



AGROLABO
User Manual RapidVet-H Feline

AGROLABO SpA Diagnostic Division
Via Masero 59, 10010 Scarmagno (TO) - Italy
Tel. +39 0125 731111 - Fax +39 0125 731190
www.agrolabo.it - agrolabo@agrolabo.it

RapidVet-H Feline

Determinazione del gruppo sanguigno del gatto

DESCRIZIONE E MODALITA' D'USO

La pratica della trasfusione medica veterinaria è cresciuta notevolmente in questi anni e l'importanza di identificare i gruppi sanguigni nei gatti è parallelamente aumentata. In particolare, la domanda per l'identificazione dei gruppi sanguigni di Persiani, Abissini ed altre razze costose è in aumento, poiché solo predeterminando il gruppo sanguigno in un ricevente di trasfusione sanguigna si possono evitare errori di trasfusione fatali.

È stato descritto nei gatti un sistema di gruppi sanguigni consistente in due antigeni espressi sia da soli che in combinazione: Tipo A, Tipo B e Tipo AB. Gli antigeni non sono correlati con gli antigeni A B O umani e sono definiti da alloantisieri felini. La frequenza dei gruppi sanguigni è variabile tra le razze. La maggior parte dei gatti possiede antigeni di tipo A e solo un terzo di questi possiede naturalmente bassi titoli di anticorpi anti-B. I gatti di tipo B posseggono naturalmente alti titoli anticorpali anti-A. Studi recenti hanno dimostrato che la frequenza di gatti di tipo B varia dallo 0.3% al 59% in relazione con la razza. I gatti di tipo AB sono rari ed hanno antigeni sia di tipo A che di tipo B sulla membrana eritrocitaria e non sviluppano anticorpi anti-A ed anti-B.

La tipizzazione sanguigna nei gatti è importante nella pratica veterinaria per prevenire le reazioni trasfusionali in gatti con eritrociti A o B. I gatti con eritrociti di tipo B sviluppano un'immediata reazione anafilattica sistemica (ipotensione, bradicardia, apnea, urinazione, defecazione, vomito e grave depressione neurologica) e segnali emolitici (emoglobinemia ed emoglobinuria) quando vengono trasfusi con sangue di tipo A poiché possiedono alti titoli di anticorpi anti-A.

I gatti con eritrociti di tipo A e bassi titoli anticorpali anti-B sviluppano solo una debole reazione quando vengono trasfusi con sangue di tipo B, ma questo può comunque influenzare il decorso della malattia poiché gli eritrociti hanno una vita più breve. Altri gatti con eritrociti A non sviluppano reazioni quando vengono trasfusi per la prima volta con sangue di tipo B, ma sviluppano moderati titoli di anticorpi anti-B che determineranno una seria reazione in una seguente trasfusione incompatibile. I gatti di tipo AB non esibiscono reazioni trasfusionali basate su incompatibilità di tipo A o B e possono ricevere sangue sia di tipo A che di tipo B. La determinazione dei gruppi sanguigni nei gatti è importante per eventuali decisioni negli incroci e per capire i problemi medici nei cuccioli. L'isoeritrolisi neonatale avviene quando esiste incompatibilità tra sangue materno e sangue fetale. Poiché in gatti di tipo B esistono naturalmente alti titoli di anticorpi anti-A, l'isoeritrolisi neonatale può avvenire in gattini di tipo A risultanti dall'incrocio di un maschio di tipo A e una femmina di tipo B. Gli anticorpi materni anti-A presenti nel colostro vengono assorbiti dai gattini e conseguentemente distruggono i loro eritrociti. I gattini, che sembrano normali alla nascita, muoiono entro pochi giorni. La determinazione del gruppo sanguigno della femmina e del maschio prima dell'accoppiamento può minimizzare l'isoeritrolisi neonatale.

Il kit RapidVet-H Feline è da utilizzarsi per la classificazione dei gatti come tipo A, B o tipo AB. Gli antisieri liofilizzati sulla carta sono ricostituiti e vengono mescolati con il sangue intero del paziente. Tutti gli eritrociti di tipo A reagiscono con il loro specifico antisiero causando agglutinazione, tutti gli eritrociti di tipo B reagiscono in modo simile. Tutti gli eritrociti di tipo AB reagiscono con entrambi gli antisieri e si avrà agglutinazione in tutti i casi. I risultati sono interpretabili visivamente. Le caratteristiche dell'agglutinazione nel pozzetto A e nel pozzetto B sono molto differenti a causa della natura degli antisieri utilizzati.

PRINCIPIO DEL TEST

Il kit RapidVet-H Feline è basato su una reazione di agglutinazione che avviene quando un eritrocita che possiede antigeni di tipo A, B o AB sulla sua membrana cellulare interagisce con antisieri liofilizzati specifici per il particolare antigene.

Gli eritrociti di tipo A sono caratterizzati dall'antigene glicolipidico NeuGc₂GD₃ presente sulla membrana. Il kit RapidVet-H Feline usa un anticorpo monoclonale murino specifico per tale antigene, liofilizzato sulla carta. L'anticorpo determina la capacità del test di legare ed agglutinare gli antigeni caratteristici del sangue di tipo A.

Gli eritrociti di tipo B sono caratterizzati dalla forma NeuAc₂GD₃ dell'acido neuraminico presente nei gangliosidi e manca la NeuGc presente negli eritrociti di tipo A. È noto il legame specifico di questa forma con la lectina da *Triticum vulgare*. Il kit RapidVet-H Feline usa la lectina da *Triticum vulgare* per evidenziare la presenza di sangue di tipo B.

ATTENZIONE: Un certo numero di pazienti presenta una reazione di auto-agglutinazione eritrocitaria di vario grado dovuta a fattori sierici. Il test RapidVet-H Feline fornisce un pozzetto senza reagenti da usare per il riconoscimento di tali pazienti ("Auto-Agglutination Saline Screen"). Se il paziente presenta tale reazione di auto-agglutinazione, non sarà possibile tipizzarlo senza prima separare il siero e lavare i restanti eritrociti prima dell'esecuzione del test. Il lavaggio si effettua centrifugando il campione di sangue intero per 5 minuti a 2000 rpm. Si preleva il surnatante e si aggiunge uguale quantità di soluzione fisiologica. Nel caso fosse ancora presente auto-agglutinazione si può ripetere il lavaggio.

COMPONENTI DEL KIT

- Carte di agglutinazione. Ogni carta ha 3 pozzetti identificati come "Auto-Agglutination Saline Screen", "Patient test -Type A" e "Patient test -Type B". Le carte sono sigillate individualmente in sacchetti di polietilene contenente un sacchetto di dissecante. Le carte devono essere conservate a temperatura ambiente (+20-25 °C).
- Flacone di diluente: il flacone contiene 0,02 mol/L di tampone fosfato salino a pH 7,4 e dispensa circa 50 µl/goccia. Conservare il flacone a temperatura ambiente (+20-25 °C).
- Sacchetto con pipette e bacchette: 1 pipetta e 3 bacchette per test.

Materiale richiesto non fornito: nessuno.

Preparazione dei reattivi: nessuna.

CONSERVAZIONE E SCADENZA

1. La carta di agglutinazione è stabile a temperatura ambiente (+20-25 °C) per un periodo di 18 mesi dalla data di produzione. Sul retro di ogni carta è impressa la data di scadenza.
2. Il diluente è stabile per 24 mesi dalla data di produzione. La validità del reagente è indicata nell'etichetta del flacone.

N.B.: Ogni kit RapidVet-H Feline riporta una data di scadenza che è quella del componente con la validità più breve. Altri componenti possono avere una data di scadenza più lunga ma il loro utilizzo con componenti di altri kit è sconsigliato.

CAMPIONE

Utilizzare sangue intero di gatto con anticoagulante (EDTA).

È possibile conservare i campioni in frigorifero (+2-8 °C), ma si raccomanda di testare i campioni di sangue entro max 5 giorni dal prelievo.

PROCEDURA D'ANALISI

1. Prelevare un minimo di 0,4 ml di sangue dal paziente con una siringa contenente EDTA come anticoagulante. Il test richiede solo 150 µl di sangue intero.
2. Rimuovere la carta dal sacchetto di plastica, scrivere il nome del gatto e la data del test e posizionare la carta su una superficie piana.
3. Dispensare 1 goccia di diluente (50 µl) nel pozzetto segnato come "Auto-Agglutination Saline Screen".
4. Aspirare una piccola quantità del campione del paziente nella pipetta di plastica e aggiungere 1 goccia (50 µl) nel pozzetto denominato "Auto-Agglutination Saline Screen". Questo pozzetto non contiene reagenti. Usando una bacchetta, distribuire e mescolare il materiale dentro il pozzetto per circa 10 secondi. (Per il corretto uso della pipetta guardare "NOTA"). Una piccola percentuale di gatti malati o sani presenta auto-agglutinazione. Se si osserva auto-agglutinazione procedere con il lavaggio dei globuli rossi come indicato precedentemente (paragrafo Principio del test) prima di tipizzare il campione. Se non si osserva agglutinazione nel pozzetto "Auto-Agglutination Saline Screen" continuare la procedura.
5. Dispensare 1 goccia di diluente (50 µl) in ciascuno dei rimanenti pozzetti. Il diluente è necessario per la ricostituzione del materiale liofilizzato.
6. Aspirare una piccola quantità del campione del paziente nella pipetta di plastica e depositare 1 goccia (50 µl) in ognuno dei due pozzetti denominati "Patient Test Type A" e "Patient Test Type B". Usando una nuova bacchetta per ogni pozzetto, distribuire e mescolare il materiale esercitando una leggera pressione dentro il pozzetto per circa 10 secondi. Smaltire la pipetta e le bacchette in appositi contenitori.
7. Aggiungere una seconda goccia di diluente nel pozzetto "Patient Test Type A". Non mescolare con la bacchetta.
8. Ruotare delicatamente la carta al fine di consentire il mescolamento dei reagenti presenti nei pozzetti. Aver cura di evitare cross-contaminazione tra i due diversi pozzetti "Patient Test Type A" e "Patient Test Type B".
9. Inclinare la carta con un angolo di 20-30° per fare in modo che l'eccesso di sangue sia ad una estremità del pozzetto. Leggere il risultato ed annotare dove è avvenuta agglutinazione.

NOTA: Uso della pipetta: prendere la pipetta tra le dita, dalla parte chiusa e più larga ed esercitare una pressione. Tenere il campione in posizione verticale e mettere la parte aperta della pipetta sulla superficie del campione. Ridurre la pressione delle dita in modo da far salire il campione all'interno. Tenendo la pipetta in posizione verticale posizionarsi direttamente sul pozzetto nel quale il campione deve essere dispensato. Schiacciare delicatamente in modo che solo 1 goccia cada all'interno del pozzetto (50 µl). La pipetta è predisposta per l'erogazione di una piccola quantità eccedente i 50 µl per compensare la quantità di campione trattenuta dalla bacchetta. Usare ogni pipetta e ogni bacchetta una sola volta. In nessun caso devono essere riutilizzate in quanto potrebbero verificarsi cross-contaminazioni che potrebbero causare risultati non attendibili.

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Se il test è stato eseguito in modo corretto, visibili e grosse agglutinazioni saranno avvenute in almeno uno dei pozzetti identificati come "Patient Test".

Se il campione agglutina nel pozzetto "Type A" il gatto testato è di gruppo A.

Se il campione agglutina nel pozzetto "Type B" il gatto testato è di gruppo B.

Se il campione agglutina in entrambi i pozzetti il gatto è di gruppo AB.

Ogni fine granulazione che si possa sviluppare dopo 2 minuti non deve essere considerata. Il tipo di agglutinazione nel tipo B è diversa da quella nel tipo A. L'agglutinazione nel tipo B è un piccolo numero di grossi aggregati. L'agglutinazione nel tipo A è un grosso numero di piccoli aggregati.

Se il paziente è molto anemico, ci potrebbe essere un numero insufficiente di globuli rossi per ottenere una significativa agglutinazione se il paziente è di gruppo A.

Se il paziente ha un basso volume eritrocitario può essere utile eseguire il test non aggiungendo il diluente nei pozzetti per il campione (Type A e Type B).

LIMITI DELLA PROCEDURA

1. Per ottenere risultati attendibili è necessario che la procedura sia seguita accuratamente.
2. Usare una sola pipetta per dispensare il campione e una nuova bacchetta per ogni pozzetto. Il loro riutilizzo potrebbe causare cross-contaminazioni e risultati non attendibili.
3. La stabilità dei componenti del kit è variabile. Conservare i componenti come indicato sulle etichette. Non usare nessun componente dopo la data di scadenza. L'utilizzo di materiale scaduto può causare inattendibilità dei risultati.
4. Il diluente è fornito nel flacone con contagocce per minimizzare eventuali contaminazioni batteriche o di altro tipo. Non devono essere utilizzati altri diluenti provenienti da altre fonti.
5. Prelevare sempre un minimo di 0,4 ml di sangue nella provetta contenente EDTA. Una quantità minore di sangue causerebbe una elevata concentrazione di EDTA nel campione che deve essere testato.

RapidVet-H Feline

Feline Blood Group Determination

DESCRIPTION AND INTENDED USE

As the practice of veterinary transfusion medicine has grown significantly in recent years, the importance of identifying blood groups in cats has increased. In particular, the demand for identifying blood groups is on the rise, because only by predetermining the blood type of a blood transfusion recipient can potentially fatal transfusion mistakes be avoided. One blood group system consisting of two antigens expressed either alone or in combination has been described in cats: Type A, Type B and Type AB. The antigens are unrelated to human A B O antigen and are defined by feline alloimmune sera. Blood group incidence varies among breeds. Most cats possess the A antigen, and about one-third of those have naturally occurring, low-titered, anti-B antibody. Type B cats all have a naturally occurring, highly titered anti-A antibody. Recent studies have shown that the percentage of cats with the B antigen varies from 0.3% to 59% depending on the breed. Type AB cats are rare and since such cats have both A and B antigens on the erythrocyte membrane, they do not have or develop anti-A or anti-B antibodies.

Blood typing of cats is important in veterinary medical practice to prevent transfusion reactions in cats with A or B erythrocytes. Cats with B erythrocytes exhibit an immediate and catastrophic systemic anaphylactic reaction (hypotension, bradycardia, apnea, urination, defecation, vomiting, and severe neurological depression) and hemolytic signs (hemoglobinemia and hemoglobinuria) when transfused with Type A blood because of their natural high-titered anti-A antibody. Those cats with A erythrocytes and natural low-titered anti-B antibody will exhibit only a mild reaction when transfused with the B blood, but even this can make a difference in recovery rates in a medical situation since the transfused erythrocytes have a short life span. Other cats with A erythrocytes will not exhibit a reaction when first transfused with Type B blood but will, as a result, develop moderate titers of anti-B antibody that will result in a serious reaction upon a subsequent incompatible transfusion. Type AB cats will not exhibit transfusion reaction based on type A or B incompatibility and can receive both type A and B blood.

Blood group determination in cats is also important in making breeding decisions and in understanding medical problems in kittens. Neonatal isoerythrolysis can occur when there is blood group incompatibility between maternal and fetal blood. Because of the naturally occurring highly titered anti-A antibodies in Type B cats, neonatal isoerythrolysis can occur in Type A kittens resulting from a mating of a Type B queen with a Type A male. The maternal anti-type A antibodies occur in the colostrum where they can be absorbed by the newborn kitten, and consequently, destroy their erythrocytes. Clinically, the kittens can seem normal at birth, but develop signs after nursing, fade and die within a few days. Determining the blood groups of the queen and the male prior to mating, coupled with appropriate genetic counseling, can minimize neonatal isoerythrolysis.

RapidVet-H Feline is intended for use to classify cats as blood group Type A, Type B, or Type AB. The antisera lyophilized on a Test Card are reconstituted and well mixed with whole blood from the patient. All Type A erythrocytes react with their specific antiserum causing agglutination; all Type B erythrocytes react similarly. All Type AB erythrocytes react with both antisera causing agglutination in all cases. The results are visually identified. The characteristics of the agglutination in the "Type A" well and in the "Type B" well differs significantly because of the different nature of the antisera used.

TEST PRINCIPLE

The RapidVet-H Feline assay is based on the agglutination reaction that occurs when an erythrocyte which contains either a Type A, Type B or a Type AB antigen on its surface membrane interacts with a lyophilized antiserum specific to the particular antigen. Type A erythrocytes are characterized by the NeuGc₂GD₃ form glycolipid antigen on its surface membrane. RapidVet-H Feline uses a murine monoclonal antibody proven specific to this antigen lyophilized on the test card. The antibody molecule gives it the ability to bind and agglutinate antigens specific to Type A blood. Type B erythrocytes are characterized by the NeuAc₂GD₃ form of neuraminic acid present in the ganglioside and by the lack of the NeuGc which is present on Type A erythrocytes. The binding specificity of this form with the lectin from *Triticum vulgare* has been established. RapidVet-H Feline uses the lectin from *Triticum vulgare* to detect the presence of Type B blood.

WARNING: A certain number of feline patients exhibit auto-agglutination of varying degrees due to serum factors. Rapidvet-H Feline provides a reagent-free well to be used for the recognition of these patients ("Auto-Agglutination Saline Screen"). If a patient exhibits auto-agglutination, it will not be possible to definitively type this patient without separating the serum and serially washing the remaining red cells before performing the test. Red blood cell washing is carried out by centrifuging the sample at 2000 rpm for 5 minutes. After centrifugation, the supernatant is collected and the same volume of physiologic solution is added. Then, the operator must suspend the sample again and check if agglutination still appears. If so, he has to repeat the washing procedure again.

KIT COMPONENTS

- Agglutination Test Cards. Each card has 3 visually defined wells identified as "Auto-Agglutination Saline Screen", "Patient test Type A" and "Patient Test Type B". The cards are packaged individually in sealed polyethylene sleeves each containing a desiccant bag. Store at room temperature (+20-25 °C).
- Diluent bottle. The clear plastic bottle contains 0.02 mol/L phosphate buffered saline (PBS) at pH 7.4. The dropping tip dispenses 50 µL. Store at room temperature (+20-25 °C).
- 1 bag with pipettes and stirrers in a polyethylene bag: 1 pipette and 3 stirrers for each test.

Materials required but not provided: none.

Reagent preparation: none.

STORAGE AND SHELF LIFE

1. The agglutination Test Cards are stable at room temperature (+20-25 °C) for a period of 18 months from date of manufacture. The expiry date is printed on the back of each card.
2. The diluent is stable for 24 months from the date of manufacture. The validity of the reagent is indicated on the label.

Note: Each RapidVet-H Feline kit has an expiry date which is that of the component with the shortest validity. Other components may have a longer expiry date but their use with components of other kits should not be performed.

SAMPLE

Use feline whole blood with anticoagulant (EDTA).

Samples can be stored in the refrigerator (+2-8 °C). It is recommended to perform the test within max 5 days after drawing.

TEST PROCEDURE

1. Draw minimum 0.4 ml blood from the patient into a syringe containing EDTA as an anticoagulant. The assay requires only 150 µl of whole blood.
2. Remove the Test Card from its plastic sleeve, write the name of the cat and test date on the card. Place the Test Card on a flat surface.
3. Add 1 drop of diluent (50 µl) from the dropping bottle into the well marked as "Auto-Agglutination Saline Screen".
4. Aspirate a small amount of patient sample into the pipette and release 1 drop (50 µl) into the well marked as "Auto-Agglutination Saline Screen". This well does not contain reagents. Using a stirrer, distribute and mix the materials inside the well for about 10 seconds. (See "Note" for correct use of the pipette). A small percentage of ill cats and of healthy cats auto-agglutinate. If no agglutination is observed in the "Auto-Agglutination Saline Screen well", continue the procedure. If auto-agglutination is observed, wash the cells as indicated above (See "Warning") before proceeding.
5. Add 1 drop of diluent (50 µl) from the dropping bottle into each of the remaining wells. The diluent is required for reconstitution of the lyophilized reagents.
6. Aspirate a small amount of patient sample into a pipette and release 1 drop (50 µl) into the well marked as "Patient Test Type A", and 1 drop into the well marked as "Patient Test Type B". Using a new stirrer for each well, distribute and mix the material by gentle pressure for about 10 seconds.
7. Add a second drop of diluent in the well marked as "Patient test Type A". Do not stir with a stirrer.
8. Gently turn the card to allow the reagents on the wells to mix, taking care to avoid cross contamination between the wells "Patient test Type A" and "Patient test Type B".
9. Set the card at a 20-30° angle to allow excess blood to run to the bottom of the wells and read the results. Check for agglutination in the "Patient Test" wells.

NOTE: Use of the pipette: Hold the plastic tube between your fingers with the closed and widest side and apply pressure. Hold the specimen tube vertically and place the open end of the plastic tube on the surface of the specimen. Reduce finger pressure to draw up the sample. Hold the pipette in a vertical position directly over the well to which the sample is to be delivered. Squeeze gently and allow one free drop to fall into the well (50 µl). The pipette is designed to expel slightly in excess of 50 µl to compensate for a small amount of specimen retained by the stirrer. Use each pipette only once, then discard. Under no circumstances should the pipette be used more than once as cross-contamination can occur causing inaccurate test results.

INTERPRETATION OF THE RESULTS

If the assay has been performed correctly, visible agglutination will be present in at least one of the wells marked "Patient Test".

- If the patient sample shows agglutination in the well marked as "Type A", the cat tested is blood group A.
- If the patient sample shows agglutination in the well marked as "Type B", the cat tested is blood group B.
- If the patient sample shows agglutination in both patient wells, the cat tested is blood group AB.













Any fine, granular appearance developing after 2 minutes should be disregarded in determining the results. The kind of agglutination in the Type B well is different from that in the Type A well. Agglutination in the Type B well usually includes a small number of large, amoebic globs. Agglutination in the Type A well usually is in the form of a large number of discrete, small aggregations, each like the head of a small pin.

If the patient is very anemic, and if the patient is Type A, there may be insufficient red blood cells to obtain a significant agglutination. If the patient has a low erythrocyte volume, it might be helpful to run test without adding diluent in the patient wells (Type A and Type B).

LIMITATIONS OF THE PROCEDURE

1. To obtain reliable results it is essential that correct procedure is followed.
2. Always use a new dispensing pipette for each specimen and a new stirrer for each well. Reusing any device will cause cross-contamination and unreliable results.
3. The stability of the individual components of the kit varies. Store the components as indicated on the labels. Do not use any component after the expiration date. Use of expired materials may cause unreliable results.
4. The diluent is provided in a vial with dropper to minimize any bacterial or other contamination. Diluent from other sources in the laboratory should not be used.
5. Always draw (minimum 0.4 ml blood) with a syringe or tube containing EDTA. Less blood will cause a too high concentration of EDTA in the specimen to be tested.

ESEMPIO DI RISULTATI
EXAMPLE OF RESULTS

Auto-Agglutination	Group A	Group B	Group AB
RapidVet-H (Feline A, B, AB)	RapidVet-H (Feline A, B, AB)	RapidVet-H (Feline A, B, AB)	RapidVet-H (Feline A, B, AB)
Cat _____ Date _____	Cat _____ Date _____	Cat _____ Date _____	Cat _____ Date _____
Auto-Agglutination Saline Screen	Auto-Agglutination Saline Screen	Auto-Agglutination Saline Screen	Auto-Agglutination Saline Screen
			
Type A	Type A	Type A	Type A
Patient Test	Patient Test	Patient Test	Patient Test
			
Type B	Type B	Type B	Type B
			
<small>RVA#F-001 A Product of AGROLABO SpA Via Merello, 100/110 Sesto San Giovanni (TO) Italy RapidVet-H is a trademark of dms laboratories, inc.</small>	<small>RVA#F-001 A Product of AGROLABO SpA Via Merello, 100/110 Sesto San Giovanni (TO) Italy RapidVet-H is a trademark of dms laboratories, inc.</small>	<small>RVA#F-001 A Product of AGROLABO SpA Via Merello, 100/110 Sesto San Giovanni (TO) Italy RapidVet-H is a trademark of dms laboratories, inc.</small>	<small>RVA#F-001 A Product of AGROLABO SpA Via Merello, 100/110 Sesto San Giovanni (TO) Italy RapidVet-H is a trademark of dms laboratories, inc.</small>



AGROLABO
User Manual RapidVet-H Feline

Manufactured under licence from:

Kansas State University and dmslaboratories inc.
RapidVet is a trademark of dmslaboratories inc.

Manufactured by;

Agrolabo SpA

Head Office, Laboratories
and Production Centre
Diagnostic Division
Via Masero 59
10100 Scarmagno (TO)
Italy
Tel +39 0125 731111
Fax +39 0125 731190
E-mail agrolabo@agrolabo.it
www.agrolabo.it
shop.agrolabo.it