

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

WALDELUCY KARINA BOMFIM FELIX DA SILVA

**Avaliação imunomicrobiológica de plasma equino coletado por aféreses manual e automatizada**

---

Pirassununga

2022

WALDELUCY KARINA BOMFIM FELIX DA SILVA

**Avaliação imunomicrobiológica de plasma equino coletado por aféreses manual e automatizada**

Versão corrigida

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa

---

Pirassununga

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo  
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a Silva, Waldelucy Karina Bomfim Felix  
Avaliação imunomicrobiológica de plasma equino  
coletado por aféreses manual e automatizada /  
Waldelucy Karina Bomfim Felix Silva ; orientador  
Ricardo Luiz Moro Sousa. -- Pirassununga, 2022.  
57 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação  
em Biociência Animal) -- Faculdade de Zootecnia e  
Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Plasmaferese. 2. Medicina Veterinária. 3.  
Equinos. 4. PCR. 5. Microbiologia. I. Sousa,  
Ricardo Luiz Moro , orient. II. Título.



## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO IMUNO-MICROBIOLOGICA DE PLASMA EQUINO COLETADO POR AFÉRESES MANUAL E AUTOMATIZADA", protocolada sob o CEUA nº 9210041218 (00 001131), sob a responsabilidade de **Ricardo Luiz Moro de Sousa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo - FZEA/USP (CEUA/FZEA) na reunião de 23/01/2019.

We certify that the proposal "IMMUNO-MICROBIOLOGICAL EVALUATION OF EQUINE PLASMA COLLECTED BY MANUAL AND AUTOMATED AFÉRESES", utilizing 50 Equines (males and females), protocol number CEUA 9210041218 (00 001131), under the responsibility of **Ricardo Luiz Moro de Sousa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Animal Science and Food Engineering - (São Paulo University) (CEUA/FZEA) in the meeting of 01/23/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [02/2019](#) a [06/2020](#)

Área: [Medicina Veterinária](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Equídeos](#)

sexo: [Machos e Fêmeas](#)

idade: [4 a 20 anos](#)

N: [50](#)

Linhagem: [Mestiços](#)

Peso: [400 a 600 kg](#)

Local do experimento: As colheitas serão realizadas nas propriedades nas cidades de Porto Ferreira, Pirassununga, Leme e Jaguariúna e as análises no Laboratório de Higiene Zootécnica da Universidade Estadual de São Paulo - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos.

Pirassununga, 25 de maio de 2022

Prof. Dra. Luciane Silva Martello  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

Prof. Dra. Fabiana Fernandes Bressan  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da  
Universidade de São Paulo - FZEA/USP

WALDELUCY KARINA BOMFIM FELIX DA SILVA

**Avaliação imunomicrobiológica de plasma equino coletado por aféreses manual e automatizada**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociência Animal

**Data de aprovação: 25/03/2022**

Banca Examinadora:

---

**Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa**  
**Presidente da Banca Examinadora**

---

**Prof. Dr. Hélio José Montassier**

---

**Prof. Dr. Renan Grigoletto**

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a Deus e aos meus pais, por tornarem este sonho possível.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e a espiritualidade amiga, por iluminar e guiar meus caminhos, mantendo-me os ombros fortes e com confiança de que o melhor sempre acontece.

Ao meu adorável pai Valdinez Felix da Silva (*in memorian*), por todos os ensinamentos, incentivo, apoio e todo amor incondicional, sem ele nada disso seria possível.

À minha mãe, Maria Lúcia do Bonfim, minha irmã, Waldilene Kelly Bomfim Felix da Silva, minha sobrinha, Marcela Bomfim Moraes e ao meu marido, Thiago Jhonatha Fernandes Silva, por todo apoio, paciência e amor. Sem vocês eu não suportaria.

Ao meu Orientador e mestre, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Ricardo Luiz Moro de Sousa, que acreditou na minha ideia e auxiliou no desenvolvimento, grata pelos conselhos, paciência e apoio.

Aos meus amigos de vida, família que escolhi. Estes que precisei abrir mão do convívio em busca de sonhos: Janyele Leite Silva, Julie Leite Ramalho, Maria Luiza Rocha Castro, João Silva Leite, Aldilene Silva da Paz, José Valmir e Lucas Fonseca.

As minhas grandes amigas que ganhei na pós-graduação, Marisa Matias França, Silvia Seraphin Godoy e Thais Correa Camilo. Obrigada por cada momento.

Aos amigos de laboratório, conversas científicas e cafés, Talita Maria Lázaro, Nathalia Raissa Alcântara Rocha, Nycolas Levy Pereira, Carla Afonso, Natália Maria Barbosa. Obrigada por tudo.

Aos parceiros e amigos que ajudaram na elaboração, prática e discussão desta pesquisa, Dr<sup>a</sup>. Daniele Passarelli, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Rodrigo Romero Correia, Msc. Samara Rita Maganha e a Raquel Rodrigues. Obrigada.

À banca avaliadora, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Hélio José e o Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup> Renan Grigoletto, obrigada por toda contribuição.

Aos parceiros que me ajudaram a tornar essa pesquisa uma realidade, Fresenius Kabi<sup>®</sup>, em especial a Cristiane Dejean, e a JP Farma, em especial ao Dr. Everton José Buzzo. Muito obrigada pelo apoio.

À Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pelo oferecimento do curso de Pós-graduação em Biociência Animal e demais oportunidades. A todos os funcionários desta Universidade.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pela concessão de bolsa de estudos que ajudou parte do projeto que deu origem a esta dissertação.

## EPÍGRAFE

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.” (Simone Beauvoir)



## RESUMO

SILVA, W.K.B.F. **Avaliação imunomicrobiológica de plasma equino coletado por aférese manual e automatizada.** 2022. 57 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2022.

Com o aumento da utilização de hemocomponentes e hemoderivados em animais, a exemplo do plasma hiperimmune em equinos, demandas para obtenção de produtos de alto valor clínico, seguros e com concentrações de anticorpos adequadas e/ou testadas também se intensificaram. Neste contexto, pressupõe-se que o uso de tecnologias mais avançadas pode ser capaz de produzir produtos que assegurem um tratamento mais eficaz e um total reestabelecimento da saúde do animal. A aférese automatizada é uma técnica que utiliza equipamentos que centrifugam e separam os componentes por camadas em um sistema fechado. O objetivo da presente investigação foi realizar a avaliação de amostras de plasma equino, coletados de forma manual e automatizada, quanto à quantidade de proteínas totais, imunoglobulina G e qualidade microbiológica. Para tanto, 24 equinos hígidos, com base em parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos, separados em 2 grupos, foram submetidos à aférese manual ou automatizada. Alíquotas das amostras de plasma dos 2 grupos de animais, conservadas sob refrigeração (8°C) ou congeladas (-20°C e -80°C), foram submetidas à avaliação microbiológica, com identificação por testes bioquímicos, MALDI-TOF, que analisa a estrutura e composição molecular de uma amostra desconhecida e técnicas moleculares (PCR e sequenciamento do gene rDNA 16S), além da quantificação das proteínas totais e de imunoglobulinas G (IgG), através de métodos bioquímicos e eletroforéticos. Nas análises microbiológicas, apenas no método de aférese manual, foi observado crescimento microbiano para 1 amostra de plasma mantida sob refrigeração, sendo identificada como *Enterobacter* spp.; adicionalmente, 2 outras amostras de plasma, também obtidas pelo método manual, foram positivas ao PCR para rDNA 16S, sendo 1 mantida sob refrigeração e outra com positividade para as alíquotas conservadas nas três temperaturas testadas. Em relação à mensuração proteica, o total de proteínas plasmáticas foi 23% maior pela aférese manual quando comparada à coleta automatizada, considerando amostras de plasma mantidas sob refrigeração; no entanto, não houve diferença entre as técnicas de aférese quando comparados os valores de proteína total para amostras conservadas a -20°C. Para os níveis de IgG, a coleta automatizada foi superior à aférese manual, considerando as amostras mantidas congeladas (-20°C e -80°C). Associando os resultados das análises microbiológicas com a mensuração proteica das amostras plasmáticas testadas, a aférese automatizada mostrou-se mais eficiente e com maior grau de biossegurança quando comparada ao método manual de coleta, principalmente para amostras de plasma conservadas congeladas, visando condições de preservação da qualidade do produto por mais tempo, aumentando sua disponibilidade quando considerados bancos de plasma equino.

**Palavras-chave:** plasmaférese, imunoglobulinas, plasma, equino.

## ABSTRACT

SILVA, W.K.B.F. **Immunomicrobiological evaluation of equine plasma collected by manual and automated apheresis.** 2022. 57 p. Dissertation (Master's Degree) – Faculty of Animal Science and Food Engineering, University of São Paulo, Pirassununga, 2022.

With the increased use of blood components and blood products in animals, such as hyperimmune plasma in horses, demands to obtain products of high clinical value, safe and with adequate and/or tested antibody concentrations have also intensified. In this context, it is assumed that the use of more advanced technologies may be able to produce products that ensure a more effective treatment and a total restoration of the animal's health. Automated apheresis is a technique that uses equipment that centrifuges and separates the components by layers in a closed system. The objective of the present investigation was to evaluate equine plasma samples, collected manually and automatically, regarding the amount of total proteins, immunoglobulin G and microbiological quality. Therefore, 24 healthy horses, based on clinical, hematological and biochemical parameters, divided into 2 groups, were submitted to manual or automated apheresis. Aliquots of plasma samples from the 2 groups of animals, stored under refrigeration (8°C) or frozen (-20°C and -80°C), were submitted to microbiological evaluation, with identification by biochemical tests, MALDI-TOF, which analyzes the structure and molecular composition of an unknown sample and molecular techniques (PCR and 16S rDNA gene sequencing), in addition to the quantification of total proteins and immunoglobulins G (IgG), through biochemical and electrophoretic methods. In the microbiological analyses, only in the manual apheresis method, microbial growth was observed for 1 plasma sample kept under refrigeration, being identified as *Enterobacter* spp.; additionally, 2 other plasma samples, also obtained by the manual method, were positive for PCR for 16S rDNA, being 1 kept under refrigeration and the other with positivity for the aliquots conserved at the three temperatures tested. Regarding protein measurement, total plasma proteins were 23% higher by manual apheresis when compared to automated collection, considering plasma samples kept under refrigeration; however, there was no difference between the apheresis techniques when comparing the total protein values for samples stored at -20°C. For IgG levels, automated collection was superior to manual apheresis, considering samples kept frozen (-20°C and -80°C). By associating the results of microbiological analyzes with the protein measurement of the plasma samples tested, automated apheresis proved to be more efficient and with a higher degree of biosafety when compared to the manual method of collection, especially for frozen preserved plasma samples, aiming at preservation conditions. product quality for longer, increasing its availability when considering equine plasma banks.

**Keywords:** plasmapheresis, immunoglobulins, plasma, equine.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APS	Persulfato de Amônio
AST	Aspartato aminotransferase
BHI	Brain Heart Infusion
BSA	Bovine Serum Albumin
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CID	Coagulação Intravascular Disseminada
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
FA	Fosfatase Alcalina
GGT	Gamaglutamiltransferase
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
IgA	Imunoglobulina A
IgD	Imunoglobulina D
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
kDa	Quilodaltons
µL	Microlitro
nm	Nanômetro
OPD	O-Phenylenediamine Dihydrochloride
pb	Pares de Bases
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Reação de Cadeia Polimerase
PFC	Plasma Fresco Congelado
PRP	Plasma Rico em Plaquetas
SDS	Sodium Lauryl Sulfate
V	Volts
VCM	Volume Corpuscular Médio

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Pirâmide de qualidade de Juran.....	25
Figura 2 – Procedimento de antissepsia pós tricotomia ampla.....	31
Figura 3 – Fixação de cateter venoso central.....	32
Figura 4 – Equipamento para aférese da empresa Fresenius Kabi® .....	33
Figura 5 – Curva padrão para determinação de proteína.....	36
Figura 6 – Exemplos dos géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizados para quantificação de albumina e IgG através da leitura de bandas pelo programa ImageJ® .....	37
Figura 7 – Amostra em caldo BHI com crescimento bacteriano de amostra de plasma coletada manualmente.....	42
Figura 8 – Placa de ágar sangue com presença de crescimento bacteriano, a partir de amostra de plasma coletada manualmente.....	43
Figura 9 – Coloração de Gram (Bactéria Gram negativa em formato bacilar) com leitura em objetiva de imersão 100X, a partir de amostra de plasma coletada manualmente.....	44
Figura 10 - Fragmentos de 1000pb obtidos das amostras de plasma, a partir da reação de PCR para rDNA 16S, após eletroforese em gel de agarose 1,5%.....	44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de BSA utilizadas para a construção de curva padrão.....	35
Tabela 2 - Média dos resultados das avaliações clínicas dos animais doadores.....	40
Tabela 3 - Média dos resultados hematológicos dos animais doadores.....	40
Tabela 4 - Média dos resultados das análises bioquímicas dos animais doadores .....	41
Tabela 5 – Detecção de microrganismo por PCR.....	45
Tabela 6 – Resultado da análise de proteína (mg/mL).....	49
Tabela 7 – Resultado da análise das concentrações de albumina (mg/mL).....	50
Tabela 8 – Resultado da análise das concentrações de IgG (mg/mL).....	51

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Variação das concentrações de proteínas de acordo com tipo de coleta e armazenamento.....	46
Gráfico 2 – Variação das concentrações de albumina de acordo com tipo de coleta e armazenamento.....	48
Gráfico 3 – Variação das concentrações de IgG de acordo com tipo de coleta e armazenamento.....	48

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Histórico da hemoterapia humana e veterinária	17
2.2 Hemocomponentes e Hemoderivados	18
2.2.1 Concentrado de hemácias e plaquetas	19
2.2.2 Plasma rico em plaquetas	19
2.2.3 Plasma	20
2.2.3.1 Plasma fresco congelado e plasma comum	20
2.2.4 Albumina	20
2.2.5 Imunoglobulinas	21
2.2.5.1 IgG	22
2.2.5.2 IgA	23
2.2.5.3 IgM	23
2.2.5.4 IgD e IgE	23
2.3 Obtenção do plasma	23
2.4 Controle e qualidade do plasma	24
2.4.1 Avaliação microbiológica	25
2.4.1.1 Cultura bacteriana	26
2.4.1.2 Avaliação de parâmetros metabólicos	27
2.4.1.3 Detecção por material genético	27
2.5 Avaliação de proteínas	27
2.5.1 Ensaio de Bradford	27
2.5.2 Técnicas de eletroforese de proteínas	28
3. OBJETIVO GERAL	29
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5. HIPÓTESE	30
6. MATERIAL E MÉTODOS	31
6.1 Animais Experimentais	31
6.1.1 Análises hematológica e bioquímica dos animais doadores	33
6.2 Análise microbiológica do plasma	34
6.3 Análises das proteínas totais e imunoglobulinas do plasma	35
6.4 Análises estatísticas	38

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
7.1 Resultados das avaliações clínica, hematológica e bioquímica dos animais doadores	39
7.2 Análises microbiológicas do plasma	42
7.3 Resultados da concentração de proteínas totais e concentrações de albumina e imunoglobulinas	46
8. CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53



## 1. INTRODUÇÃO

O uso de sangue, destacando hemocomponentes e hemoderivados, na medicina humana teve início no final do século passado. Com as pesquisas nessa área, surgiram valiosos avanços e um deles foi a descoberta do sistema ABO. Contemporaneamente, os diversos métodos de fracionamento plasmático possibilitam a obtenção de vários hemoderivados como albumina, imunoglobulinas e fatores de coagulação com nível de pureza elevado e hemocomponentes como hemácias fenotipadas, concentrado de plaquetas e plasma.

Na medicina veterinária, os primeiros estudos sobre o uso terapêutico do sangue e seus derivados datam da década de 80. A recomendação primordial para a prática da transfusão sanguínea nos animais é a correção de anemias graves, hemorragias, hemólise, eritropoiese ineficaz, doenças autoimunes e algumas neoplasias.

Além do sangue total, outros hemocomponentes como, plasma rico em plaquetas, plasma fresco congelado e plasma hiperimune, coletados por aférese manual ou automatizada (plasmaférese), podem ser coletados e utilizados para tratamento de enfermidades sendo estudados desde a década de 90.

A falha da transferência de imunidade passiva é uma das principais causas de mortalidade em potros neonatos, pois a maioria desses animais encontra-se na condição de agamaglobulinêmicos. Para isso, um dos tratamentos de eleição é a utilização do plasma fresco congelado, que é rico em imunoglobulinas, anticorpos mediadores da imunidade humoral com função protetora.

Dessa forma, torna-se relevante e premente o desenvolvimento de técnicas e parâmetros de avaliação da qualidade de hemocomponentes também na medicina veterinária, visto que, com a maior demanda para o uso de plasma é necessária a produção de um produto seguro e de alto valor clínico.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Histórico da hemoterapia humana e veterinária**

O uso do sangue sempre teve importância na história da medicina, principalmente com finalidade terapêutica (SAMPAIO, 2013). No início do século XX, o pesquisador austríaco Karl Landsteiner descreveu os grupos sanguíneos do sistema ABO (SAMPAIO, 2013; BARNA, 2001). Lacerda (2008) destaca que no início do mesmo século, com as conquistas tecnológicas, houve uma expansão no uso da hemoterapia. Já na década de 40, a hemoterapia brasileira começou a ser considerada como uma especialidade médica com a inauguração do primeiro banco de sangue do país, no município do Rio de Janeiro, que tinha como objetivo obter sangue para vítimas da 2ª Guerra Mundial, enviando-se plasma humano para os hospitais das frentes de batalha (JUNQUEIRA et. al, 2005). Botteon (2012) enfatiza que o surgimento dos bancos de sangue humano ocorreu durante a 2ª Guerra Mundial junto a Cruz Vermelha, ressaltando a grande necessidade de transfusões sanguíneas nas áreas de conflito.

Segundo o Manual de Orientações em Hemoterapia da Unicamp (2008), a hemoterapia em humanos se desenvolveu fundamentada no preceito de apenas fazer a transfusão do componente que o paciente necessitava, utilizando avaliações clínicas e laboratoriais como base. Desta forma, a decisão para indicação de determinado tratamento nunca poderá ser de forma empírica ou fundamentada apenas na experiência profissional.

A prática de transfusão no Brasil continua evoluindo. Com o passar do tempo novas terapias foram surgindo, como as técnicas de fracionamento plasmático, o surgimento das bolsas plásticas específicas, processadores celulares para aférese, novas técnicas de compatibilidade, máquinas fracionadoras de sangue e o surgimento da hemoterapia seletiva (JUNQUEIRA et. al, 2005; SAMPAIO, 2013).

Ao tratar do assunto na medicina veterinária, as transfusões sanguíneas em animais vêm despertando interesse desde década de 50 (LANEVSKI; WARDROP, 2001; BOTTEON, 2012). Contudo, existem poucos relatos sobre a prática naquela época. Na década de 80, foi descrito o primeiro banco de sangue para cães e gatos (BOTTEON, 2012) e, na década de 90, a Food and Drug Administration dos Estados

Unidos aprovou a pesquisa de uma solução de transporte de oxigênio à base de hemoglobina para uso em cães (LANEVSKI; WARDROP, 2001).

O uso de sangue e seus componentes têm crescido em grande escala na medicina veterinária, seguindo a crescente e exigente demanda na melhoria de atendimentos e tratamentos aos animais e como consequência exigência de um alto padrão nas transfusões de sangue (BOTTEON, 2012). Corroborando, Tocci (2010) afirma que as transfusões sanguíneas na medicina veterinária estão se tornando cada vez mais comuns nos tratamentos de pacientes que inspiram cuidados especiais e/ou intensivos, acarretando com isso a criação de vários bancos de sangue veterinários.

Para Abrams-Ogg (2000), a transfusão de sangue e o uso dos hemocomponentes e hemoderivados quando adequadamente utilizados, são procedimentos de suma importância na medicina veterinária para melhorar e mesmo salvar a vida do paciente. Porém, Lanevski & Wardrop (2001) ressaltam que a opção do uso dos componentes sanguíneos não pode ser fundamentada excepcionalmente no volume de células compactadas; deve-se considerar a quantidade e o tipo de componente perdido.

Geralmente, as transfusões são indicadas para animais que perderam mais de 50% do volume total de sangue, em trombocitopenias severas, insuficiência hepática e coagulação intravascular disseminada (LANEVSKI; WARDROP, 2001), hemólises e anemias não regenerativas (TERRA, 2010; MARTINS, 2011), eritropoiese ineficaz, doença autoimune e neoplasias (GOMES, 2008).

## **2.2 Hemocomponentes e Hemoderivados**

Para dar seguimento à presente revisão, tornam-se relevantes as definições corretas para os termos hemoderivados e hemocomponentes.

Hemoderivados são aqueles obtidos em escala industrial através do fracionamento do plasma por processos físico-químicos e que não são utilizados nas transfusões; em síntese, o plasma excedente. Os produtos envolvidos são a albumina, imunoglobulinas e fatores de coagulação (fator VII, fator VIII e fator IX). Os produtos originados individualmente nos serviços de hemoterapia, a partir da coleta de sangue total seguida de centrifugação e/ou congelamento, são denominados hemocomponentes, envolvendo: hemácias, plaquetas e plasma (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Todos os hemocomponentes utilizados são obtidos através de uma técnica clássica denominada aférese, que é a separação e retenção de componentes sanguíneos; para isso, o sangue coletado é submetido à centrifugação, obtendo-se assim hemácias, plaquetas e leucócitos (VERINAUD, 2016), sendo que na medicina veterinária de grandes animais, houve necessidade de adaptação do processo, substituindo-se a centrifugação pela decantação, devido à limitação de não haver centrífuga adequada capaz de processar bolsas de seis litros. Uma técnica refinada para obtenção de hemocomponentes é a automatizada, tratando-se de um circuito fechado onde o sangue total é retirado de forma contínua e, por centrifugação e kit específicos, são separados os componentes do sangue, com posterior retorno dos remanescentes. O procedimento ainda é classificado nas modalidades transfusional, terapêutica e progenitora hemopoiética periférica (CPP) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; WILLIAM et al., 2010; MARQUES JR. et al. 2018; MORRIS, 1998). No Manual de Orientações em Hemoterapia da Unicamp (2018) é possível encontrar as definições e indicações para o uso de hemocomponentes em humanos.

### **2.2.1 Concentrado de hemácias e plaquetas**

Concentrados de hemácias têm como objetivo restabelecer a capacidade de transporte de oxigênio diante de quadros hematológicos envolvendo baixos níveis de hemoglobina, utilizados em casos de anemias e hemorragias agudas. Já os concentrados de plaquetas são empregados em casos de trombocitopenias imunes, coagulação intravascular disseminada (CID), trombocitopenias de origem medular, pré-operatórias e quando do uso de agentes antifibrinolíticos sem sucesso terapêutico.

### **2.2.2 Plasma rico em plaquetas**

O plasma rico em plaquetas (PRP) é obtido depois de uma centrifugação leve de uma unidade de sangue total. É muito diluído em meio ao plasma (FELDMAN; SINK, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015), porém é bastante utilizado na rotina veterinária em tratamentos de tendinites e, em menor intensidade, no tratamento de desmites e lesões musculares.

### **2.2.3 Plasma**

O plasma é classificado como constituinte da porção líquida do sangue associado a algumas funções básicas, como a manutenção do efeito osmótico do sangue, mediação da coagulação e a fibrinólise, além de apresentar propriedades antimicrobianas. Pode ser obtido na doação de sangue total ou por aférese, sendo que a utilização de plasma na medicina humana não é um procedimento autorizado (MANUAL DE ORIENTAÇÕES HEMOTERÁPICAS DA UNICAMP, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; WILLIAM et. al., 2010). Na Medicina Veterinária, é indicado o uso de plasma em casos de deficiências na hemostasia, transferência de imunidade passiva, hipoproteinemia ou hipovolemia (GUIDELINES - CORNELL UNIVERSITY, 2022; ARROYO, 2019). Adicionalmente, o plasma pode ser utilizado em conjunto com sangue total e concentrado de plaquetas no tratamento de hemorragias agudas (MUDGE, 2014).

#### **2.2.3.1 Plasma fresco congelado e plasma comum**

A utilização do plasma comum ou fresco congelado em equinos se dá pela necessidade de tratamento em casos de perda acentuada de proteínas, para casos em que se necessita repor a volemia, para falhas na transferência de imunidade passiva ou ainda em situações nas quais há a necessidade de se prover imunidade específica contra alguns agentes (ARROYO, 2019; MUDGE, 2014; DURHAM, 1996; STONEHAM, 1997). Verinaud (2016) acrescenta ainda que o plasma fresco congelado pode ser armazenado sob baixa temperatura por um ano e utilizado na indústria para produção de fatores de coagulação. Já o plasma comum, é o plasma armazenado por um período maior de tempo, na indústria passa ser utilizado para produção de albumina e imunoglobulinas.

### **2.2.4 Albumina**

Alguns derivados sanguíneos como a albumina, imunoglobulinas e fatores de coagulação sanguínea fazem parte da composição do plasma (BARNA, 2001, ESCODRO et al., 2012).

Em tempo, especificamente para o plasma equino, Ziska et al. (2012) afirmam que podem ser isolados anticorpos específicos. No entanto, a proteína que se encontra em maior quantidade no plasma é a albumina, cerca de 60% das proteínas totais

presentes no soro; é uma glicoproteína sintetizada pelos hepatócitos e com funções importantes: manutenção da pressão osmótica, além da fixação e transporte de abundante quantidade de ligantes, colaborando para a eliminação de produtos tóxicos do organismo (BARNA, 2001; TANAKA et al., 2004; STOCKHAM & SCOTT, 2016). Realiza também função nutricional, na anticoagulação, transporte de íons, bilirrubina, colesterol e outros, ação antioxidante e regulação do pH sanguíneo (TRALL, 2007; CONNER, 2017).

É considerada uma proteína de fase aguda negativa, porque diante de processos inflamatórios, a tendência é a diminuição de seus níveis, uma vez que acontece o impedimento da sua produção por citocinas pró-inflamatórias. A hipoalbuminemia pode ocorrer também por deficiência nutricional e de proteínas (CARNEIRO, 2013; STOCKHAM & SCOTT, 2016).

Em animais, o uso da albumina ainda não é bastante difundido, visto que sua obtenção não é realizada na medicina veterinária. Já em humanos, sua utilização é comum e sua administração se dá em casos de choque séptico, queimaduras, diálise renal, entre outros distúrbios (PINTO, 2014), embora resultados satisfatórios ocorram apenas na dependência da quantidade infundida e não da concentração da solução (BELLI, 2008).

### **2.2.5 Imunoglobulinas**

As imunoglobulinas são anticorpos produzidos por células B que identificam, reconhecem e inativam bactérias, vírus e moléculas desconhecidos (PINTO, 2014). Apresentam-se em grande quantidade no plasma e estão associadas à resposta imune-humoral. São utilizadas para reposição, em casos de deficiência congênita na produção de anticorpos, assim como em tratamentos de enfermidades neurológicas, doenças hematológicas e doenças infecciosas (HAMILTON, 2001; FARRUGIA, 2009). Na medicina veterinária, podem ser utilizadas na suplementação de animais agamaglobulinêmicos, em tratamentos para a falha de transferência de imunidade passiva e em tratamentos de doenças causadas por infecções bacterianas, virais e parasitárias, através da infusão de plasma hiperimune ou plasma fresco (CUNHA NETO, 2018; BLOEM, 2006; ZISKA, 2012).

A maior parte das imunoglobulinas são produzidas por plasmócitos derivados de linfócitos B ativados pela presença do antígeno, sendo caracterizados por sua capacidade de se ligar as células ou proteínas específicas do sistema imunológico. Apresentam capacidade de reconhecer antígenos com alta afinidade e estão divididas em 5 isótipos: IgG (cadeia gama), IgA (cadeia alfa), IgM (cadeia mu), IgD (cadeia delta) e IgE (cadeia épsilon), sendo que cada isótipo tem uma função característica podendo neutralizar, fixar, realizar opsonização e proteger mucosa. Na interação entre imunoglobulinas e antígenos, que podem estar associados à epítomos em glicoproteínas, polissacarídeos, partículas virais inteiras e células bacterianas, outra consequência biológica de importância é a transmissão ou transdução de sinais para o interior de células que fazem parte do sistema imunológico, quando os anticorpos estão associados às superfícies celulares através da porção Fc da molécula de imunoglobulina (FELIPPE, 2016; LENX, 2004; LOPES, 2015).

Além de suas funções características, a concentração de cada isótipo de imunoglobulina varia conforme a idade, raça e tipo de estímulo imunológico.

#### **2.2.5.1 IgG**

A IgG é a imunoglobulina mais conhecida. São monômeros com peso molecular de aproximadamente 150 kDa. É produzida no baço e em outros órgãos linfóides secundários e tem capacidade de realizar funções de outras imunoglobulinas e com maior concentração no sangue, sendo também encontrada no colostro; participa da defesa dos tecidos, incluindo a pele, através da opsonização e aglutinação de bactérias, com participação mais significativa na proteção humoral e sistêmica, sendo que as demais imunoglobulinas intensificam essa proteção (FELIPPE, 2016). Na rotina clínica humana é indicado seu uso nos casos de anemia hemolítica autoimune, aplasia de série vermelha, imunodeficiência primária por defeito dos anticorpos, *miastenia gravis*, púrpura trombocitopênica idiopática e Síndrome de Guillain-Barré (SPACIL & BUENO, 2017).

Na medicina veterinária ainda é escasso o uso desses imunobiológico na forma purificada. Sendo apenas utilizado junto ao colostro e na transfusão de plasma fresco congelado ou plasma fresco comum em bovinos e em potros que apresentam falha na transferência de imunidade passiva.

### **2.2.5.2 IgA**

As IgAs são produzidas nos linfonodos e tecidos linfóides associados às mucosas do trato gastro-intestinal ou respiratório, sendo secretadas pelo intestino, sistema urinário e glândula mamária, na forma de dímeros (molécula composta por duas unidades similares) e tendo ação nos tratos intestinal, respiratório, glândula mamária e olhos, protegendo principalmente contra patógenos bacterianos e virais de mucosas do trato gastrointestinal, trato respiratório e trato urogenital, além de neutralizar partículas virais. No soro é encontrada como um monômero e nas secreções como dímeros (FELIPPE, 2016; LOPES, 2015; ZISKA, 2012).

### **2.2.5.3 IgM**

As IgMs são encontradas como pentâmeros, mas também na forma de monômeros. São produzidas pelos linfonodos, medula óssea e baço, tanto na resposta primária como secundária. Terceira imunoglobulina mais encontrada no soro, encontrada no sangue e também na linfa. Possui uma estrutura que permite a ligação de vários antígenos simultaneamente, além de grande eficiência na ativação do sistema complemento (FELIPPE, 2016; LOPES, 2015; ZISKA, 2012).

### **2.2.5.4 IgD e IgE**

As IgDs, encontradas apenas como monômeros, são pouco estáveis, termolábeis e secretadas em pequena quantidade no soro. Por outro lado, as IgEs são monômeros, geralmente encontradas adsorvida aos receptores Fc-épsilon de mastócitos e em menor quantidade no soro; ligam-se aos mastócitos e basófilos, estando dessa forma envolvidas nas reações alérgicas (BARNA, 2001; FELIPPE, 2016; LOPES, 2015; LUCENA, 2010; TANAKA et al., 2004; ZISKA, 2012).

## **2.3 Obtenção do plasma**

Como descrito acima, as proteínas como a albumina e imunoglobulinas são encontradas em grande quantidade no plasma. Existem dois métodos conhecidos na medicina veterinária para coleta de plasma. Um deles é a coleta manual, procedimento comum utilizado na rotina de hospitais, onde após a coleta, a bolsa é refrigerada e há a



sedimentação da parte celular por gravidade. O outro método, automatizado, é mais recente, no qual se utilizam máquinas que centrifugam e separam os componentes por camadas (ESCODRO et al., 2012; ZISKA et al. 2012; MARQUES JR., 2018). O sistema automatizado acontece num sistema fechado, tendo como vantagens a produção de um plasma com melhor qualidade e menos fatores de risco por contaminações microbiológicas (FEIGE et al., 2003; FEIGE et al., 2005; ESCODRO et al., 2012).

Segundo Melo (2010), o produto final na hemoterapia humana, resultado da aférese tanto manual como automatizada, deve passar por inspeção, quando se observa possível alteração de cor, hemólise, contaminação por hemácias (plasma e concentrado de plaquetas), presença de coágulos e integridade da bolsa, além de ser submetido a testes laboratoriais e controle microbiológico. Com intuito de se ter uma melhoria do produto, a avaliação do processo de obtenção, a produção de hemocomponentes de acordo com parâmetros estabelecidos pelas normas vigentes e a garantia a segurança transfusional (Portaria nº 1.353, de 13 de Junho de 2011 Art. 61) são essenciais.

#### **2.4 Controle de qualidade do plasma**

O controle de qualidade é composto por um conjunto de ações com objetivo final de avaliação e acompanhamento dos processos de obtenção e processamento do sangue, buscando assim um hemoproduto de melhor qualidade e seguro (MELO, 2018). Trata-se de um evento indispensável no ciclo de obtenção de hemocomponentes, pois julga se determinados pontos críticos de produção estão sendo realizados de forma adequada (MATANA, 2021).

*“Técnicas e atividades operacionais utilizadas para monitorar o cumprimento dos requisitos da qualidade especificados”*

Anvisa RDC nº 34

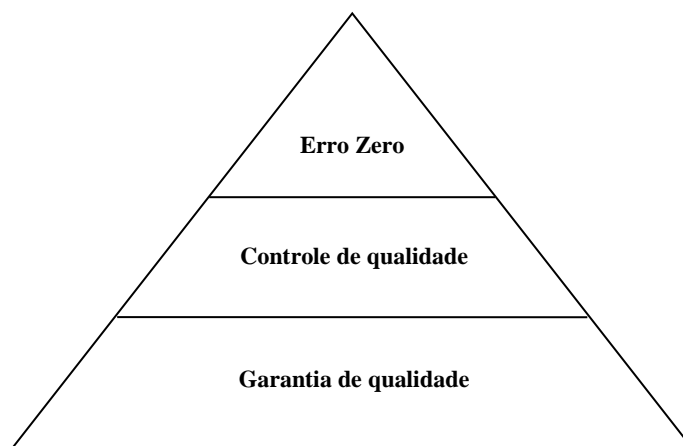
*“Os serviços de hemoterapia realizarão o controle de qualidade sistemático de todos os tipos de componentes sanguíneos que produzirem.”*

Portaria de Consolidação nº 5

O controle de qualidade conta com inúmeros testes e a cada dia surgem novas propostas com intuito de se aumentar a qualidade dos hemocomponentes. Nesse âmbito

existe ainda um debate complexo na área da saúde, pois está diretamente ligado à credibilidade e exige um alto grau de competência para garantia de qualidade (SANTIAGO, 2011; MATANA, 2021). Conforme a pirâmide de Juran (Figura 1), a garantia de qualidade encontra-se numa posição diferente do controle de qualidade, este, localizado na base da pirâmide, determina as técnicas necessárias visando garantir os requisitos exigidos; a garantia determina se as estratégias aplicadas no controle foram eficazes e, no topo, está o erro zero, ou seja, o produto de alta qualidade e livre de contaminações e contaminantes (SANTIAGO, 2011).

Figura 1 – Pirâmide de qualidade de Juran.



Fonte – Adaptado de Santiago, 2011

Esse controle de qualidade dos hemocomponentes inicia-se na seleção do “doador”, onde são realizadas avaliações clínicas e hematológicas para uma seleção criteriosa (MANUAL DE ORIENTAÇÕES EM HEMOTERAPIA, 2008), e segue até o controle de qualidade e seus usos tendo com meta de conformidade a qualidade superior a 75% como preconizado na RDC 153 (2004). Vale ressaltar que na medicina veterinária ainda não há regulamentação específica, sendo norteadas pelas normas preconizadas na hemoterapia humana.

São diversas as etapas de controle de qualidade, desde a avaliação dos insumos, passando por validação de equipamentos e técnicas até o controle de qualidade dos hemocomponentes (MATANA, 2021).

#### **2.4.1 Avaliação microbiológica**

São consideradas fontes de contaminação microbiana a ausência de uma boa antisepsia na venopunção, materiais e equipamentos utilizados na coleta, além do processamento e armazenamento do sangue coletado. O mau acondicionamento desses hemocomponentes pode levar à contaminação e proliferação por agentes infecciosos.

Deve utilizar métodos para detecção desses patógenos tais como: cultura bacteriana, coloração de Gram, PCR (Reação em cadeia da polimerase), MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight*), entre outros. Para a escolha do método, é importante a avaliação de sua especificidade e sensibilidade.

#### **2.4.1.1 Cultura bacteriana**

Mesmo apresentando baixa ocorrência, a transmissão de agentes infecciosos pela transfusão pode ocorrer; assim, é necessário que se realizem culturas para monitoramento e controle de qualidade do material coletado (MEZA, 2018).

Alguns métodos, utilizados para detecção de microrganismos, apresentam uma característica muitas vezes indesejável: a demora na obtenção do resultado; nesses casos, podem ser elencados: o crescimento em caldo específico e/ou semeadura em placas, seguido de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), coloração de Gram e testes bioquímicos para identificação (MARTINI et.al, 2014b). Canellini et.al, (2010), além de ressaltarem sobre o tempo para obtenção de resultados em culturas, alertam para a ausência de um padrão ouro para detecção de microrganismos em hemocomponentes. A técnica por cultura automatizada é bastante utilizada (CUNHA, 2006). Nesse contexto, a utilização da espectrometria de massa conhecida como MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight*), que analisa a estrutura e composição molecular de uma amostra desconhecida, baseada na carga de moléculas ionizadas em uma determinada amostra de colônias microbianas, vem sendo utilizada com maior frequência na rotina de identificação microbiológica, apesar dos custos ainda relativamente altos do equipamentos; a identificação de microrganismos por esta tecnologia é baseada na obtenção dos perfis de proteínas de colônias e comparação com os dados de uma biblioteca de referência derivada de um banco de amostras previamente caracterizadas, sendo que esta identificação é realizada em apenas alguns minutos (CROXATTO et al., 2012).

#### **2.4.1.2 Avaliação de parâmetros metabólicos**

As fitas de reagentes para determinação de glicose e pH nos hemoderivados são outras opções utilizadas para detecção de microrganismos (HÖRNER, 2014). A *American Association of Blood Banks* indica essas avaliações, pois alguns hemocomponentes são mantidos em temperaturas que propiciam crescimento bacteriano, provocando tanto a redução da glicose como o pH.

#### **2.4.1.3 Detecção por material genético**

Técnicas moleculares, com detecção de DNA e RNA, são alternativas para realização de controle microbiológico. A agilidade nos resultados e a alta sensibilidade observada são suas grandes vantagens (WALTHLER-WENKE et al., 2010).

No Brasil, ainda não é indicado cultura microbiológica em todas as amostras de hemocomponentes antes de sua transfusão. São realizadas apenas amostragens a partir de lotes obtidos (BRASIL, 2010).

### **2.5 Avaliação de proteínas**

Proteínas são moléculas grandes que tem em sua composição aminoácidos (SILVA et.al, 2008). São as biomoléculas mais abundantes nos seres vivos e células, apresentando várias funções nos processos celulares (REZENDE, 2016). Existem várias proteínas que podem ser identificadas no soro, como anticorpos, fatores de coagulação, carreadores de moléculas e íons, entre outras (SILVA et al., 2008).

Técnicas espectrofotométricas utilizando reagente de Bradford e técnicas de eletroforese são utilizadas para determinação/quantificação de algumas proteínas presentes nos hemocomponentes (LEMOS, 2016).

#### **2.5.1 Ensaio de Bradford**

É uma técnica que permite mensurar a concentração de proteínas em solução, com extrapolação matemática. Utiliza como base o azul de Comassie que altera a absorbância e conseqüentemente altera a coloração da solução de acordo com a quantidade de proteínas. Sua sensibilidade analítica compreende leituras de absorbância a partir de 1µg de proteína no meio (BRADFORD, 1976; CALDEIRA, 2017).

Em resumo, o teste permite a construção de curva padrão, obtenção da equação da reta e conseqüente extrapolação de dados, a partir de mensuração de concentrações conhecidas de Albumina Sérica Bovina (BSA) (BRADFORD, 1976), através da interação do corante e macromoléculas das proteínas nas amostras (ZAIA et.al, 98; CALDEIRA, 2017).

### **2.5.2 Técnicas de eletroforese de proteínas**

É uma técnica baseada na migração, através de um campo elétrico, de proteínas em estado desnaturado ou nativo. Esta migração acontece através de um suporte poroso, gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) ou gel de agarose, após misturada a uma solução tampão. É um teste de triagem muito utilizado para averiguação de enfermidade com base nas anormalidades de proteínas (SILVA et.al, 2008). Pode ainda ser utilizada para monitoração de hemocomponentes e pacientes por longos períodos (FARIA et. al, 2005).

### **3 OBJETIVO GERAL**

Avaliar e comparar amostras de plasma equino oriundos de dois diferentes procedimentos de obtenção, manual e automatizada, e sob diferentes temperaturas de conservação, com o intuito de se investigar, de forma inédita, concentração de proteínas e ocorrência de contaminação microbiana.

### **4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a. Avaliar e quantificar proteínas totais, albumina e IgG, presentes em amostras de plasma, coletadas pelos sistemas manual e automatizado;
- b. Avaliar e comparar a viabilidade das frações de proteínas, albumina e IgG, quando as amostras de plasma são preservadas sob refrigeração e sob congelamento;
- c. Avaliar e comparar microbiologicamente a qualidade das amostras de plasmas obtidos;

## **5 HIPÓTESE**

Espera-se que por meio da aférese automatizada seja possível a produção de um plasma equino de qualidade superior quando comparado ao plasma produzido convencionalmente por decantação da série vermelha (coleta manual), tornando-se uma fonte segura de imunoglobulinas essenciais para o reestabelecimento da saúde do animal quando necessária a sua utilização.

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1 Animais Experimentais

No experimento foram utilizados vinte equinos hípidos, advindos de propriedades controladas para anemia infecciosa equina, mormo e influenza equina, com histórico de vacinação anual para raiva e tétano próximos a sua data de revacinação e peso médio de 400 kg. Este projeto foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob o protocolo n° 9210041218.

Foram separados em dois grupos, coleta manual e coleta automatizada, submetidos a manejo semi-intensivo, com alimentação composta por concentrado comercial, 0,5% do peso vivo, fornecidos duas vezes ao dia (manhã e tarde) e sal mineral comercial (fornecido uma vez ao dia), com acesso a piquete de coast-cross, 22 horas por dia.

Os animais foram devidamente vermifugados com produto a base de ivermectina e pamoato de pirantel (Equijet<sup>®</sup>), em dose única, 15 dias antes do início do protocolo vacinal. A primeira imunização foi realizada com vacinas para raiva, encefalomielite viral equina, tétano e influenza I e II, sendo realizado reforço vacinal no décimo quinto dia após primeira dose. O procedimento de coleta, tanto manual como automatizado, ocorreu 15 dias após a data em que foram realizados os reforços vacinais.

Após a contenção em bretes, iniciaram-se as coletas, realizadas através da venopunção (veia jugular externa esquerda), onde foi realizada tricotomia ampla de maneira a reduzir a contaminação no método tradicional; na sequência, foi realizada antissepsia com clorexidine degermante e clorexidine alcoólico (Figura 2).

Figura 2 – Procedimento de antissepsia pós tricotomia ampla.



Fonte - Acervo pessoal



No grupo de coleta manual foram retirados aproximadamente 6 litros de sangue total ou até 8% do peso vivo/animal, dependendo do hematócrito apresentado pelo animal. Foram utilizadas bolsas de coleta de sangue total (bolsa satélite). Após o procedimento, as bolsas foram armazenadas a  $5^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$ , para separação total do plasma, o que demandou aproximadamente 18 horas.

Com relação à coleta automatizada (Figura 3), os animais utilizados nesse segundo grupo tiveram o esquema de antissepsia semelhante ao realizado para a coleta manual. Foram cateterizados (veia jugular externa esquerda) com cateter venoso central de duplo lúmen para hemodiálise 12fr Biomed<sup>®</sup> para estabilizar o acesso durante o procedimento que compreendeu um tempo médio de 4 horas. Para o procedimento, foi utilizado equipamento especializado para aférese da empresa Fresenius Kabi<sup>®</sup> (Figura 4) modelo AS104 (Fresenius-Kabi Ltda.- Bad Homburg, Alemanha).

Figura 3 – Fixação de cateter venoso central



Fonte - Acervo pessoal

Figura 4 - Equipamento para aférese da empresa Fresenius Kabi®.



Fonte - Acervo pessoal

Durante os procedimentos, os animais foram monitorados clinicamente avaliando frequência cardíaca, frequência respiratória, tempo de preenchimento capilar, avaliação de mucosas e temperatura retal, bem como foram realizadas coletas de sangue para avaliação hematológica, pesquisa de hematozoários e testes bioquímicos, estabelecendo-se os seguintes tempos: pré-colheita (T1), pós-colheita (T2) e 24 horas após colheita (T3), com intuito de se acompanhar o restabelecimento dos níveis hematológicos e saúde do animal produtor de plasma, complementando-se a avaliação do plasma.

### **6.1.1 Análises hematológica e bioquímica dos animais doadores**

Para avaliação hematológica foi utilizado o analisador Mindray BC-2800Vet para contagem de hemácias, hemoglobina, volume globular, VCM, HCM, CHCM, contagem de plaquetas, proteína plasmática total e pesquisa de hematozoários. As amostras de sangue foram coletadas através de punção da veia jugular externa direita, utilizando-se sistema vacutainer com agulha 25 X 8 mm e tubo de 2 mL contendo anticoagulante EDTA (tampa roxa).

Na avaliação bioquímica, foi utilizado analisador para química clínica BS 120 (Mindray) e kits comerciais Labtest<sup>®</sup>. As amostras foram coletadas através da veia jugular externa direita, utilizando-se sistema vacutainer e agulha 25 X 8 mm e 2 tubos secos de 2 mL (tampa vermelha) cada (um tubo protegido da luz para avaliação de bilirrubinas). As provas bioquímicas realizadas foram: Aspartato aminotransferase (AST), Gama glutamil transferase (GGT), Fosfatase alcalina (FA), Bilirrubina total (BT), Bilirrubina direta (BD), Bilirrubina indireta (BI), Ureia, Creatinina, Proteínas totais (PT), Albumina e Globulinas.

## **6.2 Análise microbiológica do plasma**

Para as avaliações microbiológicas, foram utilizadas amostras de plasma armazenadas sob diferentes temperaturas: refrigerada e mantida a 8°C, congelada e mantida a -20°C, congelada e mantida a -80°C. Os cultivos microbianos foram realizados conforme o seguinte procedimento: a amostra de sangue ou plasma foi colocada em temperatura ambiente; logo após, 100 µL foram coletados para semeadura em tubo contendo caldo BHI, sendo incubado por 24 horas a 37°C; na sequência, constatando-se ou não crescimento, indicado por turvação do meio, inóculo foi transferido com auxílio de uma alça bacteriológica para placa de Petri contendo ágar sangue, através da técnica de esgotamento em estrias, sendo a placa incubada a 37°C por 48 horas.

Em seguida, para caracterização dos microrganismos, foram aplicadas provas bioquímicas, teste de citrato, teste do indol, teste de vermelho de metila, fermentação de carboidratos e prova da catalase.

Complementando os testes bioquímicos as amostras foram enviadas para análise por espectrometria de massa (MALDI-TOF), que utiliza ionização para diagnosticar as proteínas de uma bactéria.

Para complementação das avaliações microbiológicas, foi realizada a técnica de PCR, iniciando-se pela extração do DNA por choque térmico de acordo com os procedimentos descritos por Chapman et al. (2001). As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 10 minutos, para posterior descarte do sobrenadante e ressuspensão do sedimento em 100 µL de água Milli-Q autoclavada. Após a ressuspensão, foi realizada incubação em banho-seco a 95°C durante 20 minutos e, logo depois, a suspensão foi centrifugada novamente a 14.000 rpm por 10 minutos. Com cuidado, foi retirado o

sobrenadante para quantificação de DNA em espectrofotômetro (Denovix, Delaware, USA) e armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior utilização.

O DNA foi submetido ao método de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) convencional com primers para rDNA 16S (Invitrogen Custom Primers, Thermo Fisher Scientific) para amplificação dos fragmentos de 1000 pb ou mais, apresentando as seguintes sequências nucleotídicas 5' - 3': 518F – CCAGCAGCCGCGGTAATACG e 800 R – TACCAGGGTATCTAATCC seguindo as recomendações de Sari & Aryantha, 2021. Como controle positivo, foi utilizada cepa de *Escherichia coli*, oriunda do banco de isolados do Laboratório de Higiene Zootécnica (FZEA-USP).

### 6.3 Análises das proteínas totais e imunoglobulinas do plasma

Após a coleta do plasma, foram separadas, por animal doador, alíquotas de 2 mL de plasma em microtubos do tipo eppendorf<sup>®</sup>, sendo armazenados sob diferentes temperaturas (refrigerada e mantida a  $8^{\circ}\text{C}$ , congelada e mantida a  $-20^{\circ}\text{C}$  e congelada e mantida a  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

As análises foram realizadas em triplicata com as amostras armazenadas sob os diferentes regimes de temperatura acima descritos para a dosagem de proteínas. A determinação da concentração das proteínas do plasma foi realizada através do método de Bradford. O ensaio tem como princípio a interação entre o reagente Coomassie Brilliant Blue G e as proteínas em meio ácido, com leitura de absorbância ao comprimento de onda de 595 nm. As soluções foram preparadas de acordo com Bradford (1976) adaptado, e para tanto foi utilizado o Reagente de Bradford (Merck-Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, EUA). Para construção da curva padrão (Tabela 1) foi utilizado BSA na concentração inicial de 1mg/mL, diluído serialmente em razão de base 10, obtendo-se uma concentração final de 0,001g/mL.

Tabela 1 – Concentrações de BSA utilizadas para a construção de curva padrão.

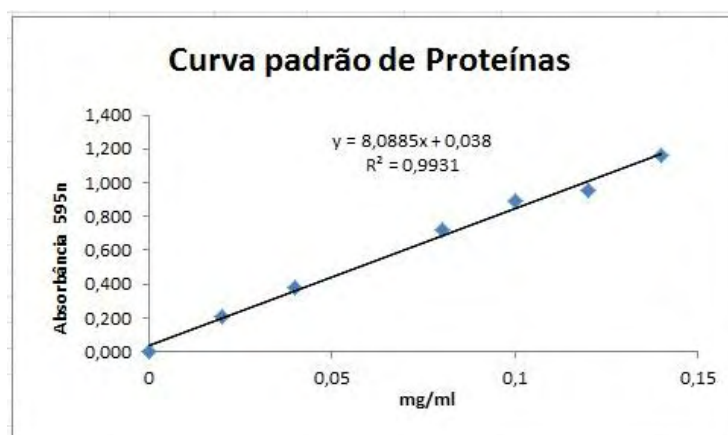
	Concentração	BSA 1mg/mL	Reagente de Bradford
1.	0	-	1000 $\mu\text{L}$
2.	0,02 mg/mL	20 $\mu\text{L}$	980 $\mu\text{L}$

3.	0,04 mg/mL	40 µL	960 µL
4.	0,08 mg/mL	80 µL	920 µL
5.	0,10 mg/mL	100 µL	900 µL
6.	0,12 mg/mL	120 µL	880 µL
7.	0,14 mg/mL	140 µL	860 µL

---

Em cubeta de 1 mL, adicionou-se a albumina já diluída, água ultrapura e o reagente. Foi realizada a leitura a 595nm e, em seguida, a construção da curva padrão (Figura 5), onde no eixo horizontal (abscissa) encontra-se a concentração da albumina e no eixo vertical (ordenada) encontra-se o resultado da absorbância. A leitura de todas as amostras foi realizada no mesmo dia, sequencialmente, evitando-se possíveis variações para a extrapolação dos dados da curva.

Figura 5 – Curva padrão para determinação de proteína



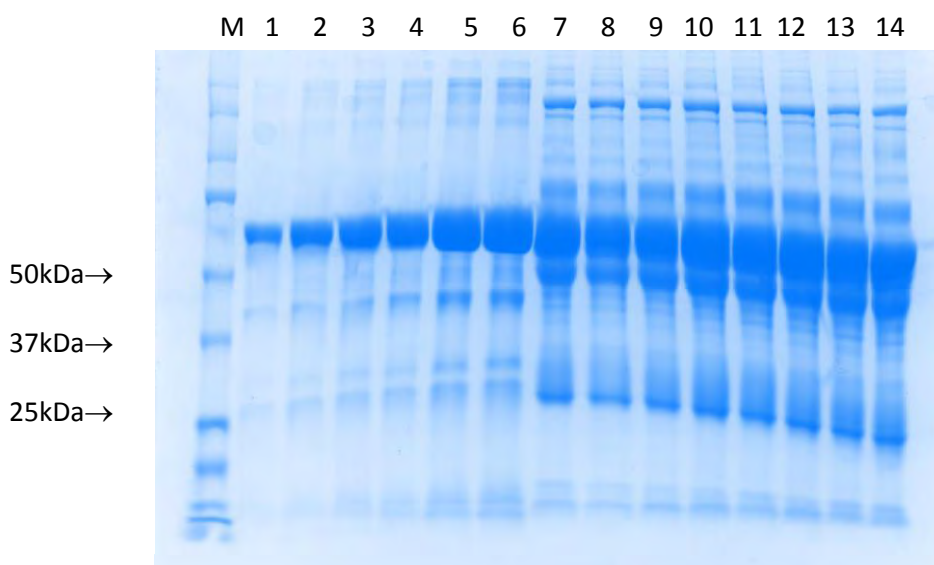
Fonte - Acervo pessoal

O preparo das amostras seguiu primeiramente com a diluição da amostra onde foram utilizados 2,5 µL da amostra para 497,5 µL de H<sub>2</sub>O ultrapura; após diluição da amostra acrescentaram-se 500 µL do reagente de Bradford. A mistura permaneceu em incubação em geladeira por 30 minutos e, posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm. A solução branco empregada foi 1000 µL do reagente de Bradford.

Para o fracionamento das proteínas e obtenção das concentrações de IgG, foi utilizado a técnica descrita por Laemmli (1970) de eletroforese em gel de acrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), onde foi realizada a mistura entre as amostras proteicas e tampão da amostra, aquecidas a 95°C por 5 minutos. Para as corridas eletroforéticas, foi utilizado o gel comercial BIO-RAD Mini-PROTEAN® TGX™ a 10%. A corrida foi realizada a 100 V, por aproximadamente 2 horas e 30 minutos. As amostras foram preparadas com protocolo de diluição com água ultrapura autoclavada, com intuito que suas concentrações finais estivessem a 1mg/mL. Após a corrida, o gel foi submetido em solução de fixação por 15 minutos, sendo o fixador composto por ácido acético, água e metanol. Após fixação, o gel foi corado com solução corante, composta pela mesma solução fixadora acrescida de Comassie blue, por 30 minutos. Em seguida, o gel foi submetido à descoloração em solução de ácido acético, água e metanol.

As determinações das concentrações de albumina e IgG foram realizadas através da leitura das bandas (Figura 6) e construção de curva padrão, sendo utilizado software para processamento e análise de imagens ImageJ (Wayne Resband, National Institute of Mental Health, USA).

Figura 6 – Exemplo de gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) utilizado na quantificação de albumina e IgG, através da leitura de bandas pelo programa ImageJ®. M: marcador de 250 kDa; [1 a 6]: amostras de albumina (0,25 mg/mL, 0,5 mg/mL, 0,75 mg/mL, 1,0 mg/mL, 1,5 mg/mL, 2,0 mg/mL) para construção da curva padrão; [7: A1 -20°C; 8: A2 -20°C; 9: A3 -20°C; 10: A4 -20°C; 11: A5 -20°C; 12: A6 -20°C; 13: A7 -20°C; 14: A8 -20°C].



Fonte - Acervo pessoal

#### **6.4 Análises estatísticas**

Os dados obtidos na fase experimental foram avaliados em relação aos diferentes parâmetros, descrevendo-se as variáveis qualitativas e quantitativas, em forma de frequências (absolutas e relativas) e percentuais de animais que apresentavam determinada característica, para cada item avaliado nos grupos experimentais. Os dados paramétricos foram submetidos à análise estatística empregando-se o software Statistical Analysis System, SAS/STAT<sup>®</sup> 9.3 (SAS Institute Inc.). Foi utilizada análise de variância para repetições múltiplas (ANOVA), na avaliação das diferenças das médias ao longo do tempo dentro de cada grupo e entre os grupos, seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p \leq 0,05$ .

## **7 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **7.1 – Resultados das avaliações clínica, hematológica e bioquímica dos animais doadores**

Dentre os resultados obtidos, é necessário ressaltar a higidez dos animais participante do experimento. Por meio da avaliação clínica, todos mantiveram-se dentro dos padrões fisiológicos da espécie (Tabela 2).

Os animais doadores, tanto no sistema manual como automatizado de coleta, não apresentaram alterações em seus exames, mantendo-se todos dentro dos valores de referência (Tabelas 3 e 4). O resultado é corroborado por Feige et al. (2003) que ao coletarem plasma pelo método automatizado, comparando com outros tipos de coleta, afirmou que os animais toleraram bem o procedimento. Feige et al. (2005), observando as variáveis clínicas e hematológicas dos animais doadores de plasma, indicaram que houve apenas aumento discreto no hematócrito, nas concentrações de hemoglobina e eritrócitos. Já Escodro et al. (2013), ao padronizar a técnica de plasmaférese em equinos, observaram que os animais não sofriam alterações em seus valores hematológicos.

Com relação aos valores bioquímicos, Magdesian et al. (1992), ao avaliarem os efeitos temporais da plasmaférese sobre as proteínas dos equinos doadores, observaram uma diminuição significativa nas concentrações de proteínas totais e albuminas. Feige et al. (2005) observaram essa mesma alteração ao investigarem os efeitos da plasmaférese automatizada nas variáveis hematológicas e bioquímicas dos animais doadores. Porém essas alterações não foram observadas no presente trabalho como demonstrado na tabela 3.



Tabela 2 - Média dos resultados das avaliações clínicas dos animais doadores.

<b>Grupos</b>	<b>FC (BPM)</b>	<b>FR (MPM)</b>	<b>T°C</b>	<b>TPC</b>	<b>Mucosa</b>	<b>Peso (Kg)</b>
<b>Manual</b>	38±2,0	14±3	38,2±0,3	2"	Róseas	400±0,3
<b>Automatizada</b>	36±2,0	14±3	38±0,3	2"	Róseas	400±0,3
<b>Valores de Referência*</b>	<b>24 - 40</b>	<b>12 - 18</b>	<b>37,5 - 38,5</b>	<b>2"</b>	<b>Róseas</b>	

Tabela 3 - Média dos resultados hematológicos dos animais doadores.

<b>Grupos</b>	<b>Leucócitos Totais (/µL)</b>	<b>Hemácias (x106/µL)</b>	<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	<b>Hematócrito (%)</b>	<b>VCM (fL)</b>	<b>HCM (pg)</b>	<b>CHCM (%)</b>	<b>Plaquetas (/µL)</b>	<b>Proteína plasmática (g/dL)</b>
<b>Manual</b>	6.400±0,7	7,849±0,7	13,14±1,03	38,36±3,3	48,98±2,6	16,7±0,5	34,74±1,03	162.600±45.354	6,92±0,4
<b>Automatizada</b>	8,775±1,1	8,2±0,7	13,5±1,1	38,3±1,3	45,7±5,9	16,4±0,7	34,2±1,7	191.300±61.937	5,6±0,8
<b>Valores de Referência*</b>	<b>5.000 - 13.900</b>	<b>6,4-10,0</b>	<b>11-17</b>	<b>32-47</b>	<b>43-54</b>	<b>15-19</b>	<b>34-37</b>	<b>100.000-270.000</b>	<b>6,1-8,0</b>

Tabela 4 - Média dos resultados das análises bioquímicas dos animais doadores.

<b>Grupos</b>	<b>Uréia (mg/ dL)</b>	<b>Creatinina (mg/ dL)</b>	<b>AST (U/L)</b>	<b>GGT (U/L)</b>	<b>Fosfatase Alcalina (U/L)</b>	<b>Proteína Total (g/dL)</b>	<b>Albumina (g/dL)</b>	<b>Globulinas (g/dL)</b>	<b>Bilirrubina Total (mg/dL)</b>	<b>Bilirrubina Direta (mg/dL)</b>	<b>Bilirrubina Indireta (mg/dL)</b>
<b>Manual</b>	40,47±7,3	1,38±0,2	291±44	13±4,4	183±26	6,52±0,2	3,12±0,2	3,40±0,3	1,05±0,3	0,46±0,1	0,60±0,3
<b>Automatizada</b>	40,2±7,3	1,22±0,2	278±29	11±2,4	137±21	5,48±0,2	2,36±0,1	3,12±0,2	0,73±0,2	0,31±0,0	0,42±0,2
<b>Valores de Referência*</b>	24,7-55,7	1,0-1,9	152-294	9-25	102-257	5,5-7,3	2,7-4,2	2,1-3,8	0,5-2,1		

## 7.2 – Análises microbiológicas do plasma

Das 20 amostras avaliadas de plasma equino, advindos das coletas manuais e automatizadas, e seguindo as recomendações delineadas neste projeto, após incubação em caldo BHI por 24 horas, foi possível observar crescimento em uma das amostras da coleta manual (Figura 7). Essa amostra foi cultivada em ágar sangue por 48 horas, confirmando-se o crescimento bacteriano (Figuras 8 e 9). Foi realizada a coloração de Gram e leitura em microscópio com objetiva de imersão (100X). Seguindo os protocolos, a amostra foi enviada para testes bioquímicos, espectrometria de massas (MALDI-TOF) e sequenciamento de fragmento do gene rDNA 16S. A identificação fenotípica mostrou tratar-se de bacilos Gram negativos. Os testes bioquímicos revelaram gênero bacteriano pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Na espectrometria de massas, a bactéria isolada foi classificada como pertencente ao gênero *Enterobacter* spp. e a análise da sequência do gene rDNA 16S corroborou este resultado.

Figura 7 – Amostra em caldo BHI com crescimento bacteriano de amostra de plasma coletada manualmente.



Fonte - Acervo pessoal

Para Melo (2010), contaminações geralmente estão ligadas às etapas que antecedem a coleta (triagem do doador e antissepsia realizada antes da coleta). Meza (2018) complementa ainda que contaminações bacterianas podem ocorrer devido à temperatura de estocagem, separação do hemoproduto, mas também pela antissepsia ineficiente. Teixeira (2011), em sua pesquisa sobre prevenção e controle de contaminação em hemocomponentes, além de ressaltar a possibilidade de contaminação ao fato de não haver uma antissepsia adequada, observa ainda que as contaminações poderão estar relacionadas à presença de microrganismo nas bolsas de coleta.

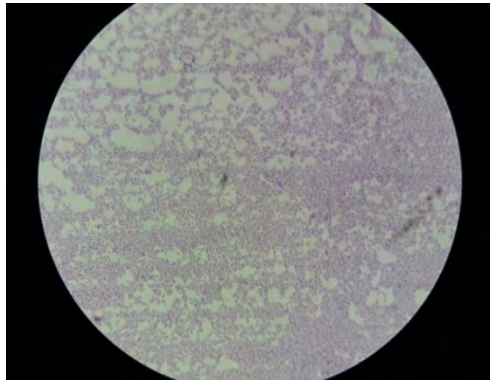
Martini et al. (2010), ao avaliarem métodos de detecção de microrganismos em concentrado de plaquetas, alertam ainda que mesmo havendo melhorias nos procedimentos pré-coleta, com intuito de reduzir as contaminações, existe a necessidade de se aprimorar técnicas para detecção desses microrganismos.

Figura 8 – Placa de ágar sangue com presença de crescimento bacteriano, a partir de amostra de plasma coletada manualmente.



Fonte - Acervo pessoal

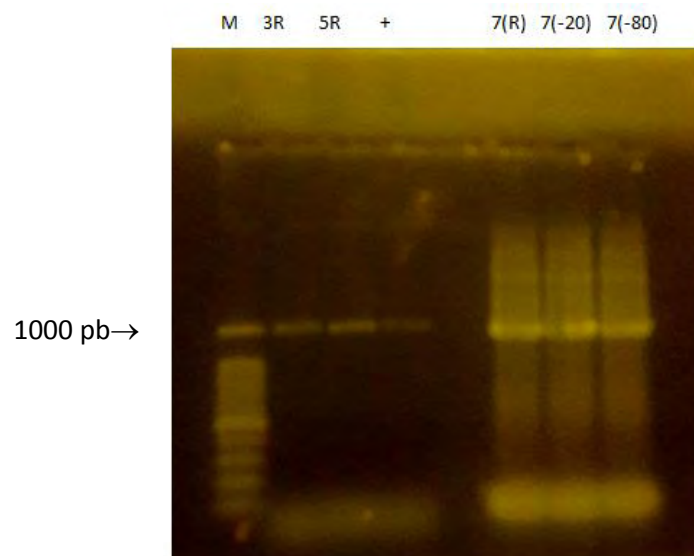
Figura 9 – Coloração de Gram (Bactéria Gram negativa em formato bacilar) com leitura em objetiva de imersão 100X, a partir de amostra de plasma coletada manualmente.



Fonte - Acervo pessoal

Ainda durante as análises, foi possível detectar, através do teste PCR, em cinco amostras, DNA bacteriano (Tabela 5 e Figura 10). Os produtos detectados foram enviados para sequenciamento, aguardando resultados. Pode-se observar que boa parte das amostras (n=3) encontram-se sob refrigeração, enquanto as outras 2 estavam sob congelamento, sendo 1 a -20°C e outra a -80°C.

Figura 10 – Fragmentos de 1000 pb observados a partir da reação de PCR para rDNA 16S, após eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando-se amostras refrigeradas, 3R, 5R e 7(R), e congeladas, 7(-20) e 7(-80), de plasma. M: marcador de tamanho molecular de 100pb; +: controle positivo (*Escherichia coli*).



Fonte - Acervo pessoal

Tabela 5 – Detecção de microrganismo por PCR.

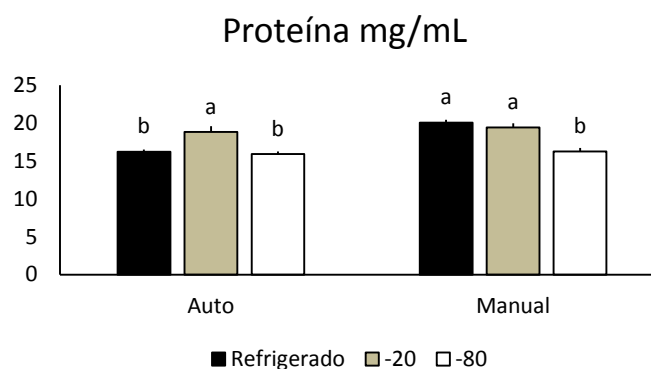
Amostras Manuais					Amostras automatizadas						
Refrigerado		(-20°C)		(-80°C)		Refrigerado		(-20°C)		(-80°C)	
<b>A1</b>	-	<b>A1</b>	-	<b>A1</b>	-	<b>A1</b>	-	<b>A1</b>	-	<b>A1</b>	-
<b>A2</b>	-	<b>A2</b>	-	<b>A2</b>	-	<b>A2</b>	-	<b>A2</b>	-	<b>A2</b>	-
<b>A3</b>	Det.*	<b>A3</b>	-	<b>A3</b>	-	<b>A3</b>	-	<b>A3</b>	-	<b>A3</b>	-
<b>A4</b>	-	<b>A4</b>	-	<b>A4</b>	-	<b>A4</b>	-	<b>A4</b>	-	<b>A4</b>	-
<b>A5</b>	Det.*	<b>A5</b>	-	<b>A5</b>	-	<b>A5</b>	-	<b>A5</b>	-	<b>A5</b>	-
<b>A6</b>	-	<b>A6</b>	-	<b>A6</b>	-	<b>A6</b>	-	<b>A6</b>	-	<b>A6</b>	-
<b>A7</b>	Det.*	<b>A7</b>	Det.*	<b>A7</b>	Det.*	<b>A7</b>	-	<b>A7</b>	-	<b>A7</b>	-
<b>A8</b>	-	<b>A8</b>	-	<b>A8</b>	-	<b>A8</b>	-	<b>A8</b>	-	<b>A8</b>	-
<b>A9</b>	-	<b>A9</b>	-	<b>A9</b>	-	<b>A9</b>	-	<b>A9</b>	-	<b>A9</b>	-
<b>A10</b>	-	<b>A10</b>	-	<b>A10</b>	-	<b>A10</b>	-	<b>A10</b>	-	<b>A10</b>	-

\* Det. - Detectado

### 7.3 Resultados da concentração de proteínas totais e concentrações de albumina e imunoglobulinas

Através da técnica de quantificação de proteínas por Bradford (Tabela 6), foi possível observar que o método de coleta manual demonstrou uma superioridade, em relação ao método de coleta automatizado, de 23% apenas para as proteínas presentes no plasma mantido sob refrigeração (Gráfico 1). Apesar de haver apenas essa diferença, a coleta automatizada pode ser considerada um melhor método, porque existe a possibilidade de diminuir os riscos de contaminação por microrganismos, como citado nos resultados da avaliação microbiológica. Além disso, o plasma coletado de forma automatizada e mantido sob congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  mantém níveis de proteínas iguais aos coletados de forma manual armazenado sob refrigeração e congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Souza (2018) recomenda, em estudo de processamento de hemocomponentes e validação de processos para Hospital das Clínicas de Porto Alegre, que PFCs, advindos de coletas manual e automatizada, devem ser mantidos em temperaturas de  $-20^{\circ}\text{C}$ , com o intuito de manter as proteínas preservadas. No Manual de Hemoterapia Colsan (2018), a indicação é que o PFC seja armazenado em temperaturas iguais ou inferiores a  $-30^{\circ}\text{C}$ , objetivando-se manter as proteínas viáveis para uso por um período de até cinco anos. Corroborando, Biagini & Albiero (2018), no Manual de Transfusão Prosangue, explicam ainda que além do armazenamento a  $-20^{\circ}\text{C}$ , o processo de congelamento deve ocorrer em um intervalo de até 8 horas pós coleta para garantir a qualidade.

Gráfico 1 – Variação das concentrações de proteínas de acordo com tipo de coleta e armazenamento. Letras iguais não diferem estatisticamente ( $p \leq 0,5$ ).



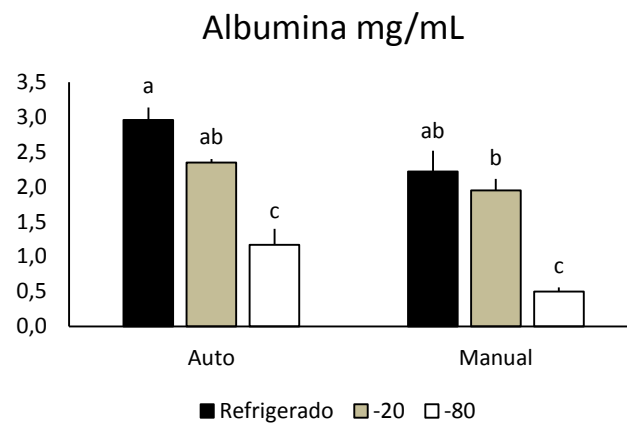
Ao tratar dos valores obtidos para as concentrações de albumina, foi possível observar que o método de coleta automatizada se mostrou mais eficaz (Gráfico 2), demonstrando valores percentuais superiores em 35% para armazenamento refrigerado, 20% para congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  e 140% quando armazenado  $-80^{\circ}\text{C}$ . Apesar dos valores de proteínas totais apresentarem superiores na coleta manual, valores encontrados para albumina sugere que o método de coleta automatizada pode ser capaz de concentrar maiores quantidades de dessa proteína em específico.

Dada à inexistência de literatura comparando sistemas de coleta de plasma em equinos, infere-se que a eventual baixa centrifugação do material coletado por aférese automatizada, possa colaborar para a remoção de frações proteicas do plasma, comparativamente ao sistema manual. No entanto, não há informações ou caracterização das proteínas que eventualmente comporiam essa fração removida pela etapa de centrifugação da aférese automatizada. No entanto, numa primeira análise, tal remoção parece não afetar as frações proteicas de maior valor clínico/terapêutico conhecido, bem delimitadas na medicina transfusional humana (albumina, imunoglobulinas), porém ainda sujeitas a uma melhor caracterização em equinos, ampliando a discussão sobre os tipos de coleta de hemocomponentes, armazenamento e a relação com as concentrações encontradas no hemoproduto dentro da medicina transfusional equina.

O plasma é rico em proteínas, albumina, fator de coagulação, imunoglobulinas e sais minerais. Desta forma, torna-se importante que seu armazenamento seja capaz de manter esses hemoderivados presentes no PFC viáveis para uso. Temperaturas inferiores a  $-18^{\circ}\text{C}$  (dezoito graus Celsius negativos) são as mais indicadas para manutenção desses componentes (SOUZA, 2018; MANUAL DE HEMOTERAPIA COLSAN, 2018; BIAGINI & ALBIERO, 2018).



Gráfico 2 – Variação das concentrações de albumina de acordo com tipo de coleta e armazenamento. Letras iguais não diferem estatisticamente ( $p \leq 0,5$ ).



Com relação às concentrações de IgG, foi possível observar que a coleta automatizada e o armazenamento dos plasmas a  $-80^{\circ}\text{C}$  mostraram-se superiores quando comparados aos demais (Gráfico 3). Esse dado difere dos resultados encontrados na literatura, onde a temperatura ideal de armazenamento de PFC, para manutenção dos níveis de imunoglobulinas, é de  $-20^{\circ}\text{C}$  (SOUZA, 2018; MANUAL DE HEMOTERAPIA COLSAN, 2018; BIAGINI & ALBIERO, 2018). Alguns fatores podem estar ligados a essa diferença encontrada, como por exemplo, o fato de que a separação manual depende de decantação e pressão manual empírica que precede ao fracionamento do produto, o que possivelmente levaria as amostras a apresentarem maior ou menor quantidade de IgG, corroborando com Barna, (2001) em seu estudo onde compara os métodos de preparação de imunoglobulinas.

Gráfico 3 – Variação das concentrações de IgG de acordo com tipo de coleta e armazenamento. Letras iguais não diferem estatisticamente ( $p \leq 0,5$ ).

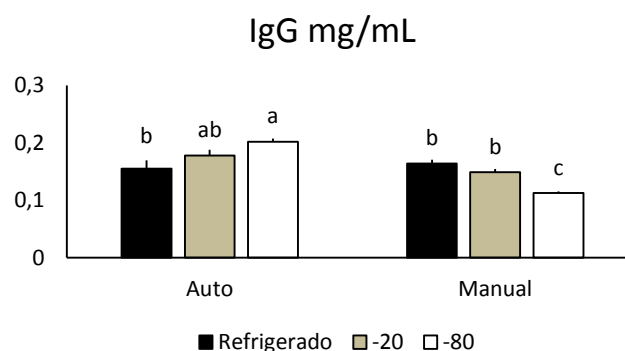


Tabela 6 – Resultado da análise de proteína (mg/mL)

<b>Plasma automatizado</b>				<b>Plasma manual</b>			
<b>Animal</b>	<b>Refrigerado</b>	<b>-20°C</b>	<b>-80°C</b>	<b>Animal</b>	<b>Refrigerado</b>	<b>-20°C</b>	<b>-80°C</b>
<b>A1</b>	16,84	18,30	15,33	<b>A1</b>	18,61	18,37	15,48
<b>A2</b>	16,20	17,09	15,32	<b>A2</b>	20,42	18,40	15,53
<b>A3</b>	16,81	19,74	17,17	<b>A3</b>	19,52	19,68	14,79
<b>A4</b>	16,94	22,29	16,72	<b>A4</b>	19,39	15,95	14,61
<b>A5</b>	14,66	16,07	16,86	<b>A5</b>	18,74	18,50	15,15
<b>A6</b>	14,76	22,02	15,29	<b>A6</b>	19,04	19,40	18,13
<b>A7</b>	16,43	14,99	13,74	<b>A7</b>	20,80	21,54	16,16
<b>A8</b>	16,56	19,62	15,83	<b>A8</b>	21,82	21,18	19,03
<b>A9</b>	16,99	20,70	15,64	<b>A9</b>	20,94	19,82	17,40
<b>A10</b>	16,13	17,38	17,25	<b>A10</b>	21,50	21,44	16,18
<b>Média</b>	16,23	18,82	15,91		20,08	19,43	16,25
<b>Desvio Padrão</b>	±0,85	±2,61	±1,09		±1,17	±1,73	±1,48

Tabela 7 – Resultado da análise das concentrações de albumina (mg/mL)

Plasma automatizado				Plasma manual			
Animal	Refrigerado	-20°C	-80°C	Animal	Refrigerado	-20°C	-80°C
<b>A1</b>	2,0	2,2	1,0	<b>A1</b>	2,8	1,0	1,0
<b>A2</b>	3,6	2,2	1,5	<b>A2</b>	0,5	1,9	0,6
<b>A3</b>	2,3	2,0	1,5	<b>A3</b>	2,3	2,1	0,4
<b>A4</b>	2,6	1,6	0,5	<b>A4</b>	3,1	2,1	0,3
<b>A5</b>	2,6	1,8	0,4	<b>A5</b>	3,0	2,8	0,4
<b>A6</b>	3,6	1,0	0,3	<b>A6</b>	2,7	2,5	0,5
<b>A7</b>	3,2	1,0	0,5	<b>A7</b>	2,4	1,5	0,4
<b>A8</b>	3,5	2,5	1,9	<b>A8</b>	0,7	2,2	0,5
<b>A9</b>	3,3	1,8	1,5	<b>A9</b>	2,1	1,9	0,5
<b>A10</b>	2,9	2,4	1,8	<b>A10</b>	2,1	1,5	0,4
<b>Média</b>	2,9	1,8	1,0		2,2	1,9	0,5
<b>Desvio Padrão</b>	±0,5	±0,5	±0,6		±0,9	±0,5	±0,2

Tabela 8 – Resultado da análise das concentrações de IgG (mg/mL)

Plasma automatizado				Plasma manual			
Animal	Refrigerado	-20°C	-80°C	Animal	Refrigerado	-20°C	-80°C
<b>A1</b>	0,19	0,19	0,20	<b>A1</b>	0,19	0,15	0,12
<b>A2</b>	0,22	0,15	0,22	<b>A2</b>	0,16	0,16	0,10
<b>A3</b>	0,13	0,19	0,22	<b>A3</b>	0,19	0,18	0,12
<b>A4</b>	0,22	0,19	0,21	<b>A4</b>	0,16	0,16	0,10
<b>A5</b>	0,18	0,19	0,20	<b>A5</b>	0,16	0,16	0,12
<b>A6</b>	0,10	0,12	0,17	<b>A6</b>	0,13	0,15	0,11
<b>A7</b>	0,17	0,19	0,22	<b>A7</b>	0,18	0,14	0,12
<b>A8</b>	0,13	0,24	0,19	<b>A8</b>	0,18	0,12	0,11
<b>A9</b>	0,11	0,16	0,21	<b>A9</b>	0,14	0,13	0,11
<b>A10</b>	0,10	0,16	0,18	<b>A10</b>	0,15	0,14	0,12
<b>Média</b>	0,15	0,18	0,20		0,16	0,15	0,11
<b>Desvio Padrão</b>	±0,04	±0,03	±0,02		±0,02	±0,02	±0,01

## 8. CONCLUSÃO

Neste contexto, os plasmas coletados por aférese automatizada revelaram-se, em sua grande maioria, considerando as diferentes condições de armazenamento, com qualidade superior em relação à concentração de proteínas totais, albumina, IgG e controle microbiológico quando comparados aos plasmas coletados pelo método manual, podendo ser caracterizados como hemocomponentes com segurança microbiológica e apresentando concentrações de proteínas adequadas para a utilização em equinos.

Com relação à temperatura de armazenamento, o congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  mostrou-se o mais adequado, por favorecer a manutenção de concentrações adequadas de proteínas, embora não tenha sido a temperatura ideal para conservação de IgG.

Não obstante, novos estudos são necessários com intuito de se avaliar a funcionalidade biológica dessas frações proteicas, mantidas congeladas, além de se obter melhores subsídios à compreensão do efeito do tempo de prateleira sobre o plasma congelado.

## REFERÊNCIAS

- 1 - ABRAMS-OGG, A.C.G. Practical Blood Transfusion. In: DAY, M.; MACKIN, A.; LITTLEWOOD, J. Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine. 1 ed. **Hampshire: British Small Animal Veterinary Association**, cap.2, p.263-303, 2000.
- 2 - ARROYO, L.G.; SEARS, W.; GOMEZ, D.E. Plasma transfusions in horses with typhlocolitis/colitis. *Can Vet Journal* v.60, p. 193–196, 2019.
- 3 - BALDANI, C. D.; MACHADO, R. Z.; BOTTEON, P. T. L.; TAKAKURA, F. S.; MASSARD, C. L. Enzymelinked immunosorbent assay for the detection of IgG antibodies against Babesia equi in horses. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1525-1529, 2004.
- 4 - BARNA, G.A.O. **Estudo comparativo “in vitro” entre preparações de imunoglobulinas G, para uso intravenoso, obtida de plasma humano de variadas procedências e processadas por diferentes técnicas de separação**. Tese de Doutorado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, 2001.
- 5 - BELLI, C.B.; MICHIMA, L.E.S.; LATORRE, S.M.; FERNANDES, W.R.; Solução concentrada de albumina equina na fluidoterapia em equinos com desidratação leve a moderada. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.1, p.30-35, 2008.
- 6 - BIAGINI, S.; ALBIERO, A. **Manual de Transfusão – Fundação Pró-Sangue Hemocentro de São Paulo**. Disponível em: <http://www.prosangue.sp.gov.br/uploads/arquivos/MANUAL%20DE%20TRANSFUS%C3%83O%202018.pdf>. Acesso em 03 Mar. 2022.
- 7 - BLOEM, A. **Verificação da produção de anticorpos específicos em éguas prenhes vacinadas contra Rhodococcus equi e avaliação da transferência passiva destes anticorpos para os potros**. Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
- 8 - BOTTEON, K.D.; **Estruturação e padronização do banco de sangue para felinos no hospital veterinário da Universidade de São Paulo**. Dissertação de Mestrado – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2012.
- 9 - BRADFORD, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72, 248, 1976.
- 10 - BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. **Guia para uso de hemocomponentes**. 2. ed.1. reimpr. p. 29-49. ed. Ministério da saúde, Brasília, 2015.

- 11 - CROXATTO, A., PROD'HOM, G., GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, n.2, p.380-407, 2012.
- 12 - CUNHA NETO, C.A.V. Proteinograma e concentração de imunoglobulina G séricos em potros, do nascimento aos trinta dias de vida, tratados com plasma. **Pesquisa Veterinária Brasileira [online]**. v. 38, n.5, p. 795-805, 2018.
- 13 - DURHAM, A.E. Blood and plasma transfusion in the horse. **Equine Veterinary Education**, v.8, n.1, p.8-12, 1996.
- 14 - ESCODRO, P.B.; BERNARDO, J.O.; ESCODRO, L.O. et al. Plasmaférese automatizada em equino: relato de procedimento. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.19, n.2, 2012.
- 15 - FARRUGIA, A.; EVERS, T.; FALCOU, P-F.; BURNOUF, T.; AMORIM, L.; THOMAS, S. Plasma fractionation issue. **Biologicals**, v. 37, p. 88-93, 2009.
- 16 - FEIGE, K.; EHRAT, F.B.; KÄSTNER, S.B.R.; SCHWARZWALDET, C.C. Automated plasmapheresis compared with other plasma collection methods in the horse. **Journal of Medicine Veterinary. Serie A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, Berlin, v. 50, n. 4, p. 185-189, 2003.
- 17 - FEIGE, K.; EHRAT, F.B.; KÄSTNER, S.B.R.; WAMPFLER, B. The effects of automated plasmapheresis on clinical,haematological, biochemical and coagulation variables in horses. **The Veterinary Journal**, v. 169, p. 102–107, 2005.
- 18 - FELDMAN, B.F.; SINK, C. A. **Consideraciones clínicas en la práctica de la transfusión In: Practical Transfusion Medicine**, Califórnia, 2008.
- 19 - FELLIPE, M.J.B. **Equine clinical immunology**. 1ª edição. Oxford, Wiley Blackwell, cap. 1, p. 8 – 10, 2016.
- 20 - GUIDELINE CORNELL UNIVESITY. Disponível em: <https://www.vet.cornell.edu/animal-health-diagnostic-center/laboratories/comparative-coagulation/clinical-topics/transfusion-guidelines>. Acesso em: 04 FEV 22.
- 21 - GOMES, S.G.R.; Transfusão Sanguínea. In: SANTOS, M. M.; FRAGATA, F. S. **Emergência e Terapia Intensiva Veterinária em Pequenos Animais**. 1ª edição. São Paulo, ROCA, cap. 15, p. 172 – 190, 2008.
- 22 - HAMILTON, R. G. **Human IgG Subclasses**. Asthma and Allergy Center Johns Hopkins University School of Medicine. Baltimore, 2001.
- 23 - JUNQUEIRA, P.C.; ROSENBLIT, J.; HAMERSCHLAK, N. História da Hemoterapia no Brasil. **Revista brasileira hematologia hemoterapia**. vol.27, n.3, p. 201-207, 2005.

- 24 - LACERDA, L.A. Transfusão Sanguínea em Veterinária. In: GONZÁLEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Patologia Clínica Veterinária: texto introdutório**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, P. 57 – 70, 2008.
- 25 - LANEVSCHI, A.; WARDROP, K. Principles of transfusion medicine in small animals. **Canadian Veterinary Journal** v.42, n. 6 p. 447-454, 2001.
- 26 - LENZ, G. **Métodos imunológicos**. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/biofisica/Bio10003/MIMUNO.pdf>. Acesso em 12 Dez 2018.
- 27 - LOPES, P.D. **Anticorpos e Imunoglobulinas: propriedades e estrutura básica da molécula do anticorpo. Principais propriedades físico-químicas e biológicas das moléculas de anticorpo**. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/aula-4--anticorpos-e-imunoglobulinas.pdf>. Acesso em 06 Mar 2018.
- 28 - LUCENA, A,E,S. **Desenvolvimento de uma nova metodologia para produção de solução de imunoglobulina polivalente para uso endovenoso com dupla etapa de inativação viral**. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Pernambuco, 2010.
- 29 - **MANUAL DE HEMOTERAPIA COLSAN**. Disponível em: [https://www.colsan.org.br/site/wp-content/uploads/2020/01/manual\\_hemo\\_7ed.pdf](https://www.colsan.org.br/site/wp-content/uploads/2020/01/manual_hemo_7ed.pdf). Acesso em: 03 Mar. 2022
- 30 - **MANUAL DE ORIETAÇÕES HEMOTERÁPICAS**. Disponível em: <https://www.hemocentro.unicamp.br/arquivos/2018/09/Manual-de-Orientacoes-em-Hemoterapia-2018.pdf>. Acesso em 26 Set 2018.
- 31 - MARQUES Jr., J.F.C.; ROVERI, E.G.; ANDRADE, M.C.; TORRES, I.M.C.; PINTO, M. **Hemaféreses terapêuticas. Hemocentro - UNICAMP**. Aféreses. Disponível em: [www.foruns.unicamp.br/saude/evento12/marques.ppt](http://www.foruns.unicamp.br/saude/evento12/marques.ppt). Acesso: 26 Fev. 2018.
- 31 - MARTINS, S.B. **Medicina transfusional em cães e gatos: colheita, processamento e armazenamento de sangue total e hemocomponentes**. Dissertação de Mestrado – Universidade de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.
- 32 - MARTINI, R.; RODRIGUES, M. A.; SOARES, A. O-E.; Avaliação da detecção de bacteriana em concentrados plaquetários utilizando bacteriológico quantitativo e redução da concentração de glicose e pH. **Saúde (Santa Maria)**, v.36, n.2, p. 29-38, 2010a.
- 33 - MARTINI, R.; HÖRNER, R.; KEMPFER, C. B. et.al. Avaliação do desempenho de culturas convencionais na detecção da contaminação bacteriana em concentrados plaquetários em um Hospital Universitário do sul do Brasil. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.** v. 35(2), 239-244, 2014.



- 34 - MATANA, S.R. **Laboratório de controle de qualidade em hemocomponentes**. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/sangue/capacitacoes/arquivos/7500json-file->. Acesso: 02 Fev. 2022.
- 35 - MELO, J. **Controle de qualidade de hemocomponentes**. I Jornada de profissionais técnicos na saúde do INCA, 2010. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Josenice\\_Mello\\_Controlde\\_qualidade\\_de\\_Hemocomponentes.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/inca/Josenice_Mello_Controlde_qualidade_de_Hemocomponentes.pdf). Acesso em 12 Dez 2018.
- 36 - MEZA, G.M.R. Contaminação bacteriana em concentrado de plaquetas. Dissertação de Pós Graduação. **Academia de Ciência e Tecnologia**. 2018.
- 37 - MUDGE, M.C. Acute hemorrhage and blood transfusion in horses. **Vet Clin Equine**. p. 1-10, 2014.
- 38 - MORRIS, D.D.; Diseases of the hemolymphatic system. In: Reed, S. M. and W. M. Bayly (eds), **Equine Internal Medicine**, p. 598–601. ed. Saunders, Philadelphia, 1998.
- 39 - 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, p.869-873. 2000.
- 40 - PINTO, J.V. **Avaliação da presença de fator XI de coagulação de preparações de Imunoglobulinas G para uso intravenoso**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, 2014.
- 41 - SAMPAIO, D.A.; **Técnico em hemoterapia - Livro texto**. Ministério da Saúde. 7-18, 2013.
- 42 - SANTIAGO, K.B. **Monitoramento da qualidade de hemocomponentes produzidos no Hemocentro da FMB – UNESP**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista, 2011.
- 43 - SARI, I.J.; ARYANTHA, N.P. Screening and Identification of Mushrooms Growth Promoting Bacteria on Straw Mushrooms (*Volvariella volvacea*). **Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology**. v. 6, p. 1-9,2021.
- 44 - SOUZA, T.S.F. **Processamento de hemocomponentes – Validação de processos**. Disponível em: <https://saude.rs.gov.br/upload/arquivos/carga20180606/12150644-thabyta-souza-processamento-de-hemocomponentes-e-validacao-de-processos.pdf>. Acesso em: 03 Mar. 2022.
- 45 - STONEHAM, S. Collection and administration of plasma to a newborn foal. In **Practice**, v.19, n.7, p.384-385, 1997.
- 46 - TANAKA, K.; SAWATANI, E.; SHIGUEOKA, E.M.; DIAS, G.A.; ARASHIRO, F. Avaliação da qualidade de Albumina 20% e Imunoglobulina G 5% produzidas pelo

método de cromatografia líquida, no período de 5 anos. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 63(1),104-110, 2004

47 - TERRA, V.J.B. Transfusão sanguínea em cães e gatos – Revisão. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 23, Ed. 128, Art. 871, 2010.

48 - TEIXEIRA, M.P.; SIMÕES, M.L.M.S.; CORTES, V.F. Prevenção e controle da contaminação bacteriana de hemocomponentes. **Revista de Enfermagem do Centro Oeste Mineiro**. 1(3):377-385, 2011

49 - TOCCI, L. J. Transfusion Medicine in Small Animal Practice. **Vet Clin North Am Small Anim Pract** 40(3):485–494, 2010.

50 - VALENTINI, S.R. **Eletroforese em gel de agarose (analítica e preparativa)** 2016. Disponível em: [http://www.fcfar.unesp.br/laboratorio\\_sandro\\_valentini/pdf/A30-%20ELETROFORESE%20EM%20GEL%20DE%20AGAROSE%20\(analitica%20e%20preparativa\).pdf](http://www.fcfar.unesp.br/laboratorio_sandro_valentini/pdf/A30-%20ELETROFORESE%20EM%20GEL%20DE%20AGAROSE%20(analitica%20e%20preparativa).pdf). Acesso em 12 Jan 2019.

51 - ZISKA, S.M.; SCHUMACHER, J.; DURAM, S.H.; BROCK, K.V. Effects of serial harvest of plasma on total plasma protein and total immunoglobulin G concentrations in donor horses involved in a plasmapheresis program. **AJVR**, Vol 73, No. 6, June 2012.

52 - WILLIAM, W.J.; BEUTHER, E.; ERSLEV, A.J.; LEICHTMAN, M.A.; **Hematology**. 8. ed. Philadelphia: McGraw-Hill, p 2813 – 2859, 2010.

53 - WALTHER-WENKE G, et al. Screening of platelet concentrates for bacterial contamination: spectrum of bacteria detected, proportion of transfused units, and clinical followup. **Ann Hematol**. v. 89(1) p 83-91, 2010.