

PLASMAFÉRESE AUTOMATIZADA EM EQUINOS: RELATO DE DOIS CASOS

AUTOMATED PLASMAPHERESIS IN HORSES: REPORT OF TWO CASES

**J. O. BERNARDO^{1*}, P. B. ESCODRO², E. G. ROVERI³, L. O. ESCODRO⁴,
C. F. OLIVEIRA⁵, L. S. FONSECA⁶**

RESUMO

A plasmaférese é um procedimento que consiste na retirada do sangue total de um doador e em seguida, separação do plasma com reinfusão dos elementos remanescentes. Este procedimento pode ser realizado de forma manual ou automatizada, com poucos relatos da técnica automatizada na espécie equina. Este artigo busca relatar a plasmaférese automatizada em dois equinos, para obtenção de plasma hiperimune, avaliando-se as complicações inerentes à técnica; e a variação e recuperação do volume globular e níveis séricos de proteínas totais nos animais doadores. Para os relatos foi utilizado o equipamento *Fresenius AS 104*, objetivando-se retirada de 20% do plasma total circulante com a proporção inicial de citrato de sódio de 1:12 no sistema extracorpóreo. Durante o procedimento observou-se obstrução por coagulação sanguínea no cateter de reinfusão e flebites jugulares nos doadores. A recuperação do volume globular e níveis séricos de proteínas totais ocorreu em 96 horas. Apesar da satisfatória recuperação hematimétrica nos dois animais, há a necessidade de novas pesquisas para a adequação da plasmaférese automatizada em equinos, na tentativa de diminuir as complicações inerentes à técnica.

PALAVRAS-CHAVE: Automação. Colheita de Plasma. Complicações. Medicina Equina. Valores hematimétricos.

SUMMARY

Plasmapheresis is a procedure that consists of removing the blood from a donor, followed by subsequent plasma separation and reinfusion of the remaining elements. This procedure can be manual or automated, with a few reports of automated plasmapheresis in the equine specie. This article reports two cases of automated plasmapheresis in horses that were conducted to obtain hyperimmune plasma, while evaluating the complications inherent to the technique; as well as variation and recuperation of hematocrit and serum total proteins in the donors. The equipment *Fresenius AS 104* was used to remove 20 % of total plasma with the initial sodium citrate ratio of 1:12 in the extracorporeal system. During the procedure, the reinfusion catheter was obstructed by blood clots and jugular vein phlebitis was observed in the donors. The recovery of hematocrit and total protein serum levels occurred in 96 hours. Despite the satisfactory recovery of hematimetric levels in the two animals, further research is needed into the suitability of automated plasmapheresis in horses, in an attempt to reduce the complications inherent to the technique.

KEY-WORDS: Automation. Complications. Equine Medicine. Hematimetrics values. Plasma collection.

¹ Médica Veterinária pesquisadora do Grupo de Pesquisa e Extensão em Equídeos - Universidade Federal de Alagoas – GRUPEQUI-UFAL – juliana_bernardo@hotmail.com

² Médico Veterinário Professor adjunto da Universidade Federal de Alagoas – GRUPEQUI-UFAL - Fazenda São Luis s/n- Zona Rural- Viçosa/AL CEP 57700-000

³ Biomédico especialista em Aferese do HEMOCENTRO – UNICAMP/SP.

⁴ Biomédica pesquisadora do GRUPEQUI-UFAL

⁵ Médico Veterinário autônomo – Curitiba-PR

⁶ Graduando do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas – bolsista PIBIC/FAPEAL - membro GRUPEQUI-UFAL

O processo de plasmaférese consiste na remoção do sangue total de um paciente em bolsa com anticoagulante (normalmente citrato de sódio 20%), seguida pela separação ou obtenção do plasma, que pode ocorrer por decantação das hemácias, centrifugação ou filtragem específica. A parte remanescente do sangue é infundida novamente no paciente, podendo o procedimento ser realizado manualmente ou de forma automatizada, sendo indicado para remover uma substância ou componente sanguíneo presente em quantidade excessiva na circulação, ou simplesmente para obtenção de plasma rico em anticorpos específicos para uma determinada enfermidade ou veneno (AABB, 2002). Segundo Marques Jr. et al. (2011), a plasmaférese pode ser terapêutica, para o tratamento de doenças auto-imunes; ou transfusional, para a coleta de plasma.

Atualmente na Medicina Veterinária, as indicações para a infusão de plasma incluem deficiências na hemostasia, transferência de imunidade passiva, imunodepressão, hipoproteinemia ou hipovolemia. Também em equinos, o plasma fresco ou fresco congelado tem seu uso indicado para o tratamento de doenças que resultam em hipoproteinemia, quando há necessidade de expansão aguda de volemia; em casos de falha na transferência de imunidade passiva; ou quando se pretende fornecer imunidade específica como *Rhodococcus equi* e *Salmonella typhimurium* (HUNT & MOORE, 1990; SMITH & SHERMAN, 1994; DURHAM, 1996; COLLATOS, 1997; STONEHAM, 1997; POST, 2000). Desta forma, a plasmaférese torna-se cada vez mais necessária na produção de plasma hiperimune para o tratamento clínico de animais imunodeprimidos.

A plasmaférese automatizada é amplamente realizada em humanos por meio de um circuito plástico descartável e estéril acoplado ao equipamento de aférese, o qual separa o plasma por centrifugação ou micro-filtragem. O sangue circula exclusivamente nesse circuito, não entrando em contato direto com o equipamento. Feige et al. (2003) comparou a plasmaférese automatizada com a técnica manual em equinos, concluindo que a primeira é bem tolerada pelos animais, além de ser mais rápida que a manual, possibilitando produção em larga escala de plasma equino de boa qualidade.

O presente artigo tem por objetivo relatar dois casos de plasmaférese transfusional automatizada na espécie eqüina, com intuito de obtenção de plasma hiperimune, observando as complicações durante a colheita, bem como analisando a recuperação dos níveis de proteínas totais plasmáticas (Pt; g/dL) e hematócrito (Ht; %) até 30 dias após o procedimento.

Foram selecionados dois equinos machos, sem raça definida, com idade de 7 (EQ1) e 12 anos (EQ2) e peso de 320 kg e 350 kg, respectivamente. Os animais foram previamente desverminado com pasta a base de Moxidectina 2% (Equest - Fort Dodge Animal Health-Iowa, EUA) e após 7 dias imunizado com vacina de Encefalomielite tipo Leste e Oeste (vírus morto) e toxóide Tetânico (Equiloid - Fort Dodge Animal Health - Iowa, EUA); Rinopneumonite e Influenza

(Fluvac Innovator EHV 4/1 - Fort Dodge Animal Health - Iowa, EUA) e Raiva (Rubivac - Pfizer Saúde Animal - Guarulhos, Brasil). Após 28 dias reforçou-se a imunização e os procedimentos realizados após 20 dias da segunda vacinação, momento em que Souza (2011) cita o pico da reação imunológica.

No momento pré-aférese (M1) foi realizada a mensuração do Ht e Pt dos EQ1 e EQ2, que foram respectivamente de: Ht - 34% e 35%; e Pt - 8,4 e 9,2 g/dL, apresentando valores normais para a espécie segundo Souza Netto (2011). Novas mensurações do Ht e Pt foram realizadas nos momentos de amostragem: 24 horas (M2), 48 horas (M3), 72 horas (M4), 96 horas (M5) e 30 dias (M6).

Para mensuração e avaliação da recuperação plasmática de Pt e Ht, utilizou-se respectivamente: *kit* Pt Labtest® (Labtest Diagnóstica S/A - Lagoa Santa, Brasil), utilizando-se de um espectrofotômetro Photonics 2000UV (Bel Equipamentos Analíticos Ltda. - Piracicaba, Brasil); e Ht obtido em tubos de micro-hematócrito centrifugados a 14.000 g, por cinco minutos em centrífuga microhematócrito (Microspin Gemmico Industrial Corp. - Taiwan, China), com posterior leitura em escala especial.

Para a realização da plasmaférese automatizada, utilizou-se um *kit* específico para o procedimento (*kit* PL1 - Fresenius HemoCare do Brasil) acoplado ao equipamento *Fresenius* modelo AS104, que separa o plasma do sangue total por centrifugação automatizada a 671 g. O *kit* PL1 é acoplado ao equipamento, juntamente com a solução fisiológica 0,9% para reposição do volume de plasma retirado; e o citrato de sódio a 20%, para evitar a coagulação sanguínea extracorpórea.

Foi puncionada a veia jugular esquerda com agulha 40X16 (Prod. Hospitalares DI - Belo Horizonte, Brasil), denominada de via de colheita; e a veia jugular direita com cateter 14G (Nipro Medical Ltda - Sorocaba, Brasil) representando a via de reinfusão. O protocolo preconizado, tomando como base os procedimentos no Hemocentro da Unicamp e os citados por Feige et al. (2003) e Feige et al. (2005), iniciou-se com proporção de 1:12 da solução anticoagulante (citrato de sódio 20%) em relação ao sangue total processado.

Ao término da plasmaférese, as bolsas de plasmas colheitados, foram encaminhadas imediatamente para a separação do plasma em bolsas estéreis individuais de 500 mL (Fresenius HemoCare do Brasil Ltda. - Itapeverica da Serra, Brasil), através de procedimento sob capela de fluxo laminar (Filtracom - Valinhos, Brasil) e encaminhado para congelamento a -18°C.

Para o cálculo do volume plasmático a ser colheitado, considerou-se 8% do peso total do doador como valor absoluto de sangue, considerando um hematócrito médio de 35% (SOUZA NETTO, 2011). Assim obtém-se valor total de plasma aproximado de 65% do volume total de sangue. A partir daí calculou-se um volume de retirada de 20% do volume total do plasma circulante, o que representou 3328 mL para o EQ1 e 3640 mL para o EQ2.

Inicialmente a distribuição das variáveis-resposta Pt e Ht foram analisadas e as estatísticas descritivas produzidas. Modelos lineares de medidas repetidas (SILVA & AZEVEDO, 2009) foram utilizados para comparar a média de Pt ou Ht entre os momentos estudados. A estrutura de covariância não estruturada foi a mais apropriada para modelar as medidas repetidas dentro do mesmo animal. O método de Tukey (KLEINBAUM et al., 2007) foi realizado para ajustar o valor-P resultante das comparações múltiplas entre momentos. A análise estatística foi realizada com o programa SAS (SAS INSTITUTE, 2009) e significância estatística foi definida como $P < 0,05$.

A técnica preconizada apresentou duas complicações na primeira repetição. A primeira delas foi a não manutenção da via de colheita com a agulha, tendo que ser manipulada por oito vezes, causando leve flebite no EQ1. A segunda foi a coagulação do sangue na via de reinfusão, impedindo a fluidez do mesmo no circuito. Na tentativa de evitar a obstrução foi utilizada solução heparinizada na diluição de 25 000 UI de heparina sódica (Hepamax-s® - Blausiegel Ind. e Com. Ltda. - Cotia, Brasil) em 500 mL de solução fisiológica 0,9 % (Fresenius Kabi Deutschland - Friedberg, Alemanha) diretamente no cateter da via de reinfusão a cada 100 mL colheitado. Mesmo assim ocorreu flebite na veia jugular direita, inviabilizando-a para uso. Nesse momento foi necessária a punção da veia cefálica direita com cateter 18G para o retorno do sangue. O volume de sangue processado no EQ1 foi de 4313 mL com obtenção de 2580 mL de plasma colheitado, repondo-se 1500 mL de solução fisiológica 0,9%.

No EQ2 aumentou-se a proporção de solução anticoagulante (citrato de sódio 20%) para 1:10 e substituiu-se a agulha pelo cateter 14G na via de colheita, porém ainda tornou-se necessária a utilização de solução heparinizada diretamente no cateter da via de reinfusão a cada 300 mL de plasma colheitado, sendo que por três vezes o mesmo obstruiu-se. O

volume de sangue processado foi de 6350 mL, com obtenção de 2578 mL, repondo-se 1600 mL de solução fisiológica 0,9%. No EQ2, o sangue com maior fluidez permitiu o processamento de volume superior em 47,23% em relação ao EQ1, diminuindo o tempo de colheita em 50 minutos conforme citado a seguir.

O tempo de colheita foi de 150 minutos no EQ1 e 100 minutos no EQ2, com o processamento médio de $5331,50 \pm 1440,38$ mL de sangue e colheita de $2579 \pm 1,41$ mL de plasma.

As médias dos valores de Ht nos momentos de colheita durante o procedimento apresentaram diferenças, porém sem variações significativas ($P < 0,005$) (Figura 1).

Mesmo sem alterações estatísticas significativas, constatou-se a diminuição máxima do Ht de 14,28% no EQ1 após 24 horas do procedimento, porém em M3 já apresentava valores próximos aos iniciais, diferente da hemoconcentração relatada por Ângulo et al. (1997) equilibrada através de hidratação. Provavelmente esta hemodiluição relativa esteja relacionada à hemólise causada pelo citrato de sódio que retorna ao animal com os hemocomponentes separados do plasma.

Na Medicina, relata-se algumas manifestações anafiláticas leves ou severas durante a plasmáfereze automatizada, principalmente relacionadas ao citrato de sódio, tais como prurido, pápulas, blefaroespasma, lacrimejamento, tosse seca, falta de ar e estertores nas vias aéreas (MARQUES JR. et al., 2011), porém não foram observadas nenhuma das reações nos dois animais.

As médias de Pt, representadas no Figura 2, apresentaram variações significativas nos momentos M2, M3 e M4; apresentando valores não significativos em M5 e M6 ($P < 0,001$), mostrando tempo médio de recuperação plasmática das Pt em 96 horas .

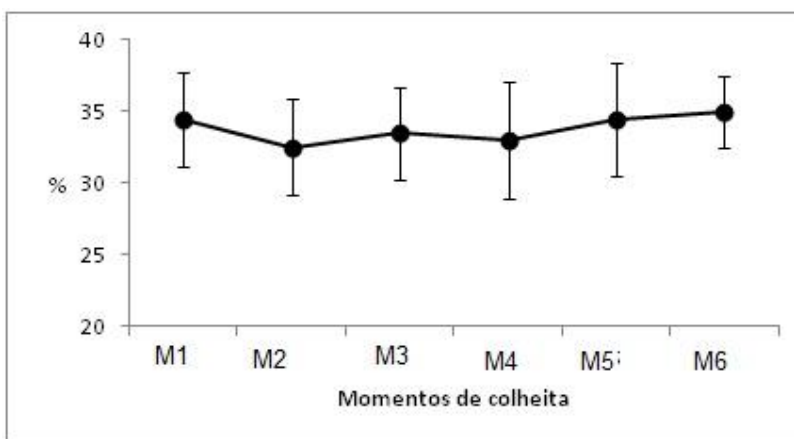


Figura 1 - Média dos valores de Hematócrito-Ht (%) dos animais durante os momentos de colheita. M1 = Pré-aférese, M2 = 24 horas após, M3 = 48 horas após, M4 = 72 horas após, M5 = 96 horas após, M6 = 30 dias após.

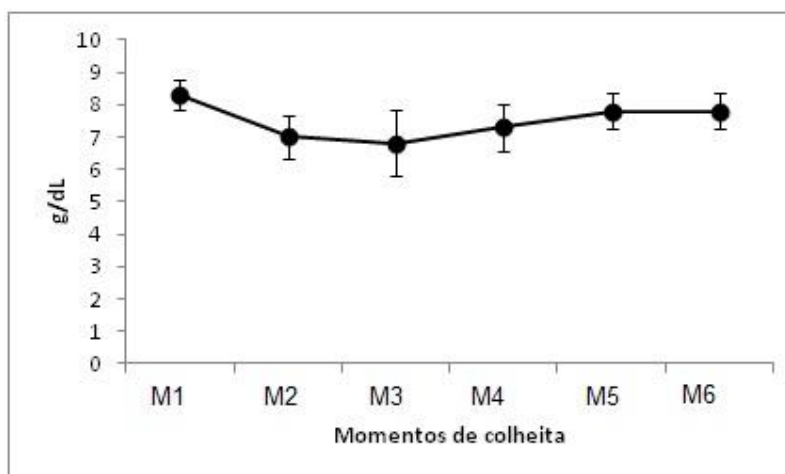


Figura 2 - Média dos valores de Proteína Total-PT (g/dL) dos animais durante os momentos de colheita. M1 = Pré-aférese, M2 = 24 horas após, M3 = 48 horas após, M4 = 72 horas após, M5 = 96 horas após, M6 = 30 dias após.

Segundo Parra (2005), o procedimento de plasmaférese manual em equinos tem duração de 4 dias, dividido em 3 etapas, e a recuperação do equino doador dá-se com 45 a 60 dias após o procedimento. Nesse relato, com a plasmaférese automatizada, nota-se recuperação dos níveis de Pt em 78,25% no EQ 1 e 100% no EQ2 já com 96 horas após os procedimentos.

Apesar da rápida recuperação do volume globular e da Pt nos animais doadores, as complicações operacionais de flebite e diminuição de fluidez com obstrução na via de reinfusão explicitaram a não reprodutibilidade da técnica de plasmaférese automatizada citada por Feige et al. (2003) em cavalos Freiburger e por Feige et al. (2005) em cavalos doadores de sangue na Suíça, podendo haver diferenças na concentração de citrato de sódio e particularidades de processamento nas diferentes raças equinas.

Desta forma os relatos exteriorizam a necessidade de mais pesquisas acerca da plasmaférese automatizada em equinos, buscando a adequação e padronização da técnica para produção comercial de plasma hiperimune ou inovação do procedimento terapêutico na espécie equina.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS (AABB). **Technical manual**. 14th ed. Maryland, Bethesda, 2002, p.127-247.

ANGULO, Y.; ESTRADA, R.; GUTIÉRREZ, J. M. Effects of bleeding in horses immunized with snake venoms for antivenom production. **Revista de Biología Tropical**, v.45, n.3, p.1215-1221, 1997.

COLLATOS, C. Blood and blood component therapy. In: ROBINSON, N. E. **Current therapy in equine medicine**. 4.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997. p.290-292.

DURHAM, A. E. Blood and plasma transfusion in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.8, n.1, p.8-12, 1996.

FEIGE, K.; EHRAT, F. B.; KASTNER, S. B. R.; SCHWARZWALD, C. C. Automated plasmapheresis compared with other plasma collection methods in the horse. **Journal of Veterinary Medicine**, v.50, p.185-189, 2003.

FEIGE, K.; EHRAT, F. B.; KASTNER, S. B. R.; WAMPLE, R. The effects of automated plasmapheresis on clinical haematological, biochemical and coagulation variables in horses. **The Veterinary Journal**, v.168, p.102-107, 2005.

HUNT, E.; MOORE, J. S. Use of blood and blood products. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.6, n.1, p.133-147, 1990.

KLEINBAUM, D. G.; KUPPER, L. L.; NIZAM, A.; MULLER, K.E. **Applied Regression Analysis and Multivariable Methods**. Duxbury Press: Belmont, California, 2007.

MARQUES Jr., J. F. C.; ROVERI, E. G.; ANDRADE, M. C.; TORRES, I. M. C.; PINTO, M. Hemaféreses terapêuticas. **Hemocentro UNICAMP – Divisão de Hemoterapia – Seção de procedimentos especializados**. Disponível em: <http://www.google.com.br/url?sa=t&source=web&cd=21&ved=0CBkQFjAAOBQ&url=http%3A%2F%2Ffor>

[uns.bc.unicamp.br%2Fsau...
s.ppt&rct=j&q=af%C3%A9rese%20terap%C3%AAuti
ca&ei=W6kxTYCZPIbMgQfTr TECw&usg=AFQjCN
FAUog5k0901GGUNcBPSzYH07bUIA&cad=rja](http://www.fsaude.unicamp.br/2Fsau...)
Acesso em: 15 Jan 2011.

PARRA, A. C. **Variações da crasesanguínea durante a hiperimunização e após sangria e plasmaférese em eqüinos de produção de soro hiperimune anti-crotálico.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2005. 135p. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Clínica Médica, 2005.

POST, G. S. Hemapheresis. In: FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. (Ed.). **Schalm's veterinary hematology**. 5. ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 2000. p.869-873.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's Guide**. Version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, 2009.

SMITH, M. C.; SHERMAN, D. M. Blood, lymph and immune systems. *In: Goat medicine*. Philadelphia, Lea & Febiger, 1994. p.193-230.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. *In: World Congress on Computers in Agriculture*, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SOUZA, G.; Imunizações. Disponível em: [HTTP://www.ebah.com.br/content/ABAAAkfgAK/imunizações](http://www.ebah.com.br/content/ABAAAkfgAK/imunizações) Acesso em: 13 Ago 2011.

SOUZA NETTO, B. A. **Valores de referência – hemograma eqüino.** *In: Laborfife veterinária*. Disponível em: <http://www.laborlife.com.br/exames/hematoref.html> Acesso em: 12 Ago 2011.

STONEHAM, S. Collection and administration of plasma to a newborn foal. **In Practice**, v.19, n.7, p.384-385, 1997.