse d'apparition des allo-anticorps et ensuite selon le titre d'agglutination maximal observé et le moment auquel il a été observé. Le degré de sensibilisation variable selon le receveur peut être expliqué par plusieurs facteurs intrinsèques au receveur incluant l'âge, le système immunitaire, les hormones (intact versus stérilisé) ainsi qu'une multitude de facteurs génétiques et environnementaux. De plus, 2 donneurs de sang différents ont été utilisés et leur niveau d'expression antigénique pourrait différer. Par exemple, une étude par cytométrie de flux a montré que les chiens expriment différents niveaux d'antigènes DEA 1.¹⁶ Dans le but de limiter la variation d'expression antigénique, les 2 donneurs de sang choisis dans notre étude montraient tous deux le plus haut niveau d'agglutination au typage *Dal* (4+). De plus, les 2 receveurs ont reçu la même proportion de concentré de globules rouges dans le même intervalle de temps (10 ml/kg en maximum de 4 heures pour simuler une transfusion dans un contexte clinique). Ceci met en évidence une des limites de notre étude. Dans un contexte clinique, les patients qui reçoivent des transfusions sanguines sont souvent dans un état critique et ils reçoivent de multiples traitements incluant des médicaments immunosuppresseurs. Ainsi, l'immunogénicité du *Dal* observée dans notre étude est possiblement surestimée vu le contexte particulier de transfusions expérimentales chez des chiens en santé. Ces données ne peuvent donc pas être extrapolées à d'autres groupes

sanguins ou encore à des animaux malades dans un contexte clinique, d'autant plus s'ils sont immunosupprimés.

Pendant toute la durée et suite aux transfusions expérimentales incompatibles pour le *Dal*, aucun signe de réaction hémolytique aigue ou retardée n'a été observé. Ceci n'est pas surprenant, puisqu'il n'existe aucune évidence d'allo-anticorps naturels d'importance clinique chez le chien,^{4,7,8} et que les 2 receveurs n'avaient jamais été transfusés. Dans la littérature, tous les chiens ayant subi une réaction hémolytique aigue transfusionnelle avaient préalablement reçu une première transfusion sanguine. Les signes cliniques débutent de quelques minutes à quelques heures suivant le début de la transfusion et ils se résolvent généralement en 24 heures. Ces signes varient et ils peuvent inclure de la fièvre, incontinence, vomissements, salivation, léthargie, ictère, tachypnée, hémoglobinurie, bilirubinémie, pigmenturie et tremblements musculaires. Malgré que les signes cliniques puissent être assez sévères, ces réactions sont rarement fatales.^{2,10-12} Par soucis de bien-être animal, une deuxième transfusion incompatible n'a pas été administrée, limitant ainsi la possibilité d'obtenir d'importantes données cliniques à propos des transfusions subséquentes. Toutefois, quoique non publié, un cas de réactions hémolytiques aiguës associées au *Dal* a été documenté chez un Doberman Pinscher préalablement transfusé à l'Université de Tuft en 2007 par notre groupe de recherche.^t

Une réaction hémolytique retardée est généralement définie comme une réaction adverse se produit plus de 24 heures post-transfusion et résultant en l'augmentation de la vitesse de destruction des globules rouges (diminution rapide de l'hématocrite et/ou hémolyse intravasculaire ou extravasculaire).^{10,28,55-59} Malgré la détection d'alloanticorps anti-*Dal* à partir du Jour 4 et du Jour 21, nous n'avons pas réussi à démontrer une réaction hémolytique retardée d'après l'observation des signes cliniques ou des épreuves de laboratoire. Nous n'avons observé aucune évidence de destruction des globules rouges par des mesures répétées de l'hématocrite et des bilirubines. Aussi, les tests de Coombs étaient négatifs même lorsque des allo-anticorps anti-*Dal* étaient détectés.

En utilisant une technique de biotinylation des globules rouges in vitro, des transfusions autologues ont montré une durée de vie moyenne des globules rouges de $104,3 \pm 2,2$ jours chez 3 Beagles.⁵⁴ De façon comparable, la demi-vie des globules rouges compatibles transfusés varie

^t Données non-publiées. Communication personnelle (Marie-Claude Blais)

de 21 à 43 jours et une transfusion devrait être efficace pour 4 à 6 semaines.^{52,53} En utilisant la technologie sur colonne de gel, nous avons réussi à détecter les globules rouges *Dal*+ transfusés au chien #2 jusqu'au jour 14. À partir du Jour 21, les globules rouges n'étaient plus détectables. Ceci suggère que les globules rouges ont été retirés de la circulation ou qu'ils n'étaient plus détectables par la technologie sur colonne de gel. Fait intéressant, ceci concorde avec le moment où des allo-anticorps anti-*Dal* ont été détectés pour la première fois. De façon similaire, en 1961, Swisher et al ont rapporté une augmentation de la vitesse de destruction des globules rouges entre 14 et 21 jours post-transfusion dans le cadre d'une série d'expérimentation visant à étudier la durée de vie des globules rouges transfusés lors d'une première transfusion.⁴ Toutefois, aucun allo-anticorps n'était détecté et la méthode utilisée pour évaluer la destruction des globules rouges n'était pas mentionnée.

En plus des allo-anticorps naturels et acquis pouvant mener à une hémolyse à médiation immunitaire, plusieurs autres facteurs peuvent être responsables d'une diminution de la durée de vie des globules rouges transfusés, notamment les conditions d'entreposage, la manutention et l'infusion inappropriées des produits sanguins.^{2,53,66} Dans le cadre de notre étude, les conditions d'entreposage et la technique de transfusion suivaient les protocoles standardisés du Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire et les globules rouges étaient prélevés la veille de la transfusion, limitant ainsi les dommages liés à l'entreposage. Puisque l'arrêt de détection des globules rouges *Dal*+ à partir du jour 21 correspond à la détection initiale d'allo-anticorps anti-*Dal*, une destruction à médiation immunitaire des globules rouges transfusés est plausible. La technique sur colonne de gel est considérée une technique plus sensible que la technique en tube,⁷⁵ mais sa sensibilité pour détecter les globules rouges incompatibles transfusés semble limitée en considérant les faibles titres d'agglutination que nous avons observés ($\leq 1+$). Ainsi, l'utilisation d'une technique qui s'est montrée efficace, c'est-à-dire le marquage des globules rouges au chrome-51 ou à la biotine, aurait été idéal pour déterminer la survie des globules rouges transfusés.⁸⁴⁻⁸⁸ Étant donné que ces techniques n'étaient pas disponibles nous avons tenté un essai avec la technique sur colonne de gel qui s'est avérée une technique simple, peu dispendieuse et tout de même répétable en duplicata.

Les allo-anticorps produits plus de 21 jours post-sensibilisation sont restés stables suivant la congélation, permettant le stockage de sérum anti-*Dal* pour de futurs typages sanguins. Il demeure incertain pourquoi les allo-anticorps produits avant 21 jours chez le chien

#1 n'étaient plus détectables suivant la congélation. Bien que diverses hypothèses aient été proposées (changement de conformation suivant la congélation ou manque de spécificité de l'allo-anticorps) aucune conclusion n'a été tirée. Leur titre d'agglutination était faible et leur signification clinique n'est toujours pas définie.

Tel que mentionné à quelques reprises, il n'est plus possible de typer pour DEA 6 et DEA 8, ce qui aurait pu limiter la spécificité de la sensibilisation pour le *Dal*. Malgré cette limite, les 2 allo-anticorps polyclonaux produits ont montré une concordance de 100% avec le sérum original du chien index et des résultats de typage sanguin *Dal* faciles à interpréter (clairement négatif (0) ou fortement positif (3 ou 4+)). Comme pour la plupart des groupes sanguins canins, à l'exception du DEA 1, le typage sanguin *Dal* dépend de la disponibilité de réactifs polyclonaux obtenus suite à la sensibilisation d'un chien négatif. Ceci peut être un facteur très limitant surtout lorsque les individus négatifs sont rares. Le manque d'accessibilité aux réactifs de typage sanguin, même à des fins de recherche, met en évidence la problématique qui existe en médecine vétérinaire : en se fiant seulement aux allo-anticorps polyclonaux, la pérennité du typage sanguin est en péril et il est impossible d'établir une comparaison entre certains groupes sanguins déjà décrits (par exemple DEA 6 et DEA 8) et les nouveaux groupes sanguins découverts. Heureusement, notre étude a permis de produire et de congeler une quantité considérable de sérum anti-*Dal* stable. Ceci permettra le typage sanguin d'un nombre considérable de chiens dans les prochaines années et d'investiguer de possibles cas d'incompatibilité transfusionnelle. Toutefois, ceci ne constitue pas une solution à long terme.

La production d'un anticorps monoclonal et la commercialisation de dispositifs de typage DEA 1 a rendu accessible le typage sanguin DEA 1 à plus grande échelle.^{29,31} Dans cette optique, la production d'un anticorps monoclonal pourrait augmenter l'accessibilité du typage sanguin *Dal* et le rendre disponible commercialement. De plus, ceci pourrait permettre une meilleure caractérisation de l'antigène *Dal* au point de vue moléculaire.

De façon générale, peu d'information est connue à propos de la structure ou de la fonction des antigènes érythrocytaires chez le chien. Pour DEA 1, la cytométrie de flux a permis de montrer que l'expression du DEA 1 est en fait un continuum allant de négatif à fortement positif.¹⁶ Dans le but de mieux caractériser l'expression du *Dal*, nous avons fait un essai en utilisant la cytométrie de flux, mais aucun résultat n'a été concluant. Le protocole est tout de

même présenté en annexe. Il est important de noter que le titre de l'anticorps polyclonal utilisé était modeste, soit 1:8. Il serait donc intéressant de répéter l'expérience en utilisant les allo-anticorps obtenus suite aux sensibilisations expérimentales, puisque ceux-ci présentent des titres d'agglutination beaucoup plus élevés allant jusqu'à 1:1024.

Conclusion et perspectives

Notre étude a montré que le *Dal* possède un mode d'héritabilité Mendélien simple autosomal dominant. La prévalence du *Dal+* variait entre 85,5 à 100% chez les Dalmatiens et entre 43,3 à 78,6% chez les Doberman Pinschers en fonction de la région. Plusieurs individus *Dal-* ont été identifiés chez les Dalmatiens, les Doberman Pinschers et les Shih Tzus. Bien que seulement quelques individus *Dal-* aient été identifiés chez les Beagles, Lhasa Apso et Bichon Frisé, ces races méritent toute de même plus d'investigation de prévalence dans un contexte clinique. Puisque tous les autres chiens de race pure testés sont *Dal+*, incluant la plupart des donneurs de sang, les chiens *Dal-* sont à haut risque d'incompatibilité transfusionnelle s'ils doivent recevoir de multiples transfusions sanguines. Le typage sanguin extensif, lorsque disponible est recommandé chez les Dalmatiens, Doberman Pinschers, Shih Tzus, Lhasa Apso et Bichon Frisé, notamment chez des chiens préalablement transfusés.

Suivant la sensibilisation de 2 chiens *Dal-*, la forte immunogénicité du *Dal* a été confirmée avec la détection d'allo-anticorps anti-*Dal* aussi tôt que 4 jours post-transfusion, un titre d'agglutination maximal particulièrement élevé après 1 et 2 mois et des allo-anticorps toujours détectables 2 ans post-transfusion. Nos résultats supportent les recommandations en matière de compatibilité pré-transfusionnelle qui recommande qu'un crossmatch soit effectué à partir de 4 jours post-transfusion ainsi que pour toute la vie de l'animal pour les transfusions subséquentes. Bien qu'une réaction hémolytique aigue n'a pas été observée lors d'une première transfusion incompatible dans le cadre de notre étude, deux cas de réactions hémolytiques aigues reliés au *Dal* ont déjà été observés, mais ces données n'ont jamais été publiées. Notre étude a permis de congeler une quantité considérable de sérum polyclonal pour assurer le typage sanguin *Dal* à court/moyen terme.

De façon générale, ce mémoire souligne la problématique qui existe en matière de nomenclature des groupes sanguins canins. D'une part, les récentes découvertes concernant le système DEA 1 ont mené à proposer une nouvelle nomenclature i.e. DEA 1 a substitué DEA 1.1, 1.2 et 1.3. D'autre part, notre étude change la perception que nous avons du *Dal* : initialement, il était supposé qu'il soit un antigène à haute fréquence, mais notre étude a montré qu'il s'agirait plutôt d'un groupe sanguin en soi. Enfin, un nouvel article mentionnant 2 nouveaux groupes sanguins (Kai 1 et Kai 2) a été publié tout récemment.⁸⁹ Considérant ces découvertes et

considérant que le consensus ayant établi la nomenclature des DEA utilisée aujourd'hui remonte aux années 1970, il serait souhaitable qu'un nouveau consensus ait lieu dans l'objectif de standardiser la nomenclature des groupes sanguins canins.

De plus, pour qu'une nomenclature demeure pertinente, la pérennité du typage sanguin canin est essentielle. Le manque d'accessibilité à certains anticorps polyclonaux menace la pérennité du typage pour certains groupes sanguins, notamment DEA 6 et 8 pour lesquels il n'est plus possible de typer et DEA 3, 5 et *Dal* pour lesquels la disponibilité est limitée à certains laboratoires. La production d'un anticorps monoclonal a rendu accessible le typage DEA 1 dans les années 1990 et semble l'avenue la plus prometteuse pour assurer la pérennité du typage sanguin canin. Ainsi, la production d'un anticorps monoclonal anti-*Dal* est la prochaine étape à envisager pour augmenter l'accessibilité au typage sanguin *Dal* et assurer sa pérennité dans le temps.

Bibliographie

1. Ottenberg R, Kaliski DJ, Friedman SS. Experimental agglutinative and hemolytic transfusions. *J Med Res* 1913;28:141-163.
2. Young LE, Ervin DM, Yuile CL. Hemolytic reactions produced in dogs by transfusion of incompatible dog blood and plasma. I. Serologic and Hematologic Aspects. *Blood* 1949;4:1218-1231.
3. Christian RM, Ervin DM, Young LE. Observations on the in-vitro behavior of dog isoantibodies. *J Immunol* 1951;66:37-50.
4. Swisher SN, Young LE. The blood grouping systems of dogs. *Physiol Rev* 1961;41:495-520.
5. Bowdler AJ, Bull RW, Slating R, et al. Tr: a canine red cell antigen related to the A-antigen of human red cells. *Vox Sang* 1971;20:542-554.
6. Vriesendorp HM, Albert ED, Templeton JW, et al. Joint report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics. *Transplant Proc* 1976;8:289-314.
7. Hohenhaus AE. Importance of blood groups and blood group antibodies in companion animals. *Transfus Med Rev* 2004;18:117-126.
8. Swisher SN, Young LE, Trabold N. In vitro and in vivo studies of the behavior of canine erythrocyte-isoantibody systems. *Ann N Y Acad Sci* 1962;97:15-25.
9. Blais MC, Berman L, Oakley DA, et al. Canine Dal blood type: A red cell antigen lacking in some Dalmatians. *J Vet Intern Med* 2007;21:281-286.
10. Giger U, Gelens CJ, Callan MB, et al. An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog. *J Am Vet Med Assoc* 1995;206:1358-1362.
11. Callan MB, Jones LT, Giger U. Hemolytic transfusion reactions in a dog with an alloantibody to a common antigen. *J Vet Intern Med* 1995;9:277-279.
12. Melzer KJ, Wardrop KJ, Hale AS, et al. A hemolytic transfusion reaction due to DEA 4 alloantibodies in a dog. *J Vet Intern Med* 2003;17:931-933.
13. Hale AS. Canine blood groups and their importance in veterinary transfusion medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1995;25:1323-1332.
14. Vriesendorp HM, Westbroek DL, D'Amato J, et al. Joint report of 1st International Workshop on Canine Immunogenetics. *Tissue Antigens* 1973;3:145-163.
15. Iazbik MC, O'Donnell M, Marin L, et al. Prevalence of dog erythrocyte antigens in retired racing Greyhounds. *Vet Clin Pathol* 2010;39:433-435.
16. Acierno MM, Raj K, Giger U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analyzed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. *J Vet Intern Med* 2014;28:592-598.
17. Swisher SN, Bull R, Bowdler J. Canine erythrocyte antigens. *Tissue Antigens* 1973;3:164-165.
18. Suzuki Y, Stormont C, Morris BG, et al. New antibodies in dog blood groups. *Transplant Proc* 1975;7:365-367.
19. Ejima H, Kurokawa K, Ikemoto S. Phenotype and gene frequencies of red blood cell groups in dogs of various breeds reared in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi* 1986;48:363-368.

20. van der Merwe LL, Jacobson LS, Pretorius GJ. The breed prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in the Onderstepoort area of South Africa and its significance in selection of canine blood donors. *J S Afr Vet Assoc* 2002;73:53-56.
21. Hale AS, Werfelmann J, Lemmons M, et al. An evaluation of 9570 dogs by breed and dog erythrocyte antigen typing [abstract]. *J Vet Intern Med* 2008;22:740.
22. 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.
23. Esteves VS, Lacerda Lda, Lasta CS, et al. Frequencies of DEA blood types in a purebred canine blood donor population in Porto Alegre, RS, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2011;31:178-181.
24. Ferreira RR, Gopegui RR, Matos AJ. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal. *Vet Clin Pathol* 2011;40:198-201.
25. Ergul Ekiz E, Arslan M, Ozcan M, et al. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 in 4 breeds native to different areas in Turkey. *Vet Clin Pathol* 2011;40:518-523.
26. Mesa-Sanchez I, Ruiz de Gopegui-Fernandez R, Granados-Machuca MM, et al. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in galgos (Spanish greyhounds). *Vet Rec* 2014;174:351.
27. Spada E, Proverbio D, Viñals Flórez LM, et al. Prevalence of Dog Erythrocyte Antigens 1, 4, and 7 in Podenco Ibicenco (Ibizan Hounds) from Ibiza Island. 2016:5.
28. Tocci LJ. Transfusion medicine in small animal practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2010;40:485-494.
29. Seth M, Jackson KV, Winzelberg S, et al. Comparison of gel column, card, and cartridge techniques for dog erythrocyte antigen 1.1 blood typing. *Am J Vet Res* 2012;73:213-219.
30. Symons M, Bell K. Expansion of the canine A blood group system. *Anim Genet* 1991;22:227-235.
31. Andrews GA, Chavey PS, 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.
32. 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.
33. Ejima H, Kurokawa K, Ikemoto S. Comparison test of antibodies for dog blood grouping. *Nihon Juigaku Zasshi* 1980;42:435-441.
34. Ejima H, Nomura K, Bull RW. Breed differences in the phenotype and gene frequencies in canine D blood group system. *J Vet Med Sci* 1994;56:623-626.
35. Symons M, Bell K. Canine blood groups: description of 20 specificities. *Anim Genet* 1992;23:509-515.
36. Hara Y, Ejima H, Aoki S, et al. Preparation of monoclonal antibodies against dog erythrocyte antigen D1 (DEA-3). *J Vet Med Sci* 1991;53:1105-1107.
37. Corato A, Mazza G, Hale AS, et al. Biochemical characterization of canine blood group antigens: immunoprecipitation of DEA 1.2, 4 and 7 and identification of a dog erythrocyte membrane antigen homologous to human Rhesus. *Vet Immunol Immunopathol* 1997;59:213-223.

38. Bull RW, Vriesendorp HM, Zweibaum A, et al. The inapplicability of CEA-7 as a canine bone marrow transplantation marker. *Transplant Proc* 1975;7:575-577.
39. Colling DT, Saison R. Canine blood groups. 2. Description of a new allele in the Tr blood group system. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 1980;11:13-20.
40. Colling DT, Saison R. Canine blood groups. 1. Description of new erythrocyte specificities. *Anim Blood Groups Biochem Genet* 1980;11:1-12.
41. Cohen C, Fuller JL. The inheritance of blood types in the dog. *Journal of Heredity* 1953;44:225-228.
42. Ikemoto S, Sakurai Y, Watanabe Y, et al. Frequencies of D, L and M blood groups of beagles bred in Japan. *Nihon Juigaku Zasshi* 1978;40:201-202.
43. Giger U, Bucheler J. Transfusion of type-A and type-B blood to cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991;198:411-418.
44. Giger U, Akol KG. Acute hemolytic transfusion reaction in an Abyssinian cat with blood type B. *J Vet Intern Med* 1990;4:315-316.
45. Janatpour KA, Kalmin ND, Jensen HM, et al. Clinical outcomes of ABO-incompatible RBC transfusions. *Am J Clin Pathol* 2008;129:276-281.
46. Blais MC, Rozanski EA, Hale AS, et al. Lack of evidence of pregnancy-induced alloantibodies in dogs. *J Vet Intern Med* 2009;23:462-465.
47. Bailey E. Prevalence of anti-red blood cell antibodies in the serum and colostrum of mares and its relationship to neonatal isoerythrolysis. *Am J Vet Res* 1982;43:1917-1921.
48. MacLeay JM. Neonatal isoerythrolysis involving the Qc and Db antigens in a foal. *J Am Vet Med Assoc* 2001;219:79-81, 50.
49. Kahn W, Vaala W, Palmer J. [Neonatal isoerythrolysis in newborn foals]. *Tierarztl Prax* 1991;19:521-529.
50. Aitken SL, Tichy EM. Rh(O)D immune globulin products for prevention of alloimmunization during pregnancy. *Am J Health Syst Pharm* 2015;72:267-276.
51. Young LE, Christian RM, Ervin DM, et al. Hemolytic disease in newborn dogs. *Blood* 1951;6:291-313.
52. Abrams-Ogg ACG. Practical blood transfusion. In: Day MJ, Mackin A, Littlewood JD, eds. *BSAVA Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. Gloucester (UK): British Small Animal Veterinary Association; 2000.
53. McDevitt RI, Ruaux CG, Baltzer WI. Influence of transfusion technique on survival of autologous red blood cells in the dog. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2011;21:209-216.
54. Novinger MS, Sullivan PS, McDonald TP. Determination of the lifespan of erythrocytes from greyhounds, using an in vitro biotinylation technique. *Am J Vet Res* 1996;57:739-742.
55. Bell K. The blood groups of domestic animals. In: Agar AS, Board PG, eds. *Red Blood Cells of Domestic Mammals*. Amsterdam: Elsevier Press; 1983:133-164.
56. Smith JE. Erythrocytes. *Adv Vet Sci Comp Med* 1991;36:9-55.

57. Young LE, O'Brien WA, Swisher SN, et al. Blood groups in dogs--their significance to the veterinarian. *Am J Vet Res* 1952;13:207-213.
58. Yuile CL, Van Zandt TF, Ervin DM, et al. Hemolytic reactions produced in dogs by transfusion of incompatible dog blood and plasma. II. Renal Aspects Following Whole Blood Transfusions. *Blood* 1949;4:1232-1239.
59. Gibson G. Transfusion medicine. In: King L, Boag A, eds. *BSAVA Manual of Canine and Feline Emergency and Critical Care*, 2nd ed. Gloucester (UK): BSAVA; 2007:215-227.
60. Gibson G, Abrams-Ogg ACG. Canine transfusion medicine. In: Day MJ, Kohn B, eds. *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*, 2nd ed. Gloucester: British Small Animal Veterinary Association; 2012:289-307.
61. Lanevski A, Wardrop KJ. Principles of transfusion medicine in small animals. *Can Vet J* 2001;42:447-454.
62. Couto CG. Anemia. In: Nelson RW, Couto CG, eds. *Small Animal Internal Medicine*, 3rd ed. St.-Louis, MO: Mosby; 2003:1156-1169.
63. Day MJ, Schultz RD. *Veterinary Immunology* Manson Publishing Limited; 2010;256.
64. Standards for Blood Banks and Transfusion services, 16th edition. In: American association of blood banks technical manual, 16th ed. Bethesda, MD: 2008.
65. 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.
66. 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.
67. Boysen SR, Blais MC. Cross-Match and Blood Typing. In: Cote E, ed. *Clinical Veterinary Advisor: Dogs and Cats*, 3rd ed. St.-Louis, MO Elsevier; 2015:1132-1133.
68. Hohenhaus A. Blood transfusions, component therapy, and oxygen-carrying solutions. In: Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 7th ed. St.-Louis, MO: Saunders Elsevier; 2010:537-544.
69. Engelmann B, Schumacher U, Duhm J. Role of ABH blood group antigens in the stimulation of a DIDS-sensitive Ca²⁺ influx pathway in human erythrocytes by Ulex europaeus agglutinin I and a monoclonal anti A1 antibody. *Biochim Biophys Acta* 1991;1091:261-269.
70. 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.
71. Andrews GA, Chavey PS, Smith JE. Reactivity of lichen lectins with blood typed canine erythrocytes. *Res Vet Sci* 1992;53:315-319.
72. Giger U, Stieger K, Palos H. Comparison of various canine blood-typing methods. *Am J Vet Res* 2005;66:1386-1392.
73. Lapierre 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.

74. Harmening DM, Walker PS. Alternative technologies and automation in routine blood banking testing, Chapter 15. In: *Modern Blood Banking & Transfusion Practices*, 5th ed 2012:293-302.
75. Weisbach V, Ziener A, Zimmermann R, et al. Comparison of the performance of four microtube column agglutination systems in the detection of red cell alloantibodies. *Transfusion* 1999;39:1045-1050.
76. Abrams-Ogg ACG. *Practical Blood Transfusion*. In: Day MJ, Mackin A, Littlewood JD, eds. *Manual of canine and feline haematology and transfusion medicine*. Gloucester (UK): British Small Animal Veterinary Association; 2000.
77. Montgomery WM, Jr., Nance SJ, Donnelly SF, et al. MAM: a "new" high-incidence antigen found on multiple cell lines. *Transfusion* 2000;40:1132-1139.
78. Lomas-Francis C, Vege S, Velliquette RW, et al. Expansion of the Kell blood group system: two new high-prevalence antigens and two novel K0 (Kellnull) phenotypes. *Transfusion* 2013;53:2887-2891.
79. Jensen L, Scott EP, Marsh WL, et al. Anti-Jo(a): an antibody defining a high-frequency erythrocyte antigen. *Transfusion* 1972;12:322-324.
80. Riehl J, Okura M, Mignot E, et al. Inheritance of von Willebrand's disease in a colony of Doberman Pinschers. *Am J Vet Res* 2000;61:115-120.
81. Stokol T, Parry B. Efficacy of fresh-frozen plasma and cryoprecipitate in dogs with von Willebrand's disease or hemophilia A. *J Vet Intern Med* 1998;12:84-92.
82. Ching YN, Meyers KM, Brassard JA, et al. Effect of cryoprecipitate and plasma on plasma von Willebrand factor multimers and bleeding time in Doberman Pinschers with type-I von Willebrand's disease. *Am J Vet Res* 1994;55:102-110.
83. 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.
84. Wardrop KJ, Tucker RL, 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.
85. Korell J, Vos FE, Coulter CV, et al. Modeling red blood cell survival data. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2011;38:787-801.
86. Korell J, Coulter CV, Duffull SB. Evaluation of red blood cell labelling methods based on a statistical model for red blood cell survival. *J Theor Biol* 2011;291:88-98.
87. Panzer S, Puchler K, Mayr WR, et al. Haemolytic transfusion reactions due to HLA antibodies. A prospective study combining red-cell serology with investigations of chromium-51-labelled red-cell kinetics. *Lancet* 1987;1:474-478.
88. 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.
89. 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.

Annexe

Épreuve de cytométrie de flux pour l'antigène érythrocytaire *Dal*: PROTOCOLE

1. Prélèvement des échantillons sanguins :

- Deux ml de sang EDTA sont prélevés de la veine jugulaire de 2 chiens en santé dont le statut *Dal* est connu (1 *Dal*+ (fortement positif, i.e. 4+) et 1 *Dal*-) en utilisant une aiguille 21G.
- Pour chaque échantillon, l'hématocrite est mesuré
 - Note: Le nombre de globules rouges (globules rouges/L) chez un chien avec une valeur d'hématocrite dans la norme varie de $5.70-8.80 \times 10^{12}/L$.

2. Séparation des globules rouges pour l'analyse par cytométrie de flux :

- Les globules rouges sont séparés par centrifugation standard à 3500 g pendant 2 minutes, puis le surnageant est retiré. Le concentré de globules rouges est conservé en ajoutant un préservatif (Optisol AS-5 red cell preservative, Terumo Corporation, Tokyo, Japan) dans un ratio 1 :1 et entreposé à 4 °C jusqu'à analyse dans un délai maximal de 7 jours.
- Le jour de l'analyse, 100 µL de concentré de globules rouges sont lavés 3 fois par suspension dans 2 mL d'une solution tamponnée (PBS) puis centrifugés à 3500 g pendant 2 minutes. Le culot est ensuite suspendu dans 1 mL de PBS (Phosphate-buffered saline solution), ce qui équivaut à $10-15 \times 10^7$ globules rouges / 1 ml de suspension de globules rouges)*.
** 20 x 50 µL de suspension de globules rouges ($5-7.5 \times 10^6$ globules rouges)*

3. Préparation des globules rouges pour l'analyse par cytométrie de flux :

- Pour chaque échantillon, les incubations suivantes sont effectuées à 37 °C pendant 30 minutes en brassant les tubes délicatement aux 10 minutes.

	Tube A	Tube B	Tube C	Tube D
	Contrôle pour le FACS	Sérum de contrôle ¹ Pré-dilué 1/2	Sérum Anti- <i>Dal</i> ² Pré-dilué 1/2	Sérum Anti- <i>Dal</i> ² Pré-dilué 1/2
Suspension de globules rouges ($5-7,5 \times 10^6$)	25 µL	25 µL	25 µL	12,5 µL
Sérum	-	50 µL	50 µL	50 µL
PBS	100 µL	50 µL	50 µL	50 µL

¹ Sérum d'un chien ne possédant pas d'allo-anticorps anti-*Dal*

² Sérum polyclonal anti-*Dal* congelé de « Xander »; titre d'agglutination 1:8

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

- Après la première incubation avec soit du PBS (contrôle pour le FACS), du sérum de contrôle ou du sérum polyclonal anti-*Dal*, les globules rouges sont lavés 2 fois, puis suspendus dans 500 µL de « solution tamponnée pour le FACS » ($5-7,5 \times 10^6$ globules rouges/500 µL).
 - Note : Solution tamponnée pour le FACS : 1% FBS dans le PBS

4. Marquage avec le conjugué :

- Distribuer 100 µL de suspension de globules rouges ($1-1,5 \times 10^6$ RBC) dans des tubes eppendorf et ajouter la quantité indiquée d'anticorps de mouton anti-canin (IgG chaîne légère et chaîne lourde) marqués à la fluorescéine « FITC-labelled sheep anti-canine IgG heavy and light chains » tel qu'indiqué dans le tableau ci-dessous.

	Tube A		Tube B		Tube C		Tube D	
	Contrôle pour le FACS		Sérum de contrôle ¹ Pré-dilué 1/2		Sérum Anti- <i>Dal</i> ² Pré-dilué 1/2		Sérum Anti- <i>Dal</i> ² Pré-dilué 1/2	
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8
Suspension de globules rouges ($5-1,5 \times 10^6$)	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL	100 µL
FITC-conjugué	-	3 µL	3 µL	-	3 µL	-	3 µL	-
FITC-conjugué pré-dilué 1/20 ³	-	-	-	10 µL	-	10 µL	-	10 µL

¹ Sérum d'un chien ne possédant pas d'allo-anticorps anti-*Dal*

² Sérum polyclonal anti-*Dal* congelé de « Xander »; titre d'agglutination 1:8

³ 2,5 µL dans 47,5 µL tampon

FACS: Fluorescence-activated cell sorting

FITC: Fluoresceine isothiocyanate

Dilution approximative finale du FITC-conjugué dans les tubes #2, #3, #5, #7 et #9 : 1/30

Dilution approximative finale du FITC-conjugué dans les tubes #4, #6, #8 et #10 : 1/200

- Incuber les tubes dans le noir à la température pièce (20-23°C) pendant 30 minutes en brassant les tubes délicatement aux 10 minutes.
- Après un lavage avec de la solution tamponnée pour FACS, les globules rouges sont centrifugés à 1200 rpm pour 20 secondes, puis suspendus dans 500 uL de solution tamponnée pour FACS.

5. Lecture des tubes par cytométrie de flux

- Les tubes sont prêts pour la lecture par analyse de cytométrie de flux (Falcon 35-2052).

Épreuve de cytométrie de flux pour l'antigène érythrocytaire *Dal*: CONCLUSION

Les résultats ne furent pas concluants. La principale hypothèse est que le titre d'agglutination du serum polyclonal anti-*Dal* soit faible, soit 1 :8. L'épreuve pourrait être répétée en utilisant un anticorps avec un plus fort titre d'agglutination.