

ARTIGO

CLÍNICA CIRÚRGICA DE PEQUENOS ANIMAIS

PLASMA RICO EM PLAQUETAS: AVALIAÇÃO DA CONTAMINAÇÃO BACTERIANA NO MOMENTO DO PREPARO DESTE SUBPRODUTO

Platelet-rich plasma: Contamination assessment to prepare bacterial moment of this by-product

L. S. SFRIZO^{1*}, J. M. PAZZINI¹, M. G. P. A. FERREIRA¹, R. A. R. USCATEGUI¹, A. B. DE NARDI¹, C. P. DE NARDI³, R. P. SCHOKEN-ITURRINO², J. C. C. CASTRO⁴, R. .R. HUPPES⁵

¹Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

² Departamento de Zootecnia, UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

³Instituto Federal de Ciências e Tecnologia de São Paulo, Campus Matão, Matão, São Paulo, Brasil.

⁴ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, PUC Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

⁵ Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Unicesumar, Maringá, Paraná, Brasil.

*Graduanda de Medicina Veterinária, bolsista PIBIC, Rua Oswaldo Luís Angarano, 40, bairro Colina Verde, CEP: 14887-384, Jaboticabal, SP, Brasil. E-mail lussfrizo@hotmail.com

RESUMO

O plasma rico em plaquetas é um produto obtido por meio da centrifugação do sangue, e devido suas propriedades de estimular a angiogênese é utilizado em cirurgias reconstrutivas a fim de evitar complicações pós-cirúrgicas. A coleta do sangue é feita de forma asséptica para obtenção do plasma rico em plaquetas, porém há possibilidade de contaminação bacteriana no momento da sua confecção podendo assim ocasionar complicações ao paciente. Objetivou-se com esta pesquisa avaliar a possibilidade de contaminação bacteriana no momento da confecção do plasma rico em plaquetas (prp), antes do seu emprego no leito de enxertos cutâneos em coelhos. No presente estudo, apenas quatro amostras das sessenta confeccionadas apresentaram colônias bacterianas, indicando que o plasma rico em plaquetas obtido de maneira asséptica é propício e seguro em cirurgias reconstrutivas. Conclui-se que realizando adequada desinfecção do centro cirúrgico e antissepsia do campo operatório, bem como o preparo asséptico do prp, seu uso é indicado e seguro, não provoca riscos de contaminação da ferida cirúrgica, bem como a ocorrência de quadros de sepse associados ao seu uso é inexistente.

Palavras – chave: Angiogênese; Bactéria; Cirurgia Reconstrutiva; Enxertos Cutâneos

ABSTRACT

Platelet-rich plasma is a product obtained by centrifugation of blood, and because of its properties of stimulating angiogenesis by being used in reconstructive surgeries in order to avoid postoperative complications. The collection of blood is done aseptically to obtain platelet-rich plasma, but there is a possibility of bacterial contamination at the time of its

preparation, thus causing complications to the patient. The objective of this research was to evaluate the possibility of bacterial contamination at the time of confection of the platelet rich plasma (PRP), before its use in the bed of cutaneous grafts in rabbits. In the present study, only four samples from the sixty confections presented bacterial colonies, indicating that platelet-rich plasma obtained aseptically is indicated and safe in reconstructive surgeries. Concluding that performing adequate disinfection of the surgical center and antisepsis of the operative field, as well as the aseptic preparation of the PRP, its use is indicated and safe, does not cause risks of contamination of the surgical wound, as well as the occurrence of sepsis associated with Its use is low.

Key-words: Angiogenesis; Bacteria; Reconstructive Surgery; Skin Grafts

INTRODUÇÃO

As plaquetas têm como funções promover a hemostasia, cicatrização de feridas e reepitelização, além de liberarem diversos fatores de crescimento, os quais estimulam a angiogênese, o crescimento vascular e a proliferação de fibroblastos, responsáveis pela síntese de colágeno. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um subproduto sanguíneo obtido a partir de centrifugações seriadas do sangue autógeno, é utilizado em procedimentos cirúrgicos de reconstrução, devido à presença de fatores de crescimento que lhe conferem uma alta capacidade de estimular a angiogênese (VENDRAMIN et al., 2010). No entanto, durante a obtenção do PRP, pode ocorrer contaminação bacteriana deste subproduto, o que pode contribuir para o desenvolvimento de quadros de infecção, comprometimento do leito cirúrgico e, em situações mais graves, quadros de sepse (RAMIREZ-ARCOS et al., 2005; VENDRAMIN et al, 2010). Em vários estudos sobre microbiota da pele e relatos de casos de

sepses associaram as bactérias presentes na cultura às da pele, em virtude de ser impossível esterilizar a pele no momento da coleta de sangue (BRECHER et al., 2005). Os grupos bacterianos mais frequentes são Gram positivos, ressaltando *Staphylococcus epidermidis* e *Bacillus cereus*. A presença destes agentes é resultado da incompleta desinfecção e/ou remoção do núcleo da pele, em que estão inclusos apêndices cutâneos, os quais os desinfetantes não conseguem penetrar (BRECHER et al. 2005; HILLYER et al., 2003; WENKE et al., 2010).

O emprego do PRP em procedimentos cirúrgicos é de grande interesse, devido a sua alta capacidade de favorecer a cicatrização de feridas. Estudos como o de Pazzini et al. (2016b), que utilizaram o PRP em retalhos de padrão axial em coelhos e encontraram resultados favoráveis à cicatrização, bem como redução da necrose na extremidade dos retalhos são relatos de sucesso do emprego desse produto. Em virtude dos estudos relacionados com a aplicabilidade do PRP em Medicina veterinária, bem como na Medicina humana, estudos como este são necessários para avaliar a ocorrência de contaminação deste produto durante sua confecção. Desta maneira, objetivou-se com esta pesquisa avaliar a possibilidade de contaminação bacteriana no momento da confecção do plasma rico em plaquetas (PRP), antes do seu emprego no leito de enxertos cutâneos em coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS

Foi realizado no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Câmpus de Jaboticabal – SP, um estudo com 60 coelhos da raça Nova Zelândia branco (*Oryctolagus cuniculus*). O presente trabalho, foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de animais (CEUA) processo número 305468/2013-8.

PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

O procedimento cirúrgico de reconstrução foi realizado de maneira asséptica, empregando enxerto cutâneo de espessura completa no membro torácico, na região do carpo a fim de corrigir lesão extensa. Para a realização da ferida dermoepidérmica e demarcação do segmento de pele retirado em região de carpo esquerdo, foi utilizada caneta cirúrgica¹ e régua estéril para criar uma lesão de quatro cm de comprimento por quatro cm de largura, no formato de quadrado. Com o auxílio de lâmina de bisturi nº15² foi excisado o fragmento cutâneo de 16 cm², na porção distal do carpo, do membro torácico esquerdo.

A ferida do leito doador no tórax foi submetida à dermorráfia em padrão de fechamento em formato de figura geométrica, com náilon 4-0³. O gel de plasma rico em plaquetas autólogo foi colocado antes da síntese da lesão do carpo, com auxílio do cabo de bisturi⁴ e distribuído de maneira homogênea entre o subcutâneo do leito doador e o subcutâneo do leito receptor, após sua aplicação procedeu-se a síntese da ferida cirúrgica.

PROTÓCOLO DE OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS

Não foi necessário submeter os animais ao jejum alimentar e hídrico. O protocolo anestésico ao qual os animais foram submetidos consistiu de midazolam⁵, na dose de 0,5 mg/kg pela via intramuscular (IM) e cloridrato de tramadol⁶, na dose de cinco mg/kg pela

¹ Skins – T Surgical Skin Marker - Batrik Medical Manufacturing Inc – Quebec – Canadá.

² Lâmina de bisturi N15 - Solidor – São Paulo - São Paulo - Brasil.

³ Nylon monofilamentar- Point Suture do Brasil IND. de fios cirúrgicos LTDA.-Fortaleza - Ceará - Brasil.

⁴ Cabo de bisturi n4 – Brasmed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA – Paulínia – São Paulo – Brasil.

⁵ Midazolam – Medley Industria Farmacêutica Ltda – Campinas – São Paulo – Brasil

⁶ Tramal – Medley Industria Farmacêutica Ltda – Campinas – São Paulo – Brasil

mesma via. Após sedação, foram coletadas amostras de sangue dos 60 coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico. Realizou-se tricotomia da região auricular para acesso das veias auriculares, e procedeu-se antissepsia com clorexidine e solução de álcool a 70%. Os animais foram posicionados em decúbito ventral, e procedeu-se venopunção das veias auriculares, e coleta de 7,2 mL de sangue, acondicionada em dois tubos estéreis, com capacidade de 3,6mL contendo citrato de sódio⁷ (anticoagulante) destinados à preparação do PRP.

O frasco com citrato de sódio foi empregado na produção do plasma rico em plaquetas (PRP) pelo protocolo de dupla centrifugação em centrífuga laboratorial comum⁸ conforme, descrito por Pazzini et al. (2016a). Os tubos foram centrifugados com tampa fechada, a 1600 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, resultando na separação de hemácias e plasma contendo leucócitos e plaquetas. Em capela de fluxo laminar, os tubos foram destampados para que o plasma fosse pipetado e transferido para outro tubo estéril sem agentes anticoagulantes, e foi centrifugado novamente a 2000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, descartou-se em torno de 80% do sobrenadante, constituído pelo PPP (plasma pobre em plaquetas), mantendo-se no frasco apenas um mL do PPP, juntamente com botão plaquetário. Esse material foi levemente agitado para promover a ressuspensão das plaquetas, e no momento de sua utilização adicionou-se 0,3mL de gluconato de cálcio, para promover ativação das plaquetas, resultando no gel de plasma rico em plaquetas (PRP).

PROTOCOLO DE INOCULAÇÃO DO PRP NAS PLACAS DE AGAR SANGUE

Uma alíquota de PRP foi utilizada para confeccionar o cultivo bacteriano (semeadura por esgotamento). A amostra foi semeada em quatro placas contendo ágar sangue e duas

⁷ Tubo BD vacutaneir® citrato de sódio – BD – São Paulo – São Paulo – Brasil.

⁸ Modelo 206 I centrifuge/Fanem® - SP.

placas foram incubadas em aerobiose e duas em anaerobiose à 37°C. Após 48 horas essas placas foram retiradas da estufa e analisadas. Para a identificação dos grupos morfológicos das colônias encontradas, foram realizadas coloração de Gram. O procedimento de coloração consiste em colocar a lâmina em um suporte e corar o esfregaço com cristal violeta e aguardar por um minuto. Posteriormente retira-se o excesso desse corante e cobre a superfície da lâmina com lugol por mais um minuto. Em seguida, lava-se a lâmina com álcool acetona, deixando-o agir por 30 segundos, e depois deve-se lavá-la em água corrente, imergindo-a em safranina ou fucsina, deixando agir por 30 segundos, para em seguida lavá-la novamente em água corrente, deixando-a secar, para depois aplicar óleo de imersão sobre a mesma para observação ao microscópio.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das amostras dos 60 coelhos, apenas quatro apresentaram colônias bacterianas nas placas incubadas em anaerobiose (Figura 1A). Nas colônias foram realizadas coloração de Gram para identificação dos grupos morfológicos. Em duas placas encontrou-se presença de cocos Gram positivos, em forma de cachos (Figura 1B), sendo esses grupos bacterianos encontrados comumente na pele e mucosas dos animais. Nas outras duas placas encontrou-se bastonetes Gram positivos (Figura 1C), provavelmente micro-organismos de origem ambiental.

Mesmo nas amostras de plasma positivas no cultivo microbiano, não foi observado qualquer tipo de infecção na ferida cirúrgica após a aplicação do PRP, visto que a cicatrização foi adequada. E os animais no pós operatório receberam como protocolo de antibioticoterapia

Pentabiótico⁹ por via subcutânea na dose de 0,06ml/Kg, com intervalo de 48h para nova dose, por cinco dias, e antiinflamatório com Meloxicam¹⁰ durante três dias, sendo por via subcutânea na dose de 0,2 mg/Kg no primeiro dia, e no segundo e terceiro dia 0,1mg/Kg, com intervalos de 24 horas.

Na Medicina Veterinária o emprego do PRP em procedimentos cirúrgicos é de grande interesse, principalmente em cirurgias reconstrutivas, visto que na Medicina humana seu emprego já tem ocorrido em situações de ressecção de neoplasias extensas, traumas e queimaduras (VENDRAMIN et al., 2010). Em virtude da capacidade de estimulação da angiogênese e favorecimento da cicatrização, este produto tem sido muito estudado (PAZZINI et al., 2016b), sendo assim, pesquisas como esta são importantes para melhorar os cuidados no momento de preparo do produto e reduzir contaminação na sua utilização.

Quanto à presença de cocos Gram positivos, em forma de cachos, nas placas analisadas, sabe-se que os mesmos não são patogênicos ao paciente, e são comumente encontrados na pele e mucosas dos animais. Porém existem neste grupo espécies como *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* que podem vir a causar piodermites e dermatites (SANTOS, 2010). A espécie *S. aureus* possui três formas de ocorrência de infecções: aguda, subaguda e crônica, em que os animais acometidos apresentam manifestações clínicas somente quando imunodeprimidos (OKERMAN et al., 1984; TRAVERSO et al., 2003). Já o *S. epidermidis*, refere-se à espécie de estafilococos coagulase negativo, a qual é reconhecida por sua crescente frequência em infecções associadas a implantes de próteses cardíacas, articulares, vasculares e de cateteres intravenosos e peritoneais, causando endocardites em

⁹ Mogipen – Jofadel Indústria Farmacêutica S/A Monte Mor – São Paulo - Brasil.

¹⁰ Maxicam - OuroFino Agronegócios - Cravinhos - São Paulo - Brasil.

humanos. Por outro lado, são raros os dados sobre a ocorrência e significado clínico dessa espécie bacteriana em hospitais veterinários (SANTOS, 2010).

Santos et al., (2007), afirmam que os hospitais veterinários por realizarem atendimentos diversificados, desde pacientes com doenças infecto-contagiosas, com alto potencial transmissor de patógenos, até pacientes que são submetidos a procedimentos eletivos ou consultas de rotina, acabam tornando-se ambientes de risco para infecções hospitalares. Uma das cepas encontradas em ambientes hospitalares é o *Staphylococcus spp* devido ao uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos, os quais propiciam o surgimento e manutenção de cepas resistentes a antimicrobianos em geral. O *S. aureus* é uma das cepas mais resistentes, as quais sobrevivem em ambientes hospitalares se difundindo entre os pacientes (SANTOS et al., 1998). Os resultados indicam que a contaminação bacteriana encontrada neste estudo nas amostras de PRP empregadas em enxertos cutâneos pode estar associada ao ambiente ou mesmo à microbiota normal da pele dos animais.

CONCLUSÃO

Conclui-se com o presente estudo que realizando adequada desinfecção do centro cirúrgico e antissepsia do campo operatório, bem como o preparo asséptico do PRP, seu uso é indicado e seguro. Este gel, quando obtido de forma adequada, não provoca riscos de contaminação da ferida cirúrgica e a ocorrência de quadros de sepse associados ao seu uso é inexistente.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP e CNPQ

REFERÊNCIAS

BARBOSA A. L. T., CARLO R. J. D., GOMES H. C., et al. 2008. Plasma rico em plaquetas para reparação de falhas ósseas em cães. **CIÊNCIA RURAL**. 38(5): 1335-1340.

BRECHER M. E., HAY S. N., ROSE A. D., et al. 2005. Evaluation of BacT/ALERT plastic culture bottles for use in testing pooled whole blood-derived leukoreduced platelet-rich plasma platelets with a single contaminated unit. **TRANSFUSION**. 45(9): 1512-1517.

OKERMAN, L., DEVRIESE, L. A., MAERTENS L., et al. 1984. Cutaneous staphylococcosis in rabbits. **VETERINARY RECORD**. 114: 313-315.

PAZZINI J. M., DE NARDI A. B., HUPPES R. R., GERING A. P., FERREIRA M. G. P. A., SILVEIRA C. B. P., LUZZI M. C., SANTOS R. 2016a. Method to obtain platelet rich plasma from rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA**. 36(1):39-44.

PAZZINI J. M., DE NARDI A. B., HUPPES R. R., GERING A. P., FERREIRA M. G. P. A., SILVEIRA C. B. P., LUZZI M. C., OLIVEIRA J. A. 2016b. Utilização de plasma rico em

plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracordosal em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **PERQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA**. 36(2):108-118.

RAMIREZ-ARCOS S., GOLDMAN M. 2005. Transfusion complications: evaluation of pooled cultures for bacterial detection in whole blood-derived platelets. **TRANSFUSION**. 45(9):1275-1279.

SANTOS L. R., NETO J. F. S., RIZZO N. N., et al. 2007. Eficácia de Desinfetantes e Anti-Sépticos Empregados no Hospital Veterinário da UPF (HV – UPF) Brasil. **REVISTA DA FZVA**. 14(2):156-164.

SANTOS L. R., NETO J. F. S., RIZZO N. N., et al. 2010. Contaminação ambiental em um hospital veterinário e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas. **CIÊNCIA ANIMAL BRASILEIRA**. 11(2):384-389.

VENDRAMIN F. S., FRANCO D., SCHAMALL R. F., et al. 2010. Utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) autólogo em enxertos cutâneos em coelhos. **REVISTA BRASILEIRA DE CIRURGIA PLÁSTICA** 25 (1) 4-10.

TRAVERSO S. D., CUNHA L., FERNANDES J. C. T., et al. 2003. Mastite com lesões sistêmicas por *Staphylococcus aureus* subesp. *aureus* em coelhos. **CIÊNCIA RURAL** 33(2): 373-376.

FIGURAS

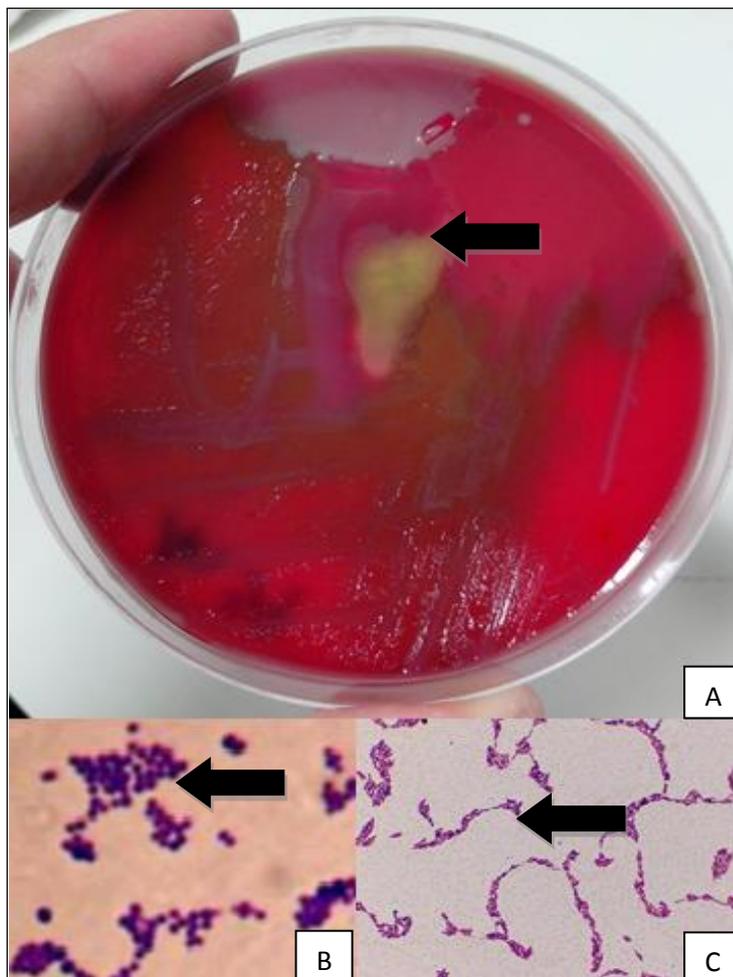


Figura 1. Imagens fotográficas de placa de Ágar sangue contendo amostra de PRP empregado em cirurgia reconstrutiva realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2015. A) Presença de colônias bacterianas em cultivo de PRP em agar sangue em condições de anaerobiose (seta). B) Presença de Cocos Gram – positivos em forma de cachos provenientes de

amostras de PRP (seta). C) Bastonetes Gram – positivos provenientes de amostra de PRP (seta).