

*in caso di...*

## Gruppi sanguigni ed emocompatibilità nel cane

**Eva Spada, Roberta Perego, Luciana Baggiani, Daniela Proverbio**

Associazione Italiana di Medicina Veterinaria Trasfusionale (AIMVET)

Reparto di Medicina Emotrasfusionale Veterinaria (REV, <http://users.unimi.it/rev>), Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare (VESPA), Università degli Studi di Milano, via G. Celoria, 10 – 20133 Milano

Associazione Italiana di Medicina Veterinaria Trasfusionale (AIMVET)

Autore al quale inviare la corrispondenza

Eva Spada

Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare (VESPA), Università degli Studi di Milano, via G. Celoria, 10 – 20133 Milano

email [eva.spada@unimi.it](mailto:eva.spada@unimi.it); telefono 02 50318188; fax 0250318171

### SUMMARY

#### Canine blood groups and blood typing

Five standard blood groups have been identified in dogs: DEA (dog erythrocyte antigen) 1, 3, 4, 5, 7 and a more recently discovered blood group Dal. Accurate identification of blood groups is important in compatibility testing pre-transfusion and for the selection of blood donors for donation programs. The prevalence of the different groups in the dog population varies by region and breed. DEA 1 is the most prevalent type in the dog population, and also the one responsible for most major antigenic and acute hemolytic transfusion incompatibility reactions. Several rapid point-of-care tests are available for identification of DEA1 based on agglutination techniques with automated reading device, agglutination on card and on immunochromatography. There are also tests based on tube agglutination, gel column agglutination and on flow cytometry but these require reagents, equipment, and knowledge that limit their use to specialized laboratories. To avoid the premature destruction of transfused red blood cells and ensure maximum effectiveness of transfusion, major and minor cross matching should be performed before transfusion to identify incompatibilities in groups other than the DEA1 and the presence of naturally occurring antibodies (alloantibodies) directed against blood group antigens DEA 3, 4, 7.

### KEYWORDS

Canine, blood types, blood typing, blood compatibility, blood transfusion, blood donor.

## GRUPPI SANGUIGNI DEL CANE

Negli ultimi decenni le conoscenze riguardo ai gruppi sanguigni nel cane si sono evolute e oggi è noto che sono numerosi, ma che solo alcuni sono coinvolti nelle reazioni trasfusionali da incompatibilità ematica e che pochi possono essere determinati con test commerciali.

Le prime indagini sui gruppi sanguigni nel cane furono realizzate nel 1910 e permisero di identificare 4 gruppi sanguigni<sup>(1)</sup>, negli anni successivi i cani vennero usati come modello animale per le ricerche relative alla medicina trasfusionale umana<sup>(2,3)</sup> e in seguito, studi basati sulla sopravvivenza di eritrociti trasfusi marcati con cromo dimostrarono la presenza di 8 sistemi (antigeni eritrocitari) potenzialmente responsabili di reazioni immunologiche trasfusionali acute o ritardate<sup>(2)</sup>. L'identificazione sierologica dei gruppi sanguigni è stata confermata dalla International Society of Animal Genetics nel 1973<sup>(4,5)</sup>. Da allora sono stati individuati diversi gruppi sanguigni facenti parte del principale sistema di gruppo sanguigno denominato DEA (Dog Erythrocyte Antigen), all'interno del quale i gruppi sono attualmente denominati

DEA1, 3, 4, 5, e 7. I gruppi DEA6 e 8 inizialmente descritti, non sono mai stati ulteriormente caratterizzati per mancanza di antisieri. A questi gruppi si aggiunge quello di più recente scoperta denominato Dal poiché identificato per la prima volta e comune nei cani di razza Dalmata<sup>(6)</sup>.

I gruppi sanguigni sono determinati dagli antigeni presenti sulla superficie dei globuli rossi<sup>(7)</sup>relatively little is known of the biochemistry of these molecules. In this study the canine blood group antigens DEA (dog erythrocyte antigen) la cui caratterizzazione biochimica e molecolare rimane ancora oggi scarsamente definita nella specie canina<sup>(7)</sup>relatively little is known of the biochemistry of these molecules. In this study the canine blood group antigens DEA (dog erythrocyte antigen)<sup>(8)(9)</sup>. Vengono trasmessi per ereditarietà secondo le leggi di dominanza Mendeliane, ma ognuno di loro viene ereditato in modo indipendente e questo permette la coesistenza contemporanea sulla superficie dell'eritrocita di più antigeni. Per questo un cane può essere di gruppo DEA1 negativo e contemporaneamente DEA4 e DEA7 positivo. Nella cagna non si verifica la produzione di alloanticorpi nei confronti dei gruppi sanguigni DEA1, 3, 4, 5, e 7 in seguito

alla gravidanza. Per questo non vi è necessità di eseguire particolari test di compatibilità in femmine che debbano essere trasfuse e che abbiano avuto gestazioni in passato<sup>(10)</sup>.

## GRUPPO DEA 1

Fino a pochi anni fa si riteneva che il gruppo sanguigno DEA1 fosse composto da 3 antigeni, con tre alleli che esprimevano gli antigeni di superficie eritrocitaria chiamati DEA1.1, DEA1.2 e DEA1.3<sup>(11)(12)(13)(14)(15)</sup>. Studi recenti<sup>(16)</sup> hanno dimostrato che i gruppi DEA1.1, 1.2 e 1.3 sono l'espressione di una diversa quantità di un unico antigene sulla superficie degli eritrociti. Quindi all'interno di questo gruppo quindi **esistono solo cani DEA1 positivi che possono essere debolmente o fortemente positivi e cani DEA1 negativi**, detti con fenotipo nullo, che non possiedono quindi geni per l'espressione dell'antigene eritrocitario DEA1. Un recente lavoro<sup>(8)</sup> ha evidenziato che il gruppo DEA1 ha carattere ereditario autosomico dominante di tipo mendeliano, con la dominanza di DEA1 positivo > DEA1 negativo, la cui complessità allelica deve comunque ancora essere chiarita<sup>(11)(14)</sup>. La prevalenza del gruppo DEA1 positivo nella popolazione canina varia a seconda dell'area geografica di provenienza e della razza canina considerata e va dal 42% nella popolazione canina negli USA<sup>(17)</sup>, al 46-47% rispettivamente in cani di razza e meticci in Sud Africa<sup>(18)</sup>, al 56,9% in cani di diversa razza in Portogallo<sup>(19)</sup>, al 61% in cani di razza donatori di sangue in Brasile<sup>(20)</sup>. Per quanto riguarda le razze è segnalato il 71,2% in cani di razza turca Kars in Turchia<sup>(21)</sup> as it is highly immunogenic and causes acute hemolytic transfusion reactions (HTR), il 13,1% in cani di razza Greyhound<sup>(22)</sup> e il 51,7-54,6%<sup>(23)(24)</sup> in cani di razza galgo spagnolo. **La prevalenza del gruppo DEA1 positivo nei cani in Italia varia dal 40,5% al 60,2%** e le caratteristiche degli studi relativi sono riassunte nella Tabella 1.

**Il gruppo DEA1 è quello dotato di maggiore potere antigenico ed è responsabile delle reazioni trasfusionali immunologiche acute nei cani DEA1 negativi sensibilizzati da precedenti trasfusioni con sangue DEA1 positivo.** I cani DEA1 negativi non possiedono anticorpi naturali (alloanticorpi) nei confronti del gruppo DEA1<sup>(25)</sup>, pertanto, nel corso della prima trasfusione, l'antigene DEA1 non determina una reazione acuta clinicamente importante nel ricevente. Nel cane trasfuso, vengono però prodotti anticorpi anti-DEA1 che causano emolisi ritardata con distruzione dei globuli rossi trasfusi entro 1-2 settimane, riducendo l'efficacia della trasfusione ematica. **Nelle successive trasfusioni effettuate nello stesso soggetto con sangue DEA1 positivo, insorge una reazione immunitaria potenzialmente fatale<sup>(26)</sup> accompagnata da una reazione emolitica acuta trasfusionale nella quale gli anticorpi anti-DEA1 distruggono tutti gli eritrociti trasfusi entro 12 ore.** Per questi motivi **i cani DEA1 negativi devono ricevere solo sangue DEA1 negativo, mentre cani DEA1 positivi possono ricevere sangue sia DEA1 positivo sia DEA1 negativo.** Inoltre, poiché esistono altri gruppi sanguigni canini, che non sono facilmente identificabili con le tecniche di emotipizzazione attualmente disponibili, **ad ogni trasfusione oltre alla tipizzazione del gruppo sanguigno DEA1 deve essere associata l'esecuzione dei test di compatibilità crociata (cross-matching) che evidenziano eventuali anticorpi presenti nel sangue del donatore e del ricevente rivolti verso gli antigeni degli altri gruppi sanguigni del cane<sup>(26)</sup>.** Per la determinazione del gruppo DEA1 esistono in commercio diversi kit commerciali affidabili che si basano sulle metodiche di agglutinazione e immunocromatografia. Il gruppo DEA1 può anche essere responsabile dell'isoeritrosi

neonatale canina. Si tratta di una sindrome che compare nei cuccioli neonati nati da madri di gruppo DEA1 negativo, precedentemente trasfuse (sensibilizzate) con sangue DEA1 positivo e accoppiate con maschi DEA1 positivi<sup>(21)(22)</sup> (n = 14). Nei cuccioli di gruppo DEA1 positivo che assumono tramite il colostro gli anticorpi materni anti-DEA1, insorge una sindrome emolitica che può anche essere mortale<sup>(27)</sup>.

## GRUPPO DEA 4

I cani possono essere DEA4 positivi o negativi, poiché il sistema DEA4 possiede un antigene e un fenotipo nullo. **Si tratta di un gruppo molto comune con una prevalenza del 98-100% nella popolazione canina<sup>(20)(22)(24)(28)(29)</sup>.** La sua prevalenza in cani Italiani di diverse regioni è riportata nella Tabella 1.

L'antigene DEA4 attualmente può essere identificato mediante l'utilizzo di un antisiero policlonale in prove di agglutinazione in provetta o su colonna di gel<sup>(17)(22)(24)(29)(30)(31)</sup>, realizzate in laboratori specializzati (in Italia presso il Reparto di Medicina Emotrasfusionale Veterinaria –REV- dell'Università degli Studi di Milano<sup>(24)</sup>, <http://users.unimi.it/rev>) oppure tramite citofluorimetria<sup>(32)</sup>. Non sono disponibili test commerciali a uso ambulatoriale per la determinazione di questo gruppo sanguigno.

**I cani non possiedono anticorpi naturali diretti contro l'antigene DEA 4<sup>(25)</sup>.** Poiché la prevalenza di questo gruppo sanguigno è elevata nella popolazione canina, i rischi di sensibilizzazione di soggetti DEA4 negativi trasfusi con sangue DEA4 positivo sono molto limitati, ma non completamente assenti, come dimostra la descrizione di un caso clinico di un cane DEA4 negativo politrasfuso con sangue DEA4 positivo nel quale si è verificata una reazione trasfusionale emolitica acuta<sup>(33)</sup>. Questo evento porta a sottolineare **l'importanza di eseguire sempre i test di compatibilità crociata oltre alla determinazione del gruppo sanguigno prima della trasfusione ematica, per ridurre l'insorgenza di reazioni trasfusionali da incompatibilità sanguigna.**

## GRUPPO DEA 7

**I cani possono essere DEA7 positivi o DEA7 negativi**, poiché il sistema di gruppo sanguigno DEA7 possiede un antigene e un fenotipo nullo. **A differenza degli altri gruppi, il DEA7 non è un antigene integrato alla membrana eritrocitaria, ma si trova in circolo e si lega passivamente alla superficie degli eritrociti.** Per questo motivo l'antigene si può ritrovare nel plasma non associato agli eritrociti ed è in grado di diffondere nella saliva. Come per il gruppo DEA4, anche per l'identificazione dell'antigene DEA7 non esistono test commerciali, ma solo antisieri policlonali che limitano la determinazione di questo gruppo a laboratori specializzati (in Italia presso il Reparto di Medicina Emotrasfusionale Veterinaria – REV- dell'Università degli Studi di Milano<sup>(24)</sup>, <http://users.unimi.it/rev>), tramite l'utilizzo di tecniche di agglutinazione in provetta o su colonna di gel<sup>(17)(22)(24)(28)(29)(30)(31)</sup>, ma non tramite tecnica citofluorimetrica<sup>(32)</sup>.

**La prevalenza nella popolazione canina varia dal 20 al 45% a seconda delle razze e dell'origine geografica<sup>(15)(17)(22)(24)(26)(29)</sup>.** La distribuzione in Italia è riportata nella Tabella 1. La positività all'antigene DEA7 è ipotizzata essere un fattore protettivo nei confronti dell'insorgenza dell'anemia emolitica immunomediata nei cani di razza cocker spaniel<sup>(30)</sup>.

**Nei confronti dell'antigene del gruppo DEA 7 esistono degli anticorpi preformati (alloanticorpi) naturali, ovvero presenti nei soggetti senza che questi siano stati sensibilizzati con la trasfusione di sangue DEA7 positivo.**

Gruppo sanguigno	Popolazione testata	Origine	Tecnica di emotipizzazione	Prevalenza		Autori
				Positivi	Negativi	
DEA 1	890 cani, varie razze	Padova, Perugia, Milano	Immunocromatografia	62%	38%	Carli E et al, 2015(35)
	212 donatori: cani meticci, retrievers, corsi, bovani del bernese	Milano, Bologna, Pisa, Perugia	Immunocromatografia, agglutinazione su cartina	44,3%	55,7%	Bagnagatti De Giorgi G et al, 2013(36)
	84 donatori, varie razze	Milano, Perugia, Pisa	Immunocromatografia, agglutinazione su cartina	40,5%	59,5%	Spada et al, 2015(24)
	133 donatori, varie razze	Padova	Citofluorometria	54%	56%	Carminato et al, 2015(32)
DEA 4	84 donatori, varie razze	Milano, Perugia e Pisa	Agglutinazione su colonna di gel	100%	0%	Spada et al, 2015(24)
	133 donatori, varie razze	Padova	Citofluorometria	100%	0%	Carminato et al, 2015(32)
DEA 7	84 donatori, varie razze	Milano, Perugia, Pisa	Agglutinazione su colonna di gel	33,3%	66,6%	Spada et al, 2015(24)

Tabella 1. Studi relativi alla prevalenza dei gruppi sanguigni DEA1, 4 e 7 effettuati nella popolazione canina in Italia

Questi alloanticorpi diretti contro l'antigene DEA7 sono presenti dal 9,8%<sup>(25)</sup> al 20-50%<sup>(14)</sup> della popolazione canina DEA7 negativa. Quando i soggetti che possiedono gli alloanticorpi vengono trasfusi con sangue DEA7 positivo, si verifica l'interazione antigene-anticorpo che è responsabile di una reazione trasfusionale ritardata con accelerata rimozione degli eritrociti dal circolo nell'arco di 72 ore<sup>(34)(14)</sup>. Ad oggi non sono state descritte reazioni emolitiche acute nei confronti di questo antigene. L'esecuzione dei test di compatibilità crociata permette di identificare i cani che posseggono anticorpi, che dovrebbero essere trasfusi con sangue DEA7 negativo nel caso in cui sia possibile determinare questo gruppo.

## GRUPPO DEA 3

**I cani possono essere DEA3 positivi o DEA3 negativi**, poichè il sistema di gruppo sanguigno DEA3 possiede un antigene e un fenotipo nullo. Si tratta di un antigene piuttosto raro nella popolazione canina mondiale e la **sua prevalenza varia dal 6-7%<sup>(15)(17)(26)</sup> al 20,8%<sup>(22)</sup>**, con la maggiore prevalenza riportata in USA nei cani di razza Greyhound (24,8%)<sup>(22)</sup> e in cani di razze giapponesi<sup>(37)</sup>. Non esistono in Italia studi relativi alla prevalenza di questo antigene nella popolazione canina. Attualmente non sono disponibili in commercio gli antisieri policlonali in grado di individuare l'antigene DEA3 che in passato sono stati utilizzati in laboratori specializzati nelle prove di agglutinazione in provetta e su colonna di gel<sup>(22)(25)(28)</sup>. **La presenza di alloanticorpi naturali diretti contro DEA3 è stata identificata nell'1,2% della popolazione canina degli Stati Uniti<sup>(25)</sup>**, ma non sono documentati casi di reazioni trasfusionali acute scatenate dagli stessi; al contrario sono stati riportati fenomeni immunologici ritardati, caratterizzati da una rapida e improvvisa rimozione degli eritrociti 5-7 giorni dopo la trasfusione<sup>(38)(39)</sup>.

## GRUPPO DEA 5

**I cani possono essere DEA5 positivi o DEA5 negativi**, poichè il sistema DEA5 è caratterizzato da un antigene e un fenotipo nullo. La sua prevalenza varia dall'11%<sup>(17)</sup> al 23% in cani di diverse razze<sup>(15)(22)(26)</sup>. Come per il DEA3 non esistono in Italia dati relativi alla sua prevalenza nella popolazione canina. La tipizzazione del gruppo DEA5 è stata realizzata solo in laboratori specializzati e si è basata sull'impiego di antisieri policlonali attualmente non disponibili in commercio, nella prova di agglutinazione in provetta<sup>(17)(22)</sup>.

La prevalenza di alloanticorpi diretti contro l'antigene DEA5 nella popolazione canina DEA5 negativa in USA che non è stata sottoposta a precedenti trasfusioni, è dello 0,8%<sup>(25)</sup>. Non sono state descritte in letteratura reazioni trasfusionali acute causate da incompatibilità con questo antigene eritrocitario, ma solo reazioni trasfusionali ritardate in cui gli eritrociti vengono rimossi in modo prematuro dal circolo<sup>(38)(39)</sup>.

## GRUPPO Dal

Il sistema *Dal* è il gruppo sanguigno di più recente scoperta, descritto per la prima volta nel 2007 ed è caratterizzato da un **singolo sistema antigenico che presenta una prevalenza piuttosto elevata (fino al 93%) nei cani di razza Dalmata**. Alcune linee famigliari di questa razza tuttavia sembrano essere prive di tale antigene. I soggetti *Dal* negativi non possiedono alloanticorpi naturali nei confronti del gruppo *Dal*, ma se un soggetto *Dal* negativo viene trasfuso con sangue *Dal* positivo sviluppa anticorpi diretti verso questo gruppo. La successiva trasfusione del soggetto con sangue *Dal* positivo porta all'insorgenza di una grave reazione emolitica che può determinare anche la morte del soggetto<sup>(6)</sup>. **Cani di molte razze differenti hanno mostrato di possedere questo antigene sulla superficie dei loro eritrociti<sup>(6)(28)</sup>**, ma

a causa della limitata disponibilità degli antisieri, la prevalenza di questo antigene non è stata valutata in modo estensivo nella popolazione canina.

## EMOCOMPATIBILITÀ NELLA SPECIE CANINA

La valutazione della compatibilità del sangue a uso trasfusionale deve comprendere **due diversi aspetti**:

1. **Valutazione del gruppo sanguigno DEA1 (e quando possibile anche DEA4 e 7) che si determina utilizzando differenti metodi commerciali** e indica l'effettiva presenza di antigeni sulla superficie eritrocitaria.
2. **Valutazione della presenza nel circolo sanguigno del donatore e del ricevente di anticorpi specifici diretti contro gli antigeni degli altri gruppi sanguigni per i quali il paziente è negativo (cross-match).**

Entrambi i test sono importanti al fine di ridurre la possibilità di insorgenza di reazioni emolitiche acute e ritardate nel ricevente e permettono di massimizzare l'efficacia e ridurre i rischi della trasfusione ematica.

### Box 1: NOTA BENE

La ancora oggi diffusa credenza che nel cane, durante la prima trasfusione ematica la compatibilità sanguigna rappresenti un problema trascurabile è smentita dalle recenti evidenze scientifiche. Infatti è stato segnalato che **l'incompatibilità con il gruppo sanguigno DEA1 si verifica nel 24% dei casi nei cani non tipizzati**<sup>(14)</sup>. Studi effettuati in cani non precedentemente trasfusi hanno rilevato un'incidenza di alloanticorpi anti DEA pari all'8%<sup>(14)(25)</sup>.

Questi risultati suggeriscono che **la trasfusione di sangue non tipizzato e non sottoposto a test di compatibilità crociata, comporta un rischio del 32% di avere reazioni trasfusionali immunologiche nel paziente**<sup>(14)</sup>. Appare quindi evidente che anche **nel cane già alla prima trasfusione è fondamentale valutare la compatibilità sanguigna.**

## TIPIZZAZIONE DEI GRUPPI SANGUIGNI NEL CANE

Una corretta tipizzazione del sangue rappresenta il primo passo fondamentale per evitare di pregiudicare il buon esito di una terapia trasfusionale e limitare l'insorgenza di reazioni avverse. Definire il gruppo sanguigno del paziente prima di una trasfusione e realizzare una trasfusione tra soggetti di gruppo sanguigno compatibile consente di evitare l'insorgenza di una reazione emolitica data dalla presenza di anticorpi verso quel determinato antigene di gruppo sanguigno.

**I test di comune impiego ambulatoriale testano solo la positività o meno all'antigene DEA1 e utilizzano anticorpi monoclonali di origine murina per l'identificazione di questo gruppo**<sup>(9)</sup>. La tipizzazione dei gruppi DEA3, 4, 5, 7 e *Dal* risulta attualmente ipotetica e la sua esecuzione è limitata a pochi centri di ricerca a causa della limitata disponibilità degli antisieri e della difficoltà legate alla realizzazione e talvolta interpretazione delle metodiche disponibili. **Idealmente il cane donatore di sangue ideale dovrebbe essere negativo per DEA1, 3, 5, 7.**

Esistono diverse metodiche per la determinazione del gruppo sanguigno nel cane che si basano su una **reazione di emoagglutinazione** che avviene in seguito a incubazione e contatto dei globuli rossi con anticorpi monoclonali o policlonali. Utilizzando questi anticorpi, l'agglutinazione rileva

la presenza degli antigeni eritrocitari testati e il cane viene così considerato positivo per quell'antigene. La mancanza di emoagglutinazione indica che il cane è negativo per l'antigene testato. Le varie metodiche in uso differiscono tra loro per l'accuratezza, il costo e il tempo di esecuzione; inoltre alcune di esse rappresentano tecniche realizzabili solo in laboratori specializzati.

Talvolta delle alterazioni patologiche dei globuli rossi possono interferire con i test per la determinazione dei gruppi sanguigni e renderne difficile l'interpretazione.

**Autoagglutinazione:** talvolta i pazienti che devono essere trasfusi possono presentare fenomeni di autoagglutinazione dei globuli rossi. Poiché i metodi di tipizzazione si basano su reazioni di agglutinazione, l'autoagglutinazione degli eritrociti canini del campione da testare interferisce con il risultato del test. In questo caso, prima di procedere al test i globuli rossi devono essere lavati con soluzione salina e se l'autoagglutinazione persiste nonostante il lavaggio degli eritrociti, il cane deve essere considerato DEA1 negativo fino a quando viene risolta la causa dell'autoagglutinazione e la tipizzazione può essere ripetuta con certezza del risultato.

**Anemia:** la tipizzazione di pazienti affetti da grave anemia può essere complicata dalla concentrazione relativamente bassa di antigeni eritrocitari che rischiano di non essere rilevati dal test. In questo caso si può provare a concentrare gli eritrociti tramite centrifugazione del campione e risospensione in una quota minore di plasma e ripetere il test.

**Recente trasfusione:** potrebbe essere difficoltoso determinare il gruppo sanguigno di un cane recentemente sottoposto a trasfusione. Infatti il test potrebbe individuare gli antigeni eritrocitari del donatore, impedendo la corretta tipizzazione del gruppo sanguigno del ricevente. Quando non è possibile determinare il gruppo sanguigno di un paziente prima di una trasfusione di emergenza, è necessario almeno prelevare un campione di sangue intero per permetterne successivamente la tipizzazione corretta.

Di seguito vengono descritti i test rapidi ad uso ambulatoriale attualmente disponibili per la determinazione del gruppo DEA1 e le altre metodiche destinate ai centri specializzati in grado di determinare anche i gruppi DEA4 e DEA7.

## TEST DI AGGLUTINAZIONE SU CARTINA (RapidVet-H, Agrolabo, Italia)

È stato il primo test disponibile per la **determinazione rapida del gruppo sanguigno DEA1** nel cane, in commercio dal 1995. Si basa sulla reazione di poche gocce di sangue da testare con anticorpi monoclonali liofilizzati sulla cartina. La comparsa di agglutinazione tra antigene e anticorpo identifica un campione di gruppo DEA1 positivo (Figura 1). Questa metodica si è dimostrata sensibile nell'identificazione del gruppo DEA1, ed è di facile e veloce realizzazione. I limiti sono una certa soggettività nell'interpretazione dei risultati<sup>(40)</sup> e la necessità del lavaggio degli eritrociti nei campioni caratterizzati da autoagglutinazione per eliminare i risultati falsi positivi. Questa metodica ha mostrato talvolta risultati discordanti con altre tecniche<sup>(32)</sup>.

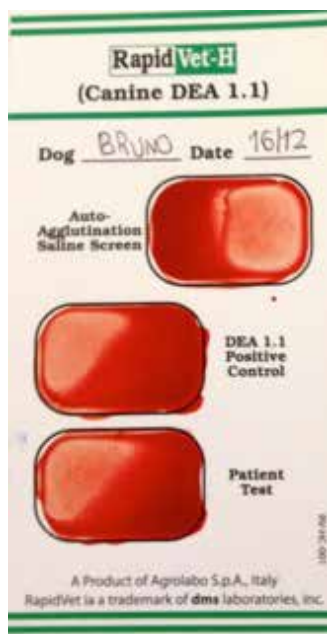


Figura 1. Campione di sangue canino valutato per il gruppo sanguigno con test di agglutinazione su cartina (RapidVet-H, Agrolabo, Italia) nel quale la presenza di una reazione di agglutinazione nel pozzetto relativo al campione del paziente (Patient test) simile a quella presente nel controllo positivo (DEA1.1 positive control) identifica un campione di gruppo sanguigno DEA1 positivo. Nel primo pozzetto viene testata ed esclusa la presenza di autoagglutinazione nel campione, condizione che inficierebbe il risultato e che richiederebbe il lavaggio dei globuli rossi con soluzione salina prima di eseguire il test.

## METODO IMMUNOCROMATOGRAFICO RAPIDO (Lab/Quick Test DEA 1, Alvedia)

Si tratta di un **test rapido per la determinazione del gruppo sanguigno DEA1** disponibile in commercio dal 2010. Esiste una versione denominata "QuickTest" adatta per uso ambulatoriale, nella quale viene fornito tutto il materiale necessario per svolgere il test e una versione denominata "LabTest"; più utilizzata in laboratori, nella quale vengono forniti solo striscette reattive e reagenti, ma non il materiale d'uso quale piastra microtiter o provette dove mettere i reagenti e pipette per raccogliere il campione di sangue necessario per l'esecuzione del test. I risultati sono leggibili in un lasso di tempo da 2 a 5 minuti. Esiste una linea di controllo che deve sempre comparire per avere la conferma che il test è stato eseguito correttamente e i globuli rossi sono migrati lungo la striscetta reattiva e una linea per la determinazione del gruppo sanguigno a livello della quale ci sono anticorpi monoclonali anti-DEA 1 (Figura 2). Questa metodica si è dimostrata sensibile e specifica nella determinazione del gruppo DEA1 del cane, di facile esecuzione e interpretazione e in grado di dare risultati in tempi rapidi<sup>(40)</sup><sup>(41)</sup><sup>(32)</sup>. Sono ancora limitati i dati sulle sue performances in campioni problematici come quelli di cani affetti da anemia emolitica immunomediata, nei quali talvolta ha dato risultati discordanti rispetto alla tecnica di agglutinazione su gel<sup>(41)</sup>.

## TEST DI AGGLUTINAZIONE SU DISPOSITIVO CON LETTURA AUTOMATIZZATA (QUICKVET/RAPIDVET, DEA 1.1 BLOOD TYPE CARTRIDGE, SCANDINAVIAN MICRO BIODEVICES)

Dal 2011 è disponibile un **test completamente automatizzato per la lettura dell'agglutinazione che si verifica tra un anticorpo monoclonale antiDEA1** e l'antigene presente sui globuli rossi DEA1 positivi. Il principio di questo test si basa sul differente assorbimento della luce del plasma contenente più o meno eritrociti. In particolare quando si verifica agglutinazione tra gli eritrociti e l'anticorpo antiDEA1, il plasma contiene meno eritrociti liberi e quindi si presenta

più chiaro rispetto a un campione nel quale non si sia verificata agglutinazione e quindi i globuli rossi sono più omogeneamente dispersi in esso. La lettura dell'agglutinazione avviene in un analizzatore e i risultati sono disponibili in 10 minuti. Questa metodica ha il vantaggio di non richiedere alcuna interpretazione da parte dell'utilizzatore poiché i risultati vengono completamente elaborati da un software. È comunque necessario osservare scrupolosamente alcune operazioni preanalitiche perché i risultati siano attendibili (corretta risospensione del sangue intero in un buffer fornito in base al suo ematocrito). Questo metodo è stato valutato in un solo studio in cui è risultato idoneo per la tipizzazione rapida del gruppo DEA1 nel cane, fornendo però talvolta risultati non conclusivi che rendono necessaria l'applicazione di altre metodiche<sup>(42)</sup>.

## TEST DI AGGLUTINAZIONE IN PROVETTA

È un test che viene realizzato in laboratori specializzati che dispongono di antisieri specifici per la determinazione dei gruppi sanguigni DEA1, DEA4, DEA7, e personale esperto. Si esegue facendo reagire i globuli rossi lavati e risospesi a una concentrazione del 3-5% con antisieri specifici in una provetta di vetro. La comparsa di una reazione di agglutinazione tra globuli rossi e antisieri identifica una reazione positiva e quindi la presenza dell'antigene caratteristico (Figura 3). Sebbene sia considerato storicamente il test "gold standard" per la determinazione dei gruppi sanguigni nel cane<sup>(28)</sup><sup>(40)</sup><sup>(43)</sup> gel (GEL) e sia stato utilizzato in molti studi epidemiologici in passato<sup>(17)</sup><sup>(20)</sup><sup>(30)</sup>, alcuni studi hanno messo in dubbio la sua validità, a causa dell'impossibile standardizzazione della metodica che utilizza antisieri policlonali prodotti tramite sensibilizzazione di cani e della soggettività nella lettura dei risultati caratterizzati da debole agglutinazione<sup>(44)</sup>.

## TEST DI AGGLUTINAZIONE SU COLONNA DI GEL (DIAMED ID GEL-TEST MICRO TYPING SYSTEM)

Analogamente alla precedente, questa metodica utilizzata per la determinazione del gruppo DEA1, è riservata ai centri di ricerca specializzati in quanto necessita di attrezzature particolari e personale esperto. La tecnica si basa sul processo di agglutinazione ed eritrosedimentazione su colonna di gel e prevede l'utilizzo di schede munite di microprovette in plastica contenenti un gel nel quale è incorporato l'antisiero per il rilevamento di gruppi DEA1. Si tratta di una metodica affidabile, di semplice e rapida esecuzione (30 minuti) che

Figura 2. Campione di sangue canino valutato con test immunocromatografico rapido (LabTest DEA 1, Alvedia, Francia). La Presenza di una banda colorata di rosso in corrispondenza di C (controllo) indica la corretta esecuzione del test e che i globuli rossi sono correttamente migrati lungo la striscetta, mentre la seconda banda presente in corrispondenza di DEA 1.1 indica che il campione è di gruppo sanguigno DEA1 positivo. Nel caso non fosse comparsa questa linea rossa il campione sarebbe stato di gruppo sanguigno DEA1 negativo.





Figura 3: Esito del test di agglutinazione in provetta con antisiero anti-DEA1: il campione a sinistra è risultato DEA1 positivo con grado di agglutinazione 3+, mentre il secondo campione (a destra dell'immagine) è risultato DEA1 negativo poiché è assente la reazione di agglutinazione tra globuli rossi e antisiero specifico.

fornisce risultati oggettivi, ovviando al grosso problema dell'interpretazione soggettiva delle reazioni<sup>(45)</sup>. Da qualche anno questo test per la determinazione del gruppo DEA1 nel cane<sup>(40)(41)(42)(43)(45)</sup> è ampiamente utilizzato in passato negli studi epidemiologici<sup>(21)</sup> as it is highly immunogenic and causes acute hemolytic transfusion reactions (HTR<sup>(45)</sup>), non è più disponibile in commercio. È disponibile un sistema simile di colonne di gel neutro (ID-card NaCl, enzyme test and cold agglutinins, BioRad) da utilizzare con diversi antisieri, che è stato utilizzato con successo per la determinazione dei gruppi sanguigni per i quali sono disponibili antisieri specifici (attualmente DEA 4, 7 e *Dal*)<sup>(22)(24)(28)</sup> (Figura 4).

## CITOFLUOROMETRIA

La citofluorometria con l'utilizzo di antisieri anti DEA1 si è dimostrata un metodo accurato per la determinazione del gruppo sanguigno DEA 1 nel cane<sup>(8)(16)(32)(44)</sup> e ha anche permesso di evidenziare come le piastrine di cane non posseggano questo antigene di superficie e quindi non siano responsabili di reazione trasfusionali di incompatibilità di gruppo sanguigno<sup>(44)</sup>. La limitazione nell'utilizzo di questa metodica risiede nei costi dell'attrezzatura, nella particolare specializzazione per la lettura e interpretazione dei risultati e nella limitata disponibilità degli antisieri DEA1.

## PROVE DI COMPATIBILITÀ CROCIATA (CROSS-MATCH)



Figura 4. Test di agglutinazione su colonna di gel per la determinazione dei gruppi sanguigni DEA 4 e DEA 7. Il campione identificato con il numero 39 (colonne di gel a sinistra dell'immagine) è risultato di gruppo sanguigno DEA 4 positivo (reazione di agglutinazione di massimo grado, 4+) e DEA 7 negativo (assenza di agglutinazione). Il campione identificato con il numero 40 (tre colonne di gel a destra) è risultato di gruppo sanguigno DEA4 positivo (grado di agglutinazione 4+) e DEA 7 positivo (grado di agglutinazione 3+). L'assenza di agglutinazione nella colonna di gel identificata con C (controllo) in entrambi i campioni significa che il campione è negativo per autoagglutinazione e quindi i risultati del test possono essere ritenuti validi.

La determinazione del gruppo sanguigno identifica gli antigeni presenti sulla superficie dei globuli rossi, mentre con i test di **compatibilità crociata si valuta la compatibilità tra il plasma e i globuli rossi del donatore e del ricevente.**

Le prove di compatibilità crociata (cross-match) consentono l'individuazione di anticorpi naturali preformati (alloanticorpi) o di anticorpi prodotti in seguito a sensibilizzazione del ricevente. **Il cane può possedere alloanticorpi naturali nei confronti dei gruppi DEA3, 5 e 7 che sono responsabili della distruzione prematura dei globuli rossi trasfusi.** Inoltre il gruppo sanguigno *Dal* per il quale non esistono test commerciali di rapido e facile utilizzo per la tipizzazione, è responsabile della sensibilizzazione dei soggetti *Dal* negativi in caso di trasfusioni incompatibili.

**Il cross match, deve sempre far parte delle procedure di compatibilità tra donatore e ricevente, ma la sua determinazione è assolutamente imperativa nei soggetti che abbiano già ricevuto trasfusioni o che abbiano anamnesi muta.** Non sostituiscono la determinazione del gruppo sanguigno, ma ne sono un fondamentale complemento.

**L'esito negativo del cross match non rende una trasfusione sicura al 100%** in quanto ci possono essere livelli anticorpali molto bassi che non vengono rilevati dalla prova, ma che sono sufficienti per determinare una reazione emolitica di modesta entità. Inoltre va ricordato che il cross match riconosce anticorpi rivolti verso gli antigeni eritrocitari, ma non quelli diretti contro le piastrine e i leucociti, che sono responsabili di reazioni trasfusionali febbrili non emolitiche. La prova di cross-match si compone di una **prova Major e una prova Minor.**

1. **La prova crociata Major rileva la presenza nel sangue del ricevente di anticorpi contro gli eritrociti del donatore.** In caso di positività la trasfusione va evitata in quanto l'utilizzo del sangue di quel donatore potrebbe provocare una grave reazione emolitica acuta.
2. **La prova crociata Minor rivela la presenza di anti-**

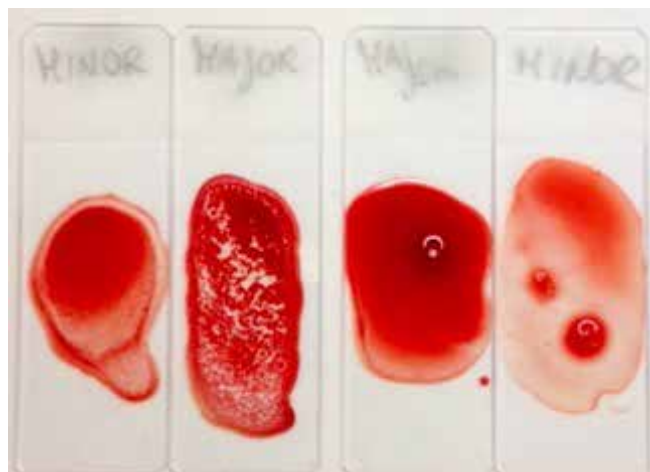


Figura 5: Prova di compatibilità crociata (cross-matching) eseguita su vetrino realizzata mettendo a contatto il plasma del ricevente e la sospensione di globuli rossi lavati del donatore (prova major) e il plasma del donatore e i globuli rossi del ricevente (prova minor). I due vetrini a sinistra indicano una prova minor e major incompatibili poiché in entrambi i casi si è verificata agglutinazione macroscopica. Identificano invece un donatore e un ricevente compatibile le prove effettuate nei due vetrini di destra, nei quali non si è verificata alcuna reazione di agglutinazione identificabile sia a livello macroscopico sia a livello microscopico.

**corpi nel sangue del donatore contro i globuli rossi del ricevente.** In caso di positività è necessario evitare trasfusioni di elevate quantità di plasma e di sangue intero, ma si può procedere alla trasfusione del concentrato di eritrociti.

Come per la determinazione dei gruppi sanguigni, anche per le prove di cross match l'autoagglutinazione o l'emolisi del sangue del paziente possono dare origine a risultati falsamente positivi. Per questa ragione è sempre necessario allestire contemporaneamente un pozzetto di controllo di questi fenomeni, quando si valuta la compatibilità.

Le prove di cross match possono essere eseguite con diverse metodiche. La più utilizzata è la prova di agglutinazione su vetrino (Box 2) (Figura 5) o in provetta<sup>(46)</sup>, ma di recente è stata commercializzato anche un kit rapido ad uso ambulatoriale (Figura 6).

## CROSS MATCHING TRAMITE TECNICA IMMUNOCROMATOGRAFICA (CANINE CROSSMATCH TEST XM, ALVEDIA)

Da alcuni anni recenti è disponibile in commercio un kit per la determinazione della prova cross-match Major. Si tratta di un test rapido, ma richiede comunque il lavaggio dei globuli rossi e consente di realizzare la prova in circa 20 minuti (Figura 6). Non sono ancora disponibili dati scientifici circa le sue performances.

### Cross matching su vetrino (Box 2)

- prelevare dal ricevente e dal donatore (o dell'unità ematica) 0,5-1ml di sangue posto in provetta con anticoagulante (EDTA, CPDA)
- centrifugare le quattro provette (1000-1500 g per 5-10 minuti)
- separare i globuli rossi dal plasma e riporlo in provette vuote contrassegnate;
- lavare i globuli rossi aggiungendo 1-2 ml di soluzione salina (NaCl 0,9%) per risospendere gli eritrociti di entrambi i campioni (donatore e ricevente);
- centrifugare, eliminare il surnatante e aggiungere nuovamente 1-2 ml di soluzione salina;
- ripetere questa procedura di lavaggio per tre volte;
- al termine dei lavaggi risospendere i globuli rossi lavati al 4% (4,8 ml di soluzione salina NaCl 0,9% e 0,2 ml di pellet di globuli rossi)
- etichettare quattro vetrini e posizionare su ogni vetrino una goccia di plasma e una goccia di sospensione di globuli rossi, in base al vetrino:
  1. **controllo del donatore** (globuli rossi e siero o plasma del donatore)
  2. **prova crociata Major** (sospensione dei globuli rossi lavati del donatore e plasma del ricevente)
  3. **prova crociata Minor** (sospensione dei globuli rossi lavati del ricevente e plasma del donatore)
  4. **controllo del ricevente** (globuli rossi e siero o plasma del ricevente)
- miscelare le gocce, ruotare il vetrino e valutare entro due minuti macroscopicamente la comparsa di agglutinazione;
- entro cinque minuti valutare il vetrino anche microscopicamente per la presenza di microagglutinati (a 40x e in immersione a 100x)<sup>(46)</sup>

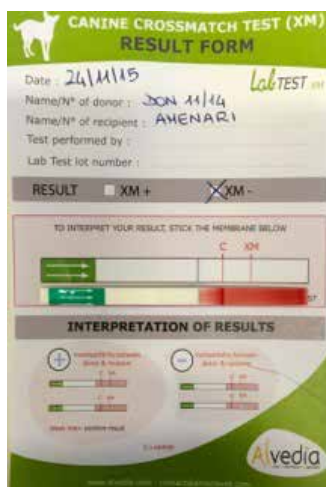


Figura 6: Prova cross matching major realizzata con test immunocromatografico. La presenza della banda rossa in corrispondenza di C (controllo) indica che il test è stato eseguito correttamente e i globuli rossi del campione sono migrati lungo la striscetta, mentre l'assenza della banda in corrispondenza di XM indicata una prova cross matching major negativa e quindi un campione di sangue del donatore compatibile con il ricevente.

## BIBLIOGRAFIA

1. Swisher SN, Young LE. The blood grouping systems of dogs. *Physiological Reviews*, 1961; 41:495–520.
2. Young LE, Ervin DM, Yuile CL. Hemolytic reactions produced in dogs by transfusion of incompatible dog blood and plasma; serologic and hematologic aspects. *Blood*, 1949; 4(11):1218–31.
3. Young LE, Yuile CL. Observations on hemolytic reactions produced in dogs by transfusion of incompatible dog blood. *The Journal of Clinical Investigation*, 1948; 27(4):563.
4. Vriesendorp HM, Albert ED, Templeton JW, Belotsky S, Taylor B, Blumenstock DA, Bull RW, Cannon FD, Epstein RB, Ferrebee JW, Grosse-Wilde H, Hammer C, Krumbacher K, Léon S, Meera Khan P, et al. A joint report of the Second International Workshop on Canine Immunogenetics. *Transplantation proceedings*, 1976; 8(2):289–314.
5. Vriesendorp HM, Westbroek DL, D'Amaro J, van der Does JA, van der Steen GJ, van Rood JJ, Albert E, Bernini L, Bull RW, Cabasson J, Epstein RB, Erikson V, Feltkamp TE, Flad HD, Hammer C, et al. Joint report of 1st International Workshop on Canine Immunogenetics. *Tissue antigens*, 1973; 3(2):145–63.
6. Blais MC, Berman L, Oakley D, Giger U. Canine Dal blood type: A red cell antigen lacking in some Dalmatians. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2007; 21(2):281–286.
7. Corato A, Mazza G, Hale AS, Barker RN, Day MJ. 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. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1997; 59:213–223.
8. Polak K, Acierno MM, Raj K, Mizukami K, Siegel DL, Giger U. Dog erythrocyte antigen 1: mode of inheritance and initial characterization. *Veterinary Clinical Pathology*, 2015; 44(3):369–79.
9. Andrews GA, Chavey PS, Smith JE. Production, characterization, and applications of a murine monoclonal antibody to dog erythrocyte antigen 1.1. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1992; 201(10):1549–52.
10. Blais MC, Rozanski EA, Hale AS, Shaw SP, Cotter SM. Lack of evidence of pregnancy-induced alloantibodies in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2007; 23(3):462–5.
11. Hohenhaus AE. Importance of Blood Groups and Blood Group Antibodies in Companion Animals. *Transfusion Medicine Reviews*, 2004; 18(2):117–126.
12. Tocci LJ. Transfusion medicine in small animal practice. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 2010; 40(3):485–94.
13. Lanevski A, Wardrop KJ. Principles of transfusion medicine in small animals. *The Canadian Veterinary Journal*, 2001; 42(6):447–54.
14. Hale AS. Canine blood groups and blood typing. Pp. 280–283 in Day M, Kohn B (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. 2nd Editio. Gloucester, UK: BSAVA, 2012.
15. Hale AS. Canine Blood Groups and their Importance in Veterinary Transfusion Medicine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 1995; 25(6):1323–1332.
16. Acierno MM, Raj K, Giger U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analyzed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2014; 28(2):592–598.
17. Hale AS, Werfelmann J, Lemmons M, Smiler B, Gerlach J. An evaluation of 9570 dogs by breed and dog erythrocyte antigen typing. Pp. 687–824 in *Research Abstract Program of the 26th Annual ACVIM Forum San Antonio, TX, June 4 - June 7, 2008J. Vol 22. Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2008.
18. 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. *Journal of the South African Veterinary Association*, 2002; 73(2):53–6.
19. Ferreira RRF, Gopegui RR, Matos AJF. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal. *Veterinary Clinical Pathology*, 2011; 40(2):198–201.
20. Sinnott Esteve V, de Almeida Lacerda L, Lasta CS, Pedralli V, Gonzalez FHD. Frequencies of DEA blood types in a purebred canine blood donor population in Porto Alegre, RS, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2011:178–181.
21. Ergul Ekiz E, Arslan M, Ozcan M, Gultekin GI, Gulay OY, Kirmizibayrak T, Giger U. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 in 4 breeds native to different areas in Turkey. *Veterinary Clinical Pathology*, 2011; 40(4):518–523.
22. Iazbik MC, O'Donnell M, Marin L, Zaldivar S, Hudson D, Couto CG. Prevalence of dog erythrocyte antigens in retired racing Greyhounds. *Veterinary Clinical Pathology*, 2010; 39(4):433–435.
23. Mesa-Sanchez I, Ruiz de Gopegui-Fernández R, Granados-Machuca MM, Galan-Rodriguez a. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in galgos (Spanish greyhounds). *The Veterinary record*, 2014:1–4.
24. Spada E, Proverbio D, Viñals Flórez LM, Del Rosario Perlado Chamizo M, Perego R, Bagnagatti De Giorgi G, Baggiani L. Prevalence of dog erythrocyte antigens 1, 4, and 7 in galgos (Spanish Greyhounds). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2015.
25. Hale AS, Wefelmann J. Incidence of canine serum antibody to known dog erythrocyte antigens in potential donor population. Pp. 697–802 in *Research Abstract Program of the 24th Annual ACVIM Forum Louisville, KY, May 31 - June 3, 2006. Vol 20. Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2006.
26. Giger U, Gelens CJ, Callan MB, Oakley DA. An acute hemolytic transfusion reaction caused by dog erythrocyte antigen 1.1 incompatibility in a previously sensitized dog. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1995; 206:1358–1362.
27. Christian RM, Ervin DM, Swisher SN, O'Brien WA, Young LE. Hemolytic Anemia in Newborn Dogs Due to Absorption of Isoantibody from Breast Milk During the First Day of Life. *Canadian Journal of Comparative Medicine and Veterinary Science*, 1950; 14(3):125.
28. Kessler RJ, Reese J, Chang D, Seth M, Hale AS, Giger U. Dog erythrocyte antigens 1.1, 1.2, 3, 4, 7, and Dal blood typing and cross-matching by gel column technique. *Veterinary Clinical Pathology*, 2010; 39(3):306–16.
29. Spada E, Gavazza A, Ferro E, Lubas, G, Mangili V, Antognoni MT, Miglio A, Proverbio D. Prevalence of Dog Erythrocyte Antigens 4 and 7 in Italian canine blood donors using gel agglutination technique. in *25th ECVIM-CA Congress, September 10th-12th, Lisbon, Portugal. 2015.*
30. Miller SA, Hohenhaus AE, Hale AS. Case-control study



- of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2004; 224(2):232–5.
31. Esteves VS, Lacerda L, Lasta CS, Pedralli V, González FHD. Frequencies of DEA blood types in a purebred canine blood donor population in Porto Alegre, RS, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 2011; 31(2):178–181.
  32. Carminato A, Stefani A, Mutinelli F, Vascellari M. Extended blood typing by flow-citometry (dog erythrocyte antigen 1.1, 1.x, 4, 7) in the framework of a canine blood donor volunteer program. in *European Society of Veterinary Clinical Pathology (ESVCP)/ European College of Veterinary Clinical Pathology (ECVCP) 16th Annual Congress Milan, Italy —October 1–4, 2014*. 2014.
  33. Melzer KJ, Wardrop KJ, Hale AS, Wong VM. A hemolytic transfusion reaction due to DEA 4 alloantibodies in a dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2003; 17(6):931–3.
  34. Smith CA. Transfusion medicine: the challenge of practical use. *Journal of American Veterinary Medical Association*, 1991; 198(5):747–752.
  35. Carli E, Capello K, Carminato A, Furlanello T, Antognoni MT, Miglio A, Proverbio D, Spada E, Stefani A, Vascellari M. Frequenza dell'espressione dell'antigene eritrocitario DEA1 nel cane. in *Congresso Internazionale SCIVAC, 29-31 Maggio 2015, Rimini, Italia*. 2015.
  36. Bagnagatti De Giorgi G, Miglio A, Spada E, Gavazza A, Dondi F, Agnoli C, Proverbio D, Antognoni MT, Famigli Bergamini P, Ferro E, Mangili Pecci V. Suitability of four dog breeds as canine blood donors in four University blood banks. in *LXVII Convegno Nazionale S.I.S.Vet Società Italiana Delle Scienze Veterinarie*. 2013.
  37. Ejima H, Nomura K, Bull RW. Breed differences in the phenotype and gene frequencies in canine D blood group system. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 1994; 56(4):623–6.
  38. Young LE, O'Brien WA, Miller G, Swisher SN, Ervin DM, Christian RM, Yuile CL. Erythrocyte-isoantibody reactions in dogs. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 1951; 13(6):209–13.
  39. Swisher SN, Young LE, Trabold N. In vitro and in vivo studies of the behavior of canine erythrocyte-isoantibody systems. *Annals New York Academy of Sciences*.:15–25.
  40. Seth M, Jackson KV, Winzelberg S, Giger U. Comparison of gel column, card, and cartridge techniques for dog erythrocyte antigen 1.1 blood typing. *American Journal of Veterinary Research*, 2012; 73(2):213–219.
  41. Blois SL, Richardson DM, Abrams-Ogg ACG. Comparison of a gel column blood typing method and a point-of-care cartridge for dog erythrocyte antigen 1.1. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2013; 23(3):340–3.
  42. Kohn B, Classe G, Weingart C. Clinical evaluation of the QuickVet(R)/RapidVet(R) canine dog erythrocyte antigen 1.1 blood-typing test. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2012; 24(3):539–45.
  43. Giger U, Stieger K, Palos H. Comparison of various canine blood-typing methods. *American Journal of Veterinary Research*, 2005; 66(8):1386–1392.
  44. de A Lucidi C, Takahira RK, Gerlach JA, Davis JM, Schwartz KA, Scott MA. Flow cytometric assessment of canine erythrocytes and platelets for dog erythrocyte antigen 1.1. *Veterinary Clinical Pathology*, 2011; 40(4):435–43.
  45. Manuti F, Pozza O, Proverbio D. Valutazione di una nuova metodica per la tipizzazione del gruppo DEA1. *SUMMA*, 2004; 7:39–45.
  46. Abrams-Ogg A. *Practical Blood Transfusion*. Pp. 263–303 in Day M, Mackin A, Littlewood J (eds). *BSAVA Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. 1 Edition. Gloucester, UK: BSAVA, 2000.