

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**QUALIDADE HEMATOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE CONCENTRADO
DE PLAQUETAS OBTIDOS DE CÃES**

ADRIANA APARECIDA LOPES DE SOUZA

BOTUCATU, SP

Outubro, 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**QUALIDADE HEMATOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE CONCENTRADO
DE PLAQUETAS OBTIDOS DE CÃES**

ADRIANA APARECIDA LOPES DE SOUZA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de
Botucatu, Unesp, para obtenção do título de
Mestre em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Titular Márcio Garcia Ribeiro

BOTUCATU, SP

Outubro, 2022

Nome da autora: Adriana Aparecida Lopes de Souza

Título: **QUALIDADE HEMATOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS OBTIDOS DE CÃES**

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Titular **Márcio Garcia Ribeiro**

Presidente e Orientador

Departamento de Produção Animal e Medicina Veterinária Preventiva
FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Prof. Dr. **Daniel Moura de Aguiar**

Membro

Laboratório de Virologia e Rickettsioses
Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) - Cuiabá, MT

Profa. Ass. Dra. **Maria Lucia Gomes Lourenço**

Membro

Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ - UNESP, Botucatu, SP

Data da defesa: 27 de outubro de 2022.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Souza, Adriana Aparecida Lopes de.

Qualidade hematológica e microbiológica de concentrado de plaquetas obtidos de cães / Adriana Aparecida Lopes de Souza.
- Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Marcio Garcia Ribeiro
Coorientador: Regina Kiome Takahira
Capes: 50503030

1. Cães. 2. Hemocentros. 3. Plaquetas (Sangue).
4. Hematologia. 5. Microbiologia - Pesquisa.

Palavras-chave: Bolsas de plaquetas em cães;
Hemocomponentes; Hemoterapia em cães; MALDI-TOF MS;
Motilidade swirling.

Dedico este trabalho a todos os meus ancestrais, em especial aos meus pais Maria e Sinvaldo e irmãos Silvana e Sinvaldo Filho, que durante toda a minha trajetória acadêmica foram grandes incentivadores.

A meu orientador Marcio Ribeiro e co-orientadora Regina Takahira, que tornaram este sonho realidade.

AGRADECIMENTOS

Este importante passo em minha carreira profissional, só foi possível por meio de muito trabalho conjunto entre, universidade, pós graduandos, residentes, técnicos e tutores, á todos expresso a minha genuína gratidão.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (FMVZ-Unesp), Câmpus Botucatu, por disponibilizar a infraestrutura e para o desenvolvimento e pesquisa do trabalho.

Ao programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, da FMVZ-Unesp, por proporcionar um curso de alta qualidade, no qual tive a oportunidade de colaborar como representante dos discente no conselho.

Ao meu estimado orientador Prof. Dr. Marcio Garcia Riberio, por toda a acolhida respeitosa desde nosso primeiro contato, sempre me orientando com muita generosidade e compreensão, para mim se tornou um exemplo a ser seguido como docente.

. À querida co-orientadora Prof^a. Dra.Regina K. Takahira, por ser esse grande exemplo de profissional, por toda a oportunidade e confiança desde minha residência no laboratório clínico veterinário.

Aos médicos veterinários residentes do laboratório clínico e moléstias infecciosas, por toda a ajuda com triagem e recrutamento de doadores caninos de sangue.

Aos amigos da pós-graduação, em especial Roberta Basso, Ivaldo Almeida, Beatriz Almeida, Fábio Portilho, André Le Sueur, por todos os momentos de amparo emocional e técnico científico.

Aos técnicos Márcio J. Figueira, Adriana Figueira, Marcos Montanha e Fernando Listoni, por toda a disponibilidade e auxílio durante o processamento das amostras analisadas, aprendi muito com cada um deles e por isto sou muito grata.

Aos funcionários da Secretaria de Pós graduação desta Universidade, em especial Carlos Pazini Junior, pela prontidão e paciência em auxiliar nas duvidas do dia a dia.

A empresa Idexx®, pela parceria em enviar testes rápidos para doenças infecciosas de maneira voluntária, com o único propósito de colaborar com a pesquisa.

Ao laboratório de Pesquisa de Qualidade do Leite (QUALILEITE), do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ - USP/Pirassununga, SP, sob a responsabilidade do Prof. Titular Marcos Veiga, onde foi realizado MALDI-TOF de nossas amostras.

Aos tutores que por amor aos animais, fizeram de seus cães doadores de sangue, com intuito único de ajudar no tratamento de outros animais necessitados deste recuso terapêutico tão precioso, o sangue.

Aos hospitais em que trabalhei durante o mestrado, em especial ao ChromosVet, sem a oportunidade de trabalho flexível, adaptado a minha rotina de estudos, não seria possível realizar este projeto.

A Pedrita Assunção, grande amiga e fonte inesgotável de inspiração, força e resiliência, em momentos de fragilidade e medo, ela sempre estava lá para trazer calma e paz, para mim é grande exemplo de pessoa e profissional, serei sempre grata por sua existência nessa travessia.

A minha família, que sempre foram fonte de acolhimento e incentivo em todos os momentos, muito da força para continuar a travessia veio deles, serei sempre grata a eles.

A Oxalá meu pai e todos meus guias espirituais, que me amparam e me fortalecem em todos os passos de minha vida.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Média e desvio padrão de parâmetros de qualidade hematológica e microbiológica de bolsas de concentrado de plaquetas de 14 cães, segundo tempo de estoque. Botucatu, SP, 2021-2022.27
- Tabela 2.** Comparações múltiplas entre os tempos de estoque para as variáveis significativas no teste de Kruskal Wallis. Botucatu, SP, 2021-2022.28
- Tabela 3.** Controle de qualidade hematológica e microbiológica de bolsas de concentrado de plaquetas de 14 cães, segundo tempo de estoque. Botucatu, SP, 2021-2022.45

LISTA DE FIGURAS

Prancha A.	47
Figura 1. Bolsa de concentrado de plaquetas com presença de hemólise e grande quantidade de e. Botucatu, SP, 2022.	47
Figura 2. Bolsa de concentrado de plaquetas rompida na segunda centrifugação, onde é separado o plasma rico em plaquetas do plasma pobre em plaquetas. Botucatu, SP, 2022.	47

LISTA DE ABREVIATÖES

GV= Glóbulos vermelhos (eritrócitos)

DP = Desvio Padrão

M1 = dia da coleta

M2= 5 dias de estoque

M3 = 10 dias de estoque das bolsas

VND= Valor não disponível

NEG= Negativo

POS= Positivo

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Histórico da medicina transfusional	15
2.1.1 Histórico de banco de sangue veterinário	16
2.1.2 Bancos de sangue veterinários no Brasil	16
2.2 Trombopoiese e considerações sobre trombocitopenia	17
2.3 Hemocomponentes.....	18
2.3.1 Concentrado de plaquetas	18
3. OBJETIVOS	21
3.1 Geral.....	21
3.2 Específicos	21
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Comissão de Ética.....	22
4.2 Animais	22
4.3 Triagem dos doadores de sangue	22
4.4 Concentrado de plaquetas	23
4.4.1 Coleta de sangue e preparo do CP	24
4.4.2 Coleta de amostras das bolsas de CP para análise hematológica e microbiológica	24
4.5 Cultivo bacteriológico das bolsas de CP.....	25
4.6 Cultivo fúngico	25
4.7 Estoque dos isolados	25
4.8 Espectrometria de massas	25
4.9 Análise estatística	26
5. RESULTADOS	27
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÕES	35
8. REFERÊNCIAS.....	36
Anexo 1.....	Erro! Indicador não definido.

SOUZA, A. A. L. **QUALIDADE HEMATOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA DE CONCENTRADO DE PLAQUETAS OBTIDOS DE CÃES**. Botucatu, 2022. 38 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

RESUMO

O uso de hemocomponentes como alternativa ao sangue total nas transfusões sanguíneas, tem se constituído em procedimento valioso na hemoterapia veterinária, incluindo em cães com trombocitopenia, que se caracteriza como alteração hematológica frequente causada pela redução do número de plaquetas no sangue.

Nos casos graves de trombocitopenia em cães (<30 mil plaquetas/mm³), recomenda-se a terapia transfusional com uso do hemocomponente concentrado de plaquetas (CP), produzido a partir da bolsa de sangue total por centrifugação e separação dos hemocomponentes. A bolsa de CP deve ser armazenada em temperatura ambiente (22 e 24°C) por até cinco dias, cuja viabilidade é avaliada, na rotina hematológica, por inspeção visual da motilidade *swirling*, teor de pH, glicose, e contagem de hemácias, leucócitos e plaquetas. Neste cenário, o presente estudo investigou as características físicas, bioquímicas e microbiológicas em 14 bolsas de CP obtidas de cães. Todas as bolsas foram submetidas a avaliação de qualidade baseadas na inspeção visual (*swirling*), mensuração de peso e volume, teores de pH e glicose, contagem total de hemácias, leucócitos e plaquetas, além da hemocultura em condições de aerobiose e anaerobiose. Os micro-organismos isolados foram identificados em nível de espécie por espectrometria de massas. As bolsas foram mantidas por dez dias em temperatura ambiente (22-24°C) e as avaliações de qualidade realizadas em três momentos (M), a saber: no dia da coleta da bolsa (M1), no quinto (M2) e décimo dia (M3) de estocagem. Foi observada redução estatisticamente significativa da motilidade *swirling* (4,79-0,07 $p<0,01$), peso das bolsas (66,7-61,1g $p<0,02$) e do volume (64,4-59,0 mL $p<0,02$), bem como decréscimo dos teores de pH (7,46 - 6,96) e glicose (2,71-2,5 mg/dL), e da contagem de plaquetas (190,7-142,9 plaquetas 10³ células/μL) ao longo dos dez dias de estoque das bolsas. Em contraste, ao longo do período de estoque, ocorreu o aumento da contagem total de leucócitos (0,23-0,27 leucócitos 10³ células/μL), enquanto a contagem de eritrócitos (0,028 - 0,024 eritrócitos 10⁶ células/μL) manteve-se equivalente. Em uma (1/14=7,1%) bolsa foram isolados, em associação, *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus luteus* nos momentos M2 e M3. Infere-se a redução significativa da motilidade *swirling*, peso e volume das bolsas, bem como alterações da maioria dos parâmetros de qualidade hematológica avaliados nas bolsas ao longo dos dez dias de acompanhamento, incluindo o isolamento microbiano em uma das bolsas. Infere-se melhor viabilidade do CP em até cinco dias de estoque, em temperatura ambiente, bem como a necessidade de rigorosas práticas de biossegurança na produção deste hemocomponente, visando o uso na rotina da hemoterapia de cães trombocitopênicos.

Palavras-chave: hemoterapia em cães, bolsas de plaquetas em cães, hemocomponentes, motilidade *swirling*, MALDI-TOF MS.

SOUZA, A. A. L **HEMATOLOGICAL QUALITY OF PLATELET CONCENTRATE OBTAINED FROM DOGS**. Botucatu, 2022. 38 p. Dissertação, (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP.

ABSTRACT

The use of blood components as an alternative to whole blood in canine blood transfusions has become a valuable procedure in veterinary hemotherapy, including in dogs with thrombocytopenia, which is characterized as a frequent hematological abnormality caused by the reduction in the number of platelets. In severe cases of canine thrombocytopenia ($<30,000$ platelets/ mm^3), transfusion therapy is recommended using a platelet concentrated blood component (PC), produced from the bag of whole blood through centrifugation and separation of the blood compounds. The platelet concentrate bag should be stored at room temperature (22 and 24°C) for up to five days. Its viability is evaluated in the hematological routine by visual inspection of swirling motility, pH and glucose levels, and leukocyte, red blood cell, and platelet counts. In this scenario, the present study investigated the physical, biochemical, and microbiological characteristics of 14 PC bags obtained from dogs. All bags used were submitted to a hematological quality assessment based on visual inspection (swirling), weight and volume measurement, pH and glucose levels, total erythrocyte, leukocyte, and platelet count, as well as microbiological culture under aerobic and anaerobic conditions. The isolated microorganisms were identified at the species level by mass spectrometry. All bags were kept for ten days at room temperature (22-24°C) and quality parameters were evaluated in three moments (M), as follows: on the first day of bag collection (M1), on the fifth (M2), and tenth day (M3) of storage. A statistical decrease in swirling motility (4.79-0.07 $p<0.01$), weight (66.7-61.1 g $p<0.02$) and volume (64.4-59.0 mL $p<0.02$), as well as reduction of pH (7.46-6.96) and glucose (2.71- 2.5 mg/dL) levels, and blood platelets count (190.7-142.9 platelets 10^3 cells/ μL) were observed in bags over the ten days of storage. In contrast, the total leukocyte counts increased (0.23-0.27 leukocytes 10^3 cells/ μL), while erythrocytes count (0.028-0.024 erythrocytes 10^6 cells/ μL) remains unremarkable. In one (1/14=7.1%) bag, *Staphylococcus epidermidis* and *Micrococcus luteus* were isolated associated in M2 and M3. Overall, a statistically significant reduction in swirling motility, weight and volume of bags was seen, as well as alterations of other hematological quality parameters studied in bags over ten days of storage, including microbial isolation in a bag. These findings highlighting the better viability of the PC until five days of storage at room temperature, and the need for rigorous biosafety practices in the production of this blood component, aiming the routine use in the hemotherapy of thrombocytopenic dogs.

Keywords: canine hemotherapy, canine bags of platelet, hemocompounds, swirling motility, MALDI-TOF MS.

1 1 INTRODUÇÃO

2 O uso de hemocomponentes em substituição ao sangue total nas transfusões
3 sanguíneas tem se constituído em procedimento valioso na hemoterapia de cães nas
4 últimas décadas (FLORES, 2008), posto que os hemocomponentes minimizam reações
5 adversas transfusionais e evitam a sobrecarga volêmica (VERRASTRO et al., 1996).

6 Os hemocomponentes podem ser definidos como frações do sangue total
7 obtidas após o fracionamento da bolsa de sangue, por centrifugação ou aférese, que
8 possibilitam selecionar grupo celulares de interesse terapêutico (SCHNEIDER ANN,
9 1995). O concentrado de hemácias, plasma e plaquetas são exemplos de
10 hemocomponentes utilizados na prática da hemoterapia veterinária, recomendados em
11 diferentes condições de hemorragias, processos imunomediados e infecções por certos
12 micro-organismos (HESS et al., 2000; CANCELAS et al., 2015; MALLHI et al., 2015).

13 Os hemocomponentes apresentam particularidades quanto ao método de
14 obtenção (RAZOUK et al., 2004) e conservação das bolsas, que influenciam diretamente
15 na viabilidade principalmente no que tange a temperatura de armazenamento
16 (CANCELAS et al., 2015; GREEN et al., 2018). Neste quesito, enquanto o concentrado
17 de hemácias apresenta viabilidade média de 42 dias, entre 2 e 4°C (HESS et al., 2000;
18 CANCELAS et al., 2015), o plasma sanguíneo pode ser congelado a baixas
19 temperaturas (-25°C) e, nestas condições, pode ser armazenado por até três anos
20 (GREEN et al., 2018). Em contraste, o concentrado de plaquetas, obtido por dupla
21 centrifugação de bolsas de sangue total por *buffy coat* ou aférese (HOAREAU et al.,
22 2014; MALLHI et al., 2015), é considerado viável na rotina hematológica veterinária por,
23 no máximo, cinco dias (TOSTES et al., 2008), fato que, por vezes, limita a produção
24 deste hemocomponente na maioria dos laboratórios clínicos veterinários.

25 O concentrado de plaquetas (CP) tem sido recomendado na hemoterapia de
26 cães com trombocitopenia grave (<30 mil plaquetas/mm³). O uso do CP previne
27 sangramentos acentuados, que podem colocar em risco a vida do animal (ABRAMS,
28 2003). Em cães, a trombocitopenia grave pode se manifestar sob a forma de
29 sangramentos espontâneos em mucosas, após processos traumáticos vasculares,
30 epistaxe e hematúria (STOCKHAM, 2008). A trombocitopenia em cães pode ser
31 causada por alterações do estado fisiológico dos animais, processos inflamatórios,
32 imunomediados ou infecções por determinados patógenos (STOCKHAM; SCOTT,
33 2008).

34 Na rotina hematológica veterinária, o CP é obtido a partir da bolsa de sangue
35 total por centrifugação e separação das hemácias, *buffy-coat* e plasma rico em
36 plaquetas (PRP). A viabilidade do PRP é avaliada por inspeção visual da motilidade
37 *swirling*, mensuração do peso e volume da bolsa, teores de pH e glicose, e contagem
38 total de leucócitos, hemácias e plaquetas (POPESCU et al., 2021).

39 A produção de hemocomponentes com ausência de contaminação microbiana é
40 crucial na medicina transfusional (JACOBS et al., 2001). Tal preocupação é maximizada
41 na produção das bolsas de CP, pois este hemocomponente permanece armazenado
42 em temperatura ambiente, visando manter a qualidade hematológica e função
43 hemostática (ANDERSON et al., 1986). O CP é rico em nutrientes e acondicionado em
44 bolsa permeável ao oxigênio. Ainda, a presença de glicose na solução conservante pode
45 servir como substrato para a multiplicação de micro-organismos (JACOBS et al., 2008).
46 Com efeito, a produção de bolsas de CP na rotina hematológica veterinária, sem a
47 adição de inibidores de multiplicação de micro-organismos (PERROTTA et al., 1999;
48 LIU et al., 2020), e a manutenção em temperatura ambiente, por até cinco dias, exigem
49 cuidados rigorosos de biossegurança para evitar a contaminação e multiplicação
50 bacteriana nas bolsas.

51 Posto a necessidade de equipamentos apropriados para a produção e
52 manutenção das bolsas de CP, a necessidade de rigorosas medidas de biossegurança
53 para a produção desta fração sanguínea, bem como a viabilidade reduzida das bolsas
54 em temperatura ambiente (cinco dias), número reduzido de laboratórios clínicos
55 veterinários produzem este hemocomponente (RAZOUK et al., 2004; TOSTES et al.,
56 2008; HOAREAU et al., 2014; MALLHI et al., 2015). Neste cenário, o presente estudo
57 investigou a qualidade hematológica e microbiológica de bolsas de CP obtidas de cães,
58 avaliadas por dez dias após a produção do hemocomponente.

59

60 **2. REVISÃO DE LITERATURA**

61 **2.1 Histórico da medicina transfusional**

62 A prática de transfusão sanguínea, com o intuito de reestabelecer a vitalidade de
63 pacientes em estado crítico, tem o primeiro relato datado de 1492, quando foi realizada,
64 sem sucesso, a transfusão de sangue total (GREENWALT, 1997). As primeiras
65 transfusões de sangue com o uso de animais remontam ao século XVII, mais
66 precisamente em 1665, realizadas pelo médico britânico, Richard Lower, em Oxford
67 (PURVER, 2013).

68 Inúmeras tentativas foram praticadas para se atingir sucesso nas transfusões
69 sanguíneas utilizando sangue total. Somente no século XX, mudanças tecnológicas
70 foram incorporadas à hemoterapia, com o reconhecimento da necessidade da escolha
71 do doador ideal, do uso de anticoagulantes e de técnicas de esterilização (LACERDA,
72 2005).

73 Registros mais recentes dividem a história da transfusão sanguínea em fases
74 denominadas pré e científica. A fase pré-científica corresponde as práticas realizadas
75 antes 1900, enquanto a fase científica após 1900. Ainda, de maneira empírica, em 1900
76 utilizou-se sangue animal para tratamento humano, denominada xenotransfusão. Na
77 oportunidade, o paciente foi submetido a três procedimentos, mas evoluiu para óbito
78 (GINGERICH, 1986).

79 Em dias atuais, as transfusões sanguíneas em animais têm se tornado práticas
80 seguras, em virtude do estabelecimento de normas pré-transfusionais de triagem para
81 os animais doadores e biossegurança na produção das bolsas (TOCCI; EWING, 2009).
82

83 **2.1.1 Histórico de banco de sangue veterinário**

84 Os primeiros bancos de sangue a serviço exclusivo da medicina veterinária, com
85 intuito de produzir hemocomponentes específicos para as diferentes condições clínicas
86 de animais de companhia, foram idealizados na década de 1980, nos Estados Unidos
87 (EUA), na cidade de Kansas. Posteriormente, em 1988, foi criado o primeiro grande
88 banco de sangue comercial (Animal Blood Bank) também nos EUA, na cidade de Dixon,
89 que permanece como o banco de sangue veterinário de referência, no que tange a
90 qualidade e o pioneirismo em nível mundial (JERICÓ, 2015).

91 **2.1.2 Bancos de sangue veterinários no Brasil**

92 No estado do Paraná, em 1998, foi implementado banco de sangue para animais
93 de companhia na Universidade Estadual de Londrina, com objetivo de oferecer
94 hemocomponentes para o tratamento de animais de cães e gatos com distúrbios
95 hematológicos (JERICÓ, 2015). Em 2009, a Faculdade de Medicina Veterinária e
96 Zootecnia da UNESP/Botucatu, SP, inaugurou o banco de sangue canino, que atende
97 o hospital veterinário da UNESP e clínicas da região de Botucatu (TAKAHIRA et al.,
98 2015).

99 O número de animais de companhia no Brasil vem aumentando
100 significativamente. Em 2018, a população de cães e gatos no país foi estimada em 54,2
101 e 23,9 milhões respectivamente (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística-IBGE,
102 2018), representando a terceira maior população mundial de animais de companhia

103 (Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação - ABINPET,
104 2019), embora especule-se que a população efetiva de cães e gatos no Brasil supere
105 120 milhões, que incluiria os animais errantes ou não domiciliados. Paralelamente, o
106 número de atendimentos veterinários no Brasil vem apresentando aumento de 23,5%
107 ao ano no ramo de *pet care* (ABINPET, 2019). Com efeito, a demanda por transfusões
108 sanguíneas e o uso de hemocomponentes tem aumentando significativamente,
109 justificando a importância do estabelecimento de bancos de sangue como medida
110 crucial na prática da medicina veterinária (CHIARAMONTE, 2004).

111

112 **2.2 Trombopoiese e considerações sobre trombocitopenia**

113 A trombopoiese é o mecanismo fisiológico de produção das plaquetas, que se
114 representam as principais células envolvidas na hemostasia primária dos animais. São
115 constituídas por fragmento citoplasmático da célula precursora, o megacariócito,
116 oriundo das células-tronco hematopoiéticas pluripotentes (THRALL, 2015).

117 Os megacariócitos são produzidos principalmente na medula óssea dos animais,
118 assim como em sítios hematopoiéticos, como o baço. A produção é estimulada pelo
119 hormônio trombopoietina. Cada megacariócito é capaz de gerar até três mil plaquetas
120 (KAUSHANSKI, 2005). Após a produção e maturação, as plaquetas alcançam a corrente
121 sanguínea por vasos sinusóides (JAIN, 1993).

122 A trombocitopenia em animais e humanos é caracterizada pela redução total da
123 contagem de plaquetas, avaliada na rotina hematológica pelo hemograma. Nem sempre
124 esta redução do número de plaquetas é indicativa de doença, posto que nas raças
125 *Greyhound* e *Shiba Inu*, é esperada contagem celular inferior ao valor de referência
126 utilizado para cães (VASCONCELOS et al., 2003).

127 Entre as causas de trombocitopenia, merecem destaque a redução na produção
128 do megacariócito (célula precursora da medula), destruição das plaquetas maduras em
129 nível periférico ou medular, consumo em casos de sangramento, sequestro ou
130 encarceramento esplênico e, ainda, falsa trombocitopenia (DONATO, 2021).

131 Entre os sinais clínicos mais comuns em cães com trombocitopenia, são
132 observadas petéquias e equimoses, sangramento de mucosas (epistaxe e
133 sangramentos gastrintestinais que geram hematoquezia ou melena), hematúria, hifema
134 e sangramentos prolongados secundários a traumatismos (STOCKHAM; SCOTT,
135 2008).

136 Em virtude do incremento da demanda de transfusões e do uso de
137 hemocomponentes como o concentrado de plaquetas nas diferentes anormalidades

138 hematológicas em cães, deve-se considerar o aumento da preocupação com as
139 condições de biossegurança na produção e armazenagem deste hemocomponente
140 (FLORES, 2008).

141

142 **2.3 Hemocomponentes**

143 Os hemocomponentes podem ser definidos como frações do sangue total
144 obtidos após o fracionamento da bolsa de sangue, por centrifugação ou aférese, que
145 possibilitam selecionar grupo celulares de interesse terapêutico (ANDREU, 2015). O uso
146 de hemocomponentes como alternativa ao sangue total nas transfusões sanguíneas
147 tem se constituído em procedimento crucial na hemoterapia de cães (FLORES, 2008),
148 posto que os hemocomponentes minimizam reações adversas transfusionais e evitam
149 a sobrecarga volêmica (VERRASTRO et al., 1996).

150 O concentrado de hemácias, plasma e plaquetas são exemplos de
151 hemocomponentes utilizados na prática da hemoterapia veterinária, recomendados em
152 diferentes condições de hemorragias, processos imunomediados e infecções por certos
153 micro-organismos (HESS et al., 2000; CANCELAS et al., 2015; MALLHI et al., 2015).

154

155 **2.3.1 Concentrado de plaquetas**

156 O concentrado de plaquetas (CP) caracteriza-se como hemocomponente
157 indicado na terapia de cães com trombocitopenia grave, com sinais de sangramentos
158 acentuados, que colocam em risco a vida do animal (ABRAMS, 2003), como
159 sangramentos espontâneos em mucosas, após traumas vasculares, epistaxe e
160 hematúria. Em cães, a trombocitopenia tem sido relacionada às alterações do estado
161 fisiológico dos animais, processos inflamatórios, imunomediados (STOCKHAM, 2008)
162 ou infecções por certos patógenos, incluindo espécies de *Ehrlichia* (AGUIAR et al.,
163 2019) e *Anaplasma* (GAUNT et al., 2010).

164 O CP é obtido a partir da bolsa de sangue total por centrifugação e separação
165 das hemácias, *buffy-coat* e plasma rico em plaquetas (PRP). A viabilidade do PRP é
166 avaliada na rotina dos laboratórios clínicos veterinários com base na inspeção visual da
167 motilidade *swirling*, teores de pH e glicose, além da contagem total de leucócitos,
168 hemácias e plaquetas (POPESCU et al., 2021)

169 A produção deste hemocomponente apresenta alto risco de contaminação
170 microbiana, devido a peculiaridade de acondicionamento em bolsa permeável ao

171 oxigênio e a presença de glicose na solução conservante, que serve como substrato
172 para a multiplicação de micro-organismos (JACOBS et al., 2008).

173 Os pontos críticos de risco de contaminação ocorrem no ato da coleta de sangue,
174 particularmente no procedimento de antissepsia da pele do doador que, se não realizado
175 de modo rigoroso, pode carrear bactérias da microbiota da epiderme do animal para a
176 bolsa de sangue total, que dará origem a bolsa de CP. Ainda, menos frequentemente,
177 a contaminação pode ocorrer durante o processamento laboratorial do
178 hemocomponente ou em doadores em estado de bacteremia (BLAJCHMAN et al.,
179 2005).

180

181 **2.3.1.1 Armazenamento do concentrado de plaquetas**

182 Os cuidados com a preparação da bolsa de CP incluem desde a escolha dos
183 doadores, antissepsia da coleta, técnica de concentração das plaquetas, controle
184 térmico e de componentes hematológicos, manutenção dos equipamentos para a
185 produção das bolsas, e treinamento de pessoal apto a preparação das bolsas
186 (LICHTENBERGER, 2004).

187 As alterações da qualidade hematológica relacionadas ao armazenamento das
188 bolsas estão relacionadas a modificações bioquímicas, estruturais e funcionais dos
189 componentes sanguíneos, que incluem danos estruturais na conformação da plaqueta,
190 e a ativação e liberação de componentes bioquímicos (KICKLER, 2006).

191 Devido as características de funcionalidade plaquetária, a bolsa de CP deve ser
192 armazenada em temperatura entre 22°C e 24°C. Mudanças neste intervalo de
193 temperatura de armazenamento podem determinar o aumento da glicólise e,
194 conseqüentemente, elevações do teor de lactato, diminuindo o pH da bolsa. A função
195 plaquetária no CP. pode ser comprometida devido ao estresse hipotônico, que acarreta
196 agregação plaquetária, devido a formação de trifosfato de adenosina (NG et al., 2018).
197 Ainda, as plaquetas armazenadas podem sofrer agregação e perda do formato original,
198 tornando-se esféricas e apresentando pseudópodes. Estas alterações morfológicas
199 podem comprometer o complexo da glicoproteína GPIIb/IIIa, expondo os sítios de
200 ligação de proteínas adesivas, *i.e.*, fibrinogênio e fator de Von Willebrand, gerando
201 comprometimento de viabilidade hemostática devido a agregação plaquetária (MITTAL,
202 2015).

203 A apoptose plaquetária também é observada com certa frequência nas bolsas
204 armazenadas de CP. As mitocôndrias e as enzimas caspases presentes nas plaquetas
205 são responsáveis pelo controle da morte celular programada, particularmente as

206 caspases 3 e 7. Ainda, a alta concentração de dióxido de carbono presente na bolsa de
207 CP contribui para a diminuição do pH do meio (SANDGREN, 2012).

208

209 **2.3.1.2 Contaminações em concentrados de plaquetas**

210 As bolsas de CP são susceptíveis a contaminação bacterina, principalmente
211 devido ao armazenamento em temperatura ambiente em bolsas permeáveis ao
212 oxigênio. Ainda, o plasma sanguíneo é rico em nutrientes, e a solução conservante
213 contém glicose, que podem favorecer a multiplicação bacteriana (THRALL, 2007).

214 Os principais micro-organismos identificados em contaminações de CP são
215 cocos gram-positivos, incluindo *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*,
216 estreptococos (*Streptococcus bovis*), *Propionibacterium* sp., *Bacillus cereus* e certas
217 bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) e enterobactérias (*Serratia*
218 *marcescens*) (MOHR, 2006; JACOBS *et al.*, 2008). Os relatos de contaminação
219 bacterina em CP referem, predominantemente, bactérias com origem na microbiota da
220 pele, conjuntiva, mucosas e anexos, como estafilococos e estreptococos (MOHR, 2006).
221 No entanto, há registros de contaminação bacteriana de CP por bactérias não
222 pertencentes a microbiota cutânea, como *Serratia marcescens* (DIAMANDAS, 2020) e
223 *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (JONES *et al.*, 2018).

224 A transfusão de hemocomponente como o CP contaminado por bactérias
225 patogênicas pode causar toxi-infecções, bacteremia e/ou choque séptico,
226 ocasionalmente com evolução fatal (LEVY *et al.*, 2018). Devido a necessidade de
227 equipamentos apropriados para a produção e manutenção das bolsas de CP, bem como
228 a viabilidade reduzida deste hemocomponente (cinco dias) (RAZOUK *et al.*, 2004;
229 TOSTES *et al.*, 2008; HOAREAU *et al.*, 2014; MALLHI *et al.*, 2015), número reduzido de
230 laboratórios clínicos veterinários estão aptos a produzir este hemocomponente. Com
231 efeito, poucos estudos estão disponíveis visando avaliar a qualidade hematológica e a
232 ausência de contaminação microbiana em CP produzidos para uso em cães,
233 particularmente no Brasil.

234 Considerando a elevada população de cães, particularmente no Brasil, a
235 necessidade de uso de hemocomponentes em cães com trombocitopenia achado
236 hematológico frequente na espécie, e o reduzido número de laboratórios clínicos
237 veterinários no Brasil aptos a produzir concentrados de plaquetas, posto a necessidade
238 de equipamentos e pessoal especializado, bem como os riscos de contaminação das
239 bolsas; o presente estudo investigou a qualidade hematológica e microbiológica de
240 bolsas de CP produzidas na rotina de laboratório clínico veterinário no Brasil.

241

242 **3. OBJETIVOS**

243

244 **3.1 Geral**

245

246 Investigar indicadores de qualidade hematológica e microbiológica em bolsas de
247 concentrado de plaquetas de cães.

248

249 **3.2 Específicos**

250

251

252 ✓ Avaliar a motilidade *swirling*, teores de pH e glicose, contagem total de
253 leucócitos, hemácias e plaquetas no controle hematológico em bolsas de concentrado
254 de plaquetas de cães, no momento de preparação (dia zero), e com cinco e dez dias de
255 estoque das bolsas;

256

257 ✓ Investigar a presença de contaminantes de origem bacteriana e fúngica
258 no concentrado de plaquetas no momento de preparação (dia zero), cinco e dez dias de
259 estoque das bolsas, com detecção das espécies dos micro-organismos utilizando a
260 espectrometria de massas;

261

262

263 4. MATERIAL E MÉTODOS

264 4.1 Comissão de Ética

265 O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Uso de Animais
266 (CEUA) da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP), sob número 076/2020.

267 4.2 Animais

268 Foram utilizados, por conveniência, 14 cães hípidos candidatos a doadores de
269 sangue (e preparo de CP), encaminhados ao Banco de Sangue Canino do Laboratório
270 de Patologia Clínica Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
271 UNESP/Botucatu, SP, entre junho de 2020 e agosto de 2022.

272 Como critérios de inclusão, os cães elegíveis para o estudo deveriam apresentar
273 os seguintes quesitos: 1) idade variando entre 1 e 8 anos, 2) peso mínimo de 25 Kg (não
274 obesos), 3) protocolos de vacinação e vermifugação adequados, 4) controle de
275 ectoparasitas realizado nos últimos seis meses, 5) sem histórico de intervenção cirúrgica
276 há pelo menos um ano, 6) histórico de doador de sangue, com realização de
277 hemograma antes das coletas de sangue, 7) perfil bioquímico (dosagens de ureia,
278 creatinina, FA, ALT, GGT, proteína séria e albumina) com valores normais para a
279 espécie, 8) não reagente para o perfil de certas doenças infecciosas de cães
280 (leishmaniose, erliquiose, anaplasiose, dirofilariose e doença de Lyme) utilizando *kit*
281 rápido comercial, 9) ausência de qualquer sinal clínico no momento da coleta.

282 Os critérios de exclusão aplicados no estudo, foram determinados seguindo as
283 diretrizes de boas práticas em banco de sangue, estabelecidos pela ANVISA (agência
284 nacional de vigilância sanitária), sendo eles, descarte de bolsa com volume inferior ao
285 recomendado pelo fabricante, tempo de coleta superior a 12 minutos, plasma lipêmico
286 ou hemolisado, coleta com fluxo interrompido, presença de micro coágulos na bolsa de
287 sangue total, bolsas que tiveram o sistema aberto (onde ocorreu a entrada de ar na
288 bolsa) por defeito de fabricação.

289 4.3 Triagem dos doadores de sangue

290 A triagem laboratorial dos doadores compreendeu a realização de hemograma
291 completo, perfil bioquímico e teste rápido para doenças infecciosas.

292 As amostras sanguíneas utilizadas para a análise laboratorial foram coletadas,
293 em duplicata, por venopunção da veia cefálica, após rigorosa antissepsia local. Uma
294 das amostras foi acondicionada em tubo contendo EDTA para o hemograma e a outra

295 em tubo com gel ativador de coágulo, para o perfil bioquímico (BD Vacutainer™, Juiz de
296 Fora, MG, Brasil).

297 O hemograma foi realizado utilizando analisador hematológico, de acordo com
298 as recomendações do fabricante (Nihon Kohden™, MEK 6500 J/K, São Caetano do Sul,
299 SP, Brasil). Os valores emitidos pelo equipamento foram confirmados mediante a
300 realização e interpretação de esfregaços sanguíneos em lâminas de, utilizando as
301 mesmas amostras sanguíneas submetidas ao analisador hematológico.

302 O hematócrito e a dosagem de proteína total plasmática foram realizados pela
303 técnica de rotação de microhematócrito e refratometria, utilizando centrífuga de
304 microhematócrito (Centurion Scientific™, BRK5505, Chichester, West Sussex,
305 Inglaterra), com tempo de cinco minutos a velocidade de 2.100 rotações por minuto

306 Para a quantificação da proteína total plasmática foi utilizado refratômetro óptico
307 portátil, conforme as recomendações do fabricante (Electron Machine Corporation™,
308 RHC-200 ATC, Umatilla, Flórida, Estados Unidos).

309 As análises bioquímicas foram realizadas por automação utilizando o analisador
310 bioquímico, de acordo com as recomendações do fabricante (Mindray™, BS-200E,
311 Nanshan, Shenzhen, China).

312 Os testes rápidos foram realizados utilizando *kit* comercial (SNAP™, IDEXX, 4DX,
313 Westbrook, Maine, EUA), conforme as recomendações do fabricante, para detecção de
314 antígenos de *Dirofilaria immitis*, e anticorpos para *Anaplasma phagocytophilum*,
315 *Anaplasma platys*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis* e *Ehrlichia ewingii*. Para a
316 pesquisa de anticorpos contra *Leishmania sp.* foi utilizado o *kit* comercial (SNAP™,
317 IDEXX, Westbrook, Maine, EUA), com base nas recomendações do fabricante.

318 **4.4 Concentrado de plaquetas**

319 Todos os cães amostrados no presente estudo, visando a colheita de sangue e
320 produção de bolsas de CP, foram provenientes de doadores encaminhados ao Banco
321 de Sangue Canino, do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária, do Departamento
322 de Clínica Veterinária, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
323 UNESP/Botucatu, SP, sob a responsabilidade da Profa. Titular Regina Kiomi Takahira.

324 Todas as bolsas de CP foram submetidas a análise de parâmetros de qualidade
325 hematológica de mensuração de peso e volume, determinação de teores de pH,
326 dosagem de glicose, e contagem automática do número total de leucócitos, hemácias e
327 plaquetas, no laboratório supracitado. Ainda, todas as bolsas foram submetidas,
328 simultaneamente, ao cultivo microbiológico.

329 O controle dos parâmetros hematológicos e microbiológicos foram realizados em
330 três momentos (M): no primeiro dia da coleta das bolsas (M0), no quinto (M5) e décimo
331 dia (M10) de estocagem.

332

333 **4.4.1 Coleta de sangue e preparo do CP**

334 A coleta de sangue foi realizada por venopunção jugular, com o tempo decorrido
335 entre o início e o final da coleta não ultrapassando 12 minutos. Foi realizada ampla
336 tricotomia e antissepsia rigorosa da região da coleta (pescoço), utilizando solução de
337 álcool (70%) e Iodo Povidine PVPI (1%). Todas as coletas e produção do CP foram
338 realizadas no Banco de Sangue Canino da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

339 A bolsa de sangue utilizada foi do tipo tripla, CPDA-1 (citrato de sódio, fosfato,
340 dextrose, adenina). Após a coleta, a bolsa de sangue foi submetida a centrifugação
341 utilizando centrifuga de mesa (Hettich™, Rotanta 460/460R, Kirchlengern, Herford,
342 Alemanha). A centrifugação inicial foi realizada a de 1.000g durante 8 minutos e 30
343 segundos, em temperatura entre 22°C e 24°C, visando separar o concentrado de
344 hemácias do plasma rico em plaquetas (PRP). Em seguida, outra centrifugação foi
345 realizada a 2.000g por 11 minutos, a temperatura entre 22°C e 24°C, com a finalidade
346 de separar o CP do plasma pobre em plaquetas. O CP foi armazenado na bolsa própria
347 para plaquetas e permaneceu em repouso por 1 hora, mantido em constante agitação
348 por dez dias, em ambiente climatizado a 22°C (LASTA et al., 2020).

349 No tocante a bolsa de concentrado de hemácias, foi utilizado apenas o manguito
350 para análise microbiológica, enquanto a bolsa utilizada no estudo foi destinada ao uso
351 da rotina de hemoterapia do Banco de Sangue Canino da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP.

352 Bolsas com tempo de coleta superior a 12 minutos, fluxo sanguíneo lento ou
353 interrompido durante a coleta, ou presença de plasma lipêmico ou hemolisado, foram
354 excluídas do estudo.

355 Exceto o conteúdo das bolsas de CP, o restante do conteúdo sanguíneo das
356 bolsas totais foi aproveitado na rotina de transfusões do Banco de Sangue Canino do
357 Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ.

358

359 **4.4.2 Coleta de amostras das bolsas de CP para análise hematológica e** 360 **microbiológica**

361 Foram colhidas, assepticamente, das bolsas de CP nos momentos M1, M2 e M3,
362 três amostras com volume entre 1 e 3 mL. A primeira amostra foi encaminhada ao
363 laboratório clínico da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP, para a mensuração dos teores de

364 glicose e pH, e contagem de leucócitos, hemácias e plaquetas. A segunda amostra foi
365 destinada ao cultivo microbiológico.

366 **4.5 Cultivo bacteriológico das bolsas de CP**

367 Amostras do conteúdo de todas as bolsas foram colhidas nos momentos M1, M2
368 e M3, e semeadas em condições de aerobiose em ágar (Oxoid™, Basingstoke, UK)
369 suplementado com sangue bovino (5%) e no meio seletivo de MacConkey (Oxoid™,
370 Basingstoke, UK), ambos mantidos por 72 horas, a 37°C, avaliados a cada 24 horas,
371 por 72 horas. Simultaneamente, a mesma amostra foi cultivada no caldo enriquecido
372 Brain Heart Infusion - BHI (Oxoid™, Basingstoke, UK), mantido nas mesmas condições
373 supracitadas. Na presença de turvação do BHI, mantido por até 72 horas, uma alça de
374 platina foi recultivada em ágar sangue e MacConkey, nas mesmas condições
375 supracitadas. Ainda, as amostras de todas as bolsas foram cultivadas em ágar
376 suplementado com sangue bovino (5%) e mantidas a 37°C, por cinco dias, em
377 condições de anaerobiose (Anaerogen™, Oxoid, Basingstoke, UK) (QUINN et al., 2011).

378 **4.6 Cultivo fúngico**

379 Simultaneamente ao cultivo bacteriológico, uma alíquota de todas as amostras
380 nos momentos M0, M5 e M10 foram semeadas em meio de Sabouraud (Oxoid®, São
381 Paulo, SP), em condições de aerobiose a 37°C, mantidas em incubação por 120 horas
382 (QUINN et al., 2011).

383 **4.7 Estoque dos isolados**

384 Colônias bacterianas e leveduras isoladas no meio de ágar sangue, MacConkey
385 ou Sabouraud, foram estocadas em temperatura ambiente (25°C) em tubos contendo
386 meio de Lignières e encaminhadas para o diagnóstico em nível de espécies por
387 espectrometria de massas.

388 **4.8 Espectrometria de massas**

389 Isolados de origem bacteriana e leveduras foram submetidos à espectrometria
390 de massas pela técnica de *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*
391 *Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS), no laboratório de Pesquisa de Qualidade do Leite
392 (QUALILEITE), do Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ -
393 USP/Pirassununga, SP, sob a responsabilidade do Prof. Titular Marcos Veiga.

394 Brevemente, três a quatro colônias recém isoladas (24 a 48h) em ágar sangue
395 (bactérias) ou Sabouraud (leveduras) foram submetidas à extração com 20-40µL de

396 ácido fórmico (70%) e centrifugadas, visando a lise bacteriana e liberação de proteínas
397 (predominantemente de origem ribossomal) e formação de íons, necessários para a
398 formação dos espectros bacterianos. Cerca de 15 minutos depois, foi adicionado em
399 cada amostra 20-40µL de acetomil (100% P.A.), na mesma proporção do ácido fórmico,
400 (1:1) e o material centrifugado. Em seguida, 1µL da solução de cada amostra foi
401 adicionada em placas específicas contendo 96 orifícios (Bruker e Daltonics™, Bremen,
402 Alemanha) e mantidas por cerca de 20 minutos para secar em temperatura ambiente.
403 Em seguida, os orifícios com as amostras secas foram recobertos com 1µL de solução
404 matriz (ácido 2-ciano-4-hidroxicinâmico diluído a 50% de acetomil e 2,5% de ácido
405 trifluoracético). As placas foram dispostas no receptáculo do equipamento Bruker e
406 Daltonics™ (Bremen, Alemanha), operado com 337-nm de laser. Os dados dos
407 espectros foram analisados entre 2.000-20.000m/z, usando o software FlexControl 3.3.
408 A caracterização em nível de gênero e espécie dos isolados foi considerada para
409 espectros ≥ 1.7 e ≥ 2.0 , respectivamente (BARREIRO et al., 2010; GONÇALVES et al.,
410 2014).

411 **4.9 Análise estatística**

412 Foram utilizadas como variáveis para a análise estatística os parâmetros peso,
413 volume, teor de pH, teor de glicose, motilidade *swirling*, e contagem de plaquetas,
414 leucócitos e hemácias, e isolamento microbiano, das bolsas de CP, nos momentos M0,
415 M5 e M10. Os dados foram analisados utilizando recursos do programa estatístico SAS
416 versão 9.3. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov,
417 como critério de decisão para uso de testes não- paramétricos.

418 Dados não paramétricos foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando
419 o procedimento Npar1way (SAS 9.3). para comparação dos valores obtidos de cada um
420 dos parâmetros supracitados, ao longo dos três momentos de estoque das bolsas de
421 CP. Os resultados foram considerados significativos para valores de $p < 0,05$ aplicando-
422 se, se necessário, o teste post-hoc de Dunn para comparações múltiplas utilizando o
423 pacote "Dunn.test" (Programa R).

424

425 5. RESULTADOS

426

427 Ao longo do estudo, foram encaminhados 71 cães potenciais doadores para o
428 Banco de Sangue Canino da FMVZ-UNESP/Botucatu, SP. Destes, 26 (26/71=36,6%)
429 animais foram considerados impróprios, com base nos critérios de exclusão impostos
430 pelo estudo.

431 Entre 45 cães que doaram sangue, 31 (31/45=68,8%) bolsas não puderam ser
432 utilizadas, posto que apresentaram tempo de coleta superior a 12 minutos, fluxo
433 sanguíneo lento ou interrompido durante a coleta, ou presença de plasma lipêmico ou
434 com hemólise, bolsas que por algum motivo apresentaram defeito de fabricação e
435 abriram o sistema durante o processamento. Com efeito, do total de 71 cães
436 encaminhados para doação de sangue e 45 animais que se obteve a colheita de bolsas
437 de sangue, somente 14 (14/71=19,7%) bolsas foram consideradas adequadas a
438 condução do estudo.

439 A motilidade *swirling* ($p<0,01$), peso e volume ($p<0,02$) apresentaram redução
440 estatisticamente significativa ao longo dos dez dias de acompanhamento. A
441 comparação estatística do peso e volume das bolsas revelou redução significativa entre
442 os tempos de M0 e M10, enquanto para motilidade *swirling*, a redução ocorreu entre M0
443 e M5, M0 e M10, e M5 e M10 (teste de Kruskal-Wallis) (Tabela 1, Figura 1). Em
444 contraste, os teores de eritrócitos mantiveram-se equivalentes, enquanto foi observado
445 aumento na contagem de leucócitos nos momentos M5 e M10.

446 Em uma (1/14=7,1%) bolsa foi obtido o isolamento, em associação, de
447 *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus luteus* e nos momentos M5 e M10. Não foi
448 obtido nenhum isolamento bacteriano em anaerobiose ou crescimento fúngico em agar
449 sabouraud.

450 **Tabela 1.** Média e desvio padrão de parâmetros de qualidade hematológica e
 451 microbiológica de bolsas de concentrado de plaquetas de 14 cães, segundo tempo de
 452 estoque. Botucatu, SP, 2021-2022.

453

Parâmetros	Tempo de estoque			p-value	Valores de referência*
	M1 (média ± DP)	M2 (média ± DP)	M3 (média ± DP)		
Peso (g)	66,7 ± 5,7	64,3 ± 5,7	61,1 ± 5,8	0,02	63-83 g
Volume (mL)	64,4 ± 5,3	62,1 ± 5,3	59,0 ± 5,5	0,02	40-70 mL
pH	7,46 ± 0,5	7,29 ± 0,5	6,96 ± 0,7	0,11	6,7-7,5
Glicose (mg/dL)	2,71 ± 0,5	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,7	0,40	VND*
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	190,7 ± 129,0	176,4 ± 143,0	142,9 ± 129,0	0,34	5,500x10 ³
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	0,23 ± 0,09	0,24 ± 0,09	0,27 ± 0,08	0,26	200,000x10 ³
GV* (10 ⁶ /mm ³)	0,028 ± 0,01	0,032 ± 0,01	0,024 ± 0,01	0,24	<6x10 ³ /mL
Motilidade <i>swirling</i>	4,79 ± 0,6	2,21 ± 0,8	0,07 ± 0,3	<0,01	0-5
Cultivo microbiológico	0	1/14 (7,1%)	1/14 (7,1%)	0,59	Negativo

454

GV* = Glóbulos vermelhos (eritrócitos);

455

DP = Desvio Padrão; M1 = dia da coleta; M2 = 5 dias de estoque; M3 = 10 dias de estoque das bolsas.

456

VND*= Valor não disponível

457

*TYNNGÅRD, 2009; VUK et al. 2009; MURPHY, 1983.

458 De acordo com o teste de Kruskal-Wallis, houve diferença significativa ($p < 0,05$)
 459 entre os tempos de estoque para as variáveis peso, volume e motilidade
 460 swirling, enquanto que para as demais variáveis não houve diferença
 461 estatística entre os tempos.

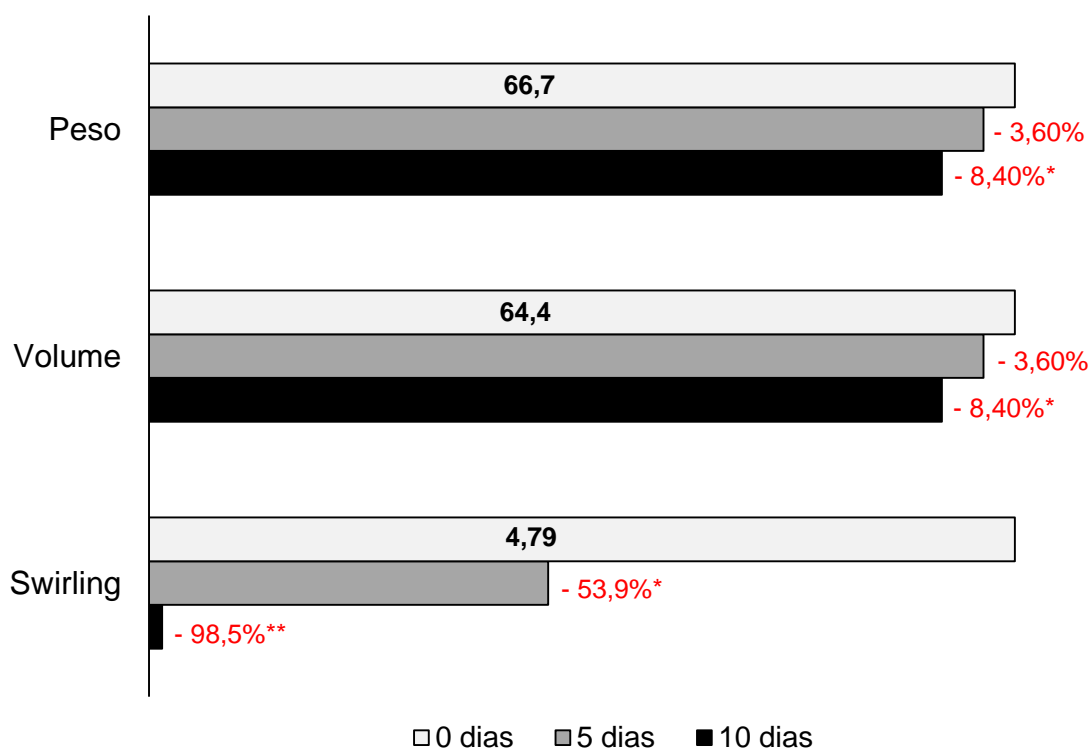
462 Aplicando-se o teste de Dunn para comparações múltiplas pós teste de
 463 Kruskal-Wallis, o peso e volume das bolsas apresentaram redução significativa
 464 ($p < 0,05$) entre os tempos de 0 – 10 dias de estoque, enquanto que para
 465 motilidade swirling, essas reduções ($p < 0,05$) ocorreram entre 0 a 5 dias, 0 a 10
 466 dias e 5 a 10 dias de estoque (Tabela 2 + Figura).

467

468 **Tabela 2.** Comparações múltiplas entre os tempos de estoque para as
 469 variáveis significativas no teste de Kruskal Wallis.

470

Variáveis	Tempo de estoque		
	0 dias	5 dias	10 dias
Peso	66,7 (100%)	- 3,60%	- 8,40%*
Volume	64,4 (100%)	- 3,57%	- 8,39%*
Swirling	4,79 (100%)	- 53,9%*	- 98,5%**



471

472 * Diferença significativa ($p < 0,05$) entre 0 e 10 dias de estoque;

473 ** *Diferença significativa ($p < 0,05$) entre 5 e 10 dias de estoque.*

474

475 6. DISCUSSÃO

476 O presente estudo observou redução significativa da motilidade *swirling*, peso e
477 volume de bolsas de CP produzidas a partir do sangue de cães, bem como alterações
478 de outros parâmetros utilizados na avaliação da qualidade deste hemocomponente,
479 incluindo o isolamento de micro-organismos em uma bolsa; reforçando a necessidade
480 de critérios rígidos para a seleção de doadores, necessidade de equipamentos e
481 pessoal treinado para a coleta, processamento e estoque das bolsas, bem como
482 rigorosas medidas de biossegurança, visando a produção do hemocompenete para o
483 uso na rotina de hemoterapia em cães.

484 O CP é considerado o hemocomponente de escolha para a terapia transfusional
485 em distúrbios de coagulação primária em cães, como a trombocitopenia (TANNER,
486 2019), posto que minimizam reações adversas transfusionais e evitam a sobrecarga
487 volêmica (VERRASTRO et al., 1996). No entanto, diferentes desafios se impõem para
488 sua obtenção, incluindo a captação e fidelização de doadores, necessidade de
489 equipamentos, higidez e peso mínimo dos cães, altos custos de exames de triagem dos
490 doadores, variações comportamentais dos animais doadores no momento da coleta e
491 alterações de qualidade das bolsas pós-coleta, como presença de hemólise, presença
492 de hemácias integras e lipemia (prancha A figura 1 e 2) demora na coleta, que resultam
493 na recusa de animais e descarte de bolsas (NGO, 2020). Tais dificuldades foram
494 notórias nos animais amostrados e concordam com estudos similares, pois foram
495 desqualificados 26 cães com base nos rígidos critérios de inclusão adotados e
496 descartadas 31 bolsas de CP, pela presença de lipemia, hemólise ou tempo de coleta
497 superior a 12 minutos, ou mesmo fluxo sanguíneo lento ou interrompido durante o
498 procedimento, perfazendo o aproveitamento de somente 14 bolsas.

499 Na rotina hematológica veterinária, a viabilidade do CP é avaliada por inspeção
500 visual da motilidade *swirling*, mensuração do peso e volume das bolsas, teores de pH e
501 glicose, e contagem total de leucócitos, hemácias e plaquetas (POPESCU et al., 2021).

502 Ao longo de dez dias de estoque do CP dos animais amostrados foi observada
503 redução significativa do volume e peso das bolsas, que eram alterações esperadas, em
504 virtude da manipulação das bolsas para retirada de alíquotas visando análises físicas,
505 bioquímicas e microbiológicas propostas no estudo. No entanto, faz-se importante
506 salientar, que, apesar do descarte das bolsas de CP do estudo, em virtude da
507 manipulação e manutenção por dez dias, o restante do sangue total dos animais
508 doadores foi utilizado na rotina de transfusões do Banco de Sangue Canino do
509 Laboratório Clínico Veterinário da FMVZ.

510 A motilidade *swirling* apresentou redução significativa no decorrer dos dez dias de
511 estoque do CP nos animais amostrados. Tal achado poderia ser creditado a
512 agregação plaquetária e formação de grumos, bem como ativação plaquetária devido
513 à exposição, que podem reduzir a motilidade *swirling* (HOSSEINI, E. et al 2022)
514 considerado parâmetro essencial na avaliação física das bolsas e relacionado a
515 comprometimentos hematológicos, que podem inviabilizar o uso terapêutico do
516 hemocomponente (POPESCU et al., 2021).

517 Foi observada redução do pH das bolsas entre os M0, M5 e M10 do estudo,
518 embora permanecendo dentro dos valores considerados normais. Tal alteração era
519 esperada, em virtude da manipulação das bolsas para retirada das alíquotas visando as
520 avaliações de qualidade hematológica e microbiológica do hemocomponente. No
521 entanto, tal procedimento não alterou significativamente os teores deste parâmetro
522 hematológico. Devido às características peculiares da atividade plaquetária, as bolsas
523 de CP devem ser armazenadas entre 22°C e 24°C, pois, alterações neste intervalo de
524 temperatura, podem causar o aumento da glicólise e, conseqüentemente, elevações do
525 teor de lactato, reduzindo o pH da bolsa (NG et al., 2018) e comprometendo a sua
526 qualidade para os processos de hemoterapia (POPESCU et al., 2021). Ainda, elevações
527 da concentração de dióxido de carbono que ocorrem em bolsas inadequadamente
528 coletadas ou armazenadas podem contribuir para a redução do pH do CP (SANDGREN,
529 2012).

530 Ao longo dos dez dias de estoque do CP foi observada a redução da contagem
531 de plaquetas, particularmente no M10, fator considerado preocupante, posto que a
532 principal finalidade deste hemocomponente é repor plaquetas para cães com distúrbios
533 de hemostasia primeira em decorrência a baixa quantidade de plaquetas, na presença
534 de sinais clínicos como: sangramentos em órgãos após processos traumáticos, epistaxe
535 e hematúria, causados por processos inflamatórios, imunomediados ou infecções por
536 determinados patógenos (STOCKMAN; SCOTT, 2008), incluindo espécies de *Ehrlichia*
537 (AGUIAR et al., 2019) e *Anaplasma* (GAUNT et al., 2010). Ainda, o processo de
538 apoptose plaquetária também tem sido observado no estoque de bolsas de CP, e pode
539 alterar a atividade das mitocôndrias e das enzimas caspases presentes nas plaquetas,
540 responsáveis pelo controle da morte celular programada, que pode resultar na redução
541 da contagem de plaquetas do CP (SANDGREN, 2012). Não obstante, plaquetas
542 armazenadas nas bolsas podem sofrer agregação e alterações morfológicas (com a
543 perda do formato original), tornando-se esféricas e com pseudópodes, que
544 comprometem a sua ação hemostática (MITTAL, 2015). Com efeito, o conjunto destas
545 alterações supracitadas em bolsas inadequadamente armazenadas de CP podem
546 reduzir o número de plaquetas ou comprometer a função hemostática do

547 hemocomponente (POPESCU et al., 2021).

548 A produção de hemocomponentes com ausência de contaminação microbiana é
549 crucial na prática da hemoterapia (JACOBS et al., 2001). No tocante a produção e
550 manutenção de bolsas de CP tal preocupação é maximizada, posto que este
551 hemocomponente permanece armazenado em temperatura ambiente (22° e 24°C), em
552 bolsas permeáveis ao oxigênio, visando manter a qualidade hematológica e função
553 hemostática (ANDERSON et al., 1986). Ademais, a presença de glicose na solução
554 conservante das bolsas pode servir como substrato para a multiplicação microbiana
555 (JACOBS et al., 2008). Com efeito, a produção e armazenamento de bolsas de CP na
556 rotina hematológica veterinária, sem a adição de inibidores de multiplicação de micro-
557 organismos (PERROTTA et al., 1999; LIU et al., 2020), e a manutenção em temperatura
558 ambiente - idealmente por até cinco dias para manter a qualidade hematológica das
559 bolsas - (JACOBS et al., 2008), requer cuidados rigorosos de biossegurança para evitar
560 a contaminação microbiana do hemocomponente (BENJAMIN, 2016).

561 O risco transfusional envolvendo o CP é maior que nos demais
562 hemocomponentes, devido a possibilidade de choque séptico nos receptores. Estima-
563 se que cerca de 95 a 100% das reações adversas pós-transfusionais estejam
564 relacionadas a contaminação microbiana das bolsas (HAASS, 2019), particularmente
565 entre o 4º e 5º dias de armazenamento (BENJAMIN, 2016).

566 Bactérias gram-positivas dos gêneros estafilococos (*Staphylococcus*
567 *epidermidis*, *Staphylococcus aureus*), estreptococos (*Streptococcus bovis*),
568 *Propionibacterium* e *Bacillus*, bem como certas enterobactérias (*Escherichia coli*,
569 *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*) e outras bactérias gram-negativas
570 (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*) têm sido
571 identificadas como contaminantes de bolsas de CP obtidas de cães (LOUKHMAS, 2000;
572 MOHR, 2006; JACOBS et al., 2008; JONES et al., 2018; DIAMANDAS, 2020).

573 No presente estudo, foi observado o isolamento, em associação, de
574 *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus luteus*, em uma (7,1%) bolsa em M5 e M10,
575 identificados por espectrometria de massas. O isolamento destas bactérias gram-
576 positivas na bolsa de CP poderia ser creditado a presença destes micro-organismos na
577 microbiota da pele, mucosas e conjuntivas (MOHR, 2006), que poderia favorecer a
578 contaminação - a partir do animal ou dos humanos - no momento de colheita de sangue
579 das bolsas; posto que *Staphylococcus epidermidis* é comumente encontrado na
580 microbiota de pele de humanos e animais (ROSSI, 2018), enquanto *Micrococcus luteus*
581 tem sido identificado na microbiota cutânea de humanos e, ocasionalmente, de modo
582 oportunista, causando encefalites (FOSSE, 1985; ERBASAN, 2018), endocardite
583 (SEIFERT, 1995) e artrite séptica (BAUMBACH, 2018) em pacientes imunossuprimidos.

584

585 Em virtude da necessidade de pessoal treinado e de equipamentos apropriados
586 para a produção e manutenção das bolsas de CP, e de rigorosas medidas de
587 biossegurança (para evitar a contaminação e comprometimento hematológico desta
588 fração sanguínea utilizada na hemoterapia de cães), aliado a viabilidade reduzida das
589 bolsas em temperatura ambiente (cinco dias), número reduzido de laboratórios clínicos
590 veterinários produzem este hemocomponente (RAZOUK et al., 2004; TOSTES et al.,
591 2008; HOAREAU et al., 2014; MALLHI et al., 2015), tampouco não se tem observado o
592 uso de métodos moleculares no diagnóstico dos micro-organismos contaminantes das
593 bolsas de CP obtidas de cães, fatos que podem ser considerados como motivações do
594 presente estudo.

595 O uso de amostragem de conveniência e o descarte de grande número de
596 animais e bolsas - com base nos fatores de inclusão e exclusão propostos - podem ser
597 considerados fatores limitantes do presente estudo.

598

599

600 7. CONCLUSÕES

601

602 A motilidade *swirling* apresentou redução significativa ao longo do
603 armazenamento do CP por até dez dias, bem como se observou redução do peso e
604 volume das bolsas, dos teores de pH e glicose, e do número de plaquetas, indicando
605 que há prejuízo dos parâmetros hematológicos com o estoque das bolsas em
606 temperatura ambiente, sem aditivos, por mais de cinco dias;

607

608 O isolamento, em associação, de *Staphylococcus epidermidis* e *Micrococcus*
609 *luteus* nos momentos M2 e M3 em uma bolsa (7,1%), reforça a necessidade de rigorosa
610 antissepsia dos animais e condições de biossegurança em todas as etapas de produção
611 das bolsas de CP obtidas de cães, incluindo a seleção dos doadores, coleta de sangue,
612 preparo e estoque deste hemocomponente para uso na hemoterapia veterinária.

8. REFERÊNCIAS

ABINPET. Mercado Pet Brasil 2020. Disponível em: <<http://abinpet.org.br/mercado/>>. Acesso em: 01 de junho de 2021.

ABRAMS-OGG, A. C. Triggers for prophylactic use of platelet transfusions and optimal platelet dosing in thrombocytopenic dogs and cats. *The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice*, v. 33, n. 6, p. 1401-1418, 2003.

ALAMDARI, D. H. et al. Application of methylene blue -vitamin C –N-acetyl cysteine for treatment of critically ill COVID-19 patients, report of a phase-I clinical trial. **European Journal of Pharmacology**, v. 885, p. 173494, out. 2020.

ANDERSON, K.C; et al. Transfusion-related sepsis after prolonged platelet storage. **The American journal of medicine**, v. 81, n. 3, p. 405-411, 1986.

ANDREU G. **DU bon usage des produits sanguins [Blood components and good practices in transfusion]**. Presse Med. 2015. <<https://doi.org/10.1016/j.lpm.2014.06.032>>. Acesso em: 12 de abril de 2022.

BARREIRO, J. R.; FERREIRA, C. R.; SANVIDO, G. B.; KOSTRZEWA, M.; MAIER, T.; WEGEMANN, B.; BOTTCHER, V.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Short communication: Identification of subclinical cow mastitis pathogens in milk by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5661–5667, 2010.

BASHIR, S. et al. Platelet storage in more than 90% additive solution containing glucose and bicarbonate has the potential to increase shelf life. **Transfusion**, v. 58, n. 12, p. 2959–2968, 28 set. 2018.

BENJAMIN, R. J. Transfusion-related sepsis: a silent epidemic. **Blood**, v. 127, n. 4, p. 380–381, 28 jan. 2016.

BLAJCHMAN, M. A; BECKERS, E. A.; DICKMEISS, E.; LIN, L., MOORE, G.; MUYLLE,

L. Bacterial detection of platelets: current problems and possible resolutions. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 19, n. 4, p. 259-272, 2005.

BAUMBACH, S. F. et al. Significant increase of pathogen detection rate by dry arthroscopic biopsies at suspected low-grade infection following total knee arthroplasty: a prospective observational study. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v. 138, n. 11, p. 1583–1590, 1 nov. 2018.

BUCHIGNANI, M. R. **Avaliações de parâmetros que conferem qualidade ao concentrado de plaquetas.** Dissertação (Mestrado Faculdade de Medicina) Curso de Pós-Graduação em Fisiopatologia em Clínica Médica-Metabolismo e Nutrição, Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP. 2002.

CANCELAS, J. A. et al. Additive solution-7 reduces the red blood cell cold storage lesion: AS-7 Reduces RBC Storage Lesion. *Transfusion*, v. 55, n. 3, p. 491–498.

CARITÁ, A. C. et al. Vitamin C: One compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 24, p. 102117, fev. 2020.

CHIARAMONTE, D. Blood-component therapy: selection, administration, and monitoring. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*, v. 19, n. 2, p. 63–67, 2004.

CLIFTON, J.; LEIKIN, J. B. Methylene blue. *American Journal of Therapeutics*, v. 10, n. 4, p. 289–291, 1 jul. 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). CLSI supplement VET01S. In: **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals.** 3rd ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

CORRADINI, I.; GEORGES, K.; JOSE-CUNILLERAS, E. CO-oximetry measurements and antioxidant effects of ascorbic acid and methylene blue in equine methemoglobinemic blood. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care (San Antonio, Tex.: 2001)*, v. 31, n. 6, p. 773–778, 1 nov. 2021.

DEYHIM, M. R.; YARI, F.; MESBAH-NAMIN, S.A.; KHOSHNAAGHSH, F. Protective effect of L-carnitine on platelet apoptosis during storage of platelet concentrate. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 27, n. 3, p. 139–146, ago. 2020.

DIAMANDAS, A.; RAZON, R. M.; SYKES, E.; KUMAR, A.; RAMIREZ-ARCOS, S.; BRASSINGA, A. Complete Genome Sequences of Two Distinct Strains of *Serratia marcescens* Isolated from Contaminated Platelet Concentrates from Canadian Donors. **Microbiology resource announcements**, v. 9, n. 41, p. 829-849, 2020.

DONATO H. **Neonatal thrombocytopenia: A review. I. Definitions, differential diagnosis, causes, immune thrombocytopenia.** Arch Argent Pediatr. 2021.

EICKMANN, M. et al. Inactivation of Ebola virus and Middle East respiratory syndrome coronavirus in platelet concentrates and plasma by ultraviolet C light and methylene blue plus visible light, respectively. **Transfusion**, v. 58, n. 9, p. 2202–2207, 6 maio 2018.

ERBASAN, F. Brain abscess caused by *Micrococcus luteus* in a patient with systemic lupus erythematosus: case-based review. **Rheumatology International**, v. 38, n. 12, p. 2323–2328, 29 out. 2018.

FLORES, M. J. S. Antecedentes históricos de la medicina transfusional. **Revista Mexicana de Medicina de Transfusión**, v. 1, n. 1, p. 7-9, 2008.

GAUNT, S. et al. Experimental infection and co-infection of dogs with *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis*: hematologic, serologic and molecular findings. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, 8 abr. 2010.

GIGUÈRE, S.; PRESCOTT, J. F.; BAGGOT, J. D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P. M. **Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária.** 1 ed. São Paulo: Roca, 2010. 683p.

GONÇALVES, J. L.; TOMAZI, T.; BARREIRO, J. R.; BRAGA, P. A. C.; FERREIRA, C.R.; ARAÚJO JUNIOR, J. P.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, M. V. Identification of *Corynebacterium* spp. isolated from bovine intramammary infections by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. **Veterinary Microbiology**, v. 173, n. 50, p. 147-151, 2014.

GONÇALVES, S. **Reações transfusionais após a administração de concentrados de plaquetas em cães.** 2006. Tese (Doutorado em Cirúrgica Veterinária). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Disponível em: <<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10137/tde-23042007-164841/pt-br.php>>. Acesso em: 4 de março de 2021.

GREEN, L.; BOLTON-MAGGS, P.; BEATTIE, C.; CARDIGAN, R.; KALLIS, Y.; STANWORTH, S. J.; THACHIL, J.; ZAHRA, S. British Society of Haematology Guidelines on the spectrum of fresh frozen plasma and cryoprecipitate products: their handling and use in various patient groups in the absence of major bleeding. **British Journal of Haematology**, v. 181, n. 1, p. 54–67, 2018.

GREENWALT, T. J. A short history of transfusion medicine. **Transfusion**, v. 37, n. 5, p. 550- 63, 1997.

HAASS, K. A. et al. Transfusion-transmitted infections reported to the National Healthcare Safety Network Hemovigilance Module. **Transfusion medicine reviews**, v. 33, n. 2, p. 84–91, 2019.

HESS, J. R., RUGG, N., KNAPP, A. D., GORMAS, J. F., SILBERSTEIN, E. B., & GREENWALT, T. J. Successful storage of RBCs for 9 weeks in a new additive solution. **Transfusion**, v. 40, n. 8, p. 1007-1011, 2000.

HOAREAU, G. L; JANDREY, K. E.; BURGESS, J.; BREMER, D.; TABLIN, F. Comparison of the platelet-rich plasma and buffy coat protocols for preparation of canine platelet concentrates. **Veterinary Clinical Pathology**, v.43, n.4, p.513- 518, 2014.

HÖGMAN, C. F. et al. The Bottom and Top System: A New Technique for Blood Component Preparation and Storage. **Vox Sanguinis**, v. 55, n. 4, p. 211–217, nov. 1988.

HOSSEINI, E. et al. Agitation-dependent biomechanical forces modulate GPVI receptor expression and platelet adhesion capacity during storage. **Thrombosis Journal**, v. 20, n. 1, p. 3, 12 jan. 2022.

JACOBS, M. R.; PALAVECINO, E.; YOMTOVIAN, R. Don't bug me: the problem of bacterial contamination of blood components-challenges and solutions. **Transfusion**, v. 41, n. 11, p. 1331–1334, 2001.

JACOBS, M. R; et al. Relationship between bacterial load, species virulence, and transfusion reaction with transfusion of bacterially contaminated platelets. **Clinical infectious diseases**, v. 46, n. 8, p. 1214-1220, 2008.

JAIN, N. C. **Essentials of veterinary Hematology**. Malvern, Pennsylvania: Le & Febiger, 1993, p. 105-132.

JERICÓ, M. M.; KOGIKA, M. M.; ANDRADE NETO, J. P. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. São Paulo: Grupo Gen - Guanabara Koogan, 2015.

JONES, S. A. et al. Sepsis Attributed to Bacterial Contamination of Platelets Associated with a Potential Common Source — Multiple States. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 68, n. 23, p. 519–523, 2019.

KAUSHANSKY, K. The molecular mechanism that controls thrombopoiesis. **The journal of clinical investigation**, v. 115, n. 12, p. 3339-3347, 2005.

KERBAUY, A. M. R. M.; KERBAUY, V. E. C. J. Sobre a organização de um banco de sangue para cães. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária** v. 7, n. 4, p. 935-946, 1968.

KOBZAR, G. Inhibition of platelet activation using vitamins. **Platelets**, v. 31, n. 2, p. 157–166, 19 ago. 2019.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; TAKAHASHI DE MELO, N. **Tratado de Micologia médica**. 9. ed. São Paulo: Sarvier, 2002. 1104p.

LASTA, C.S. et al. Quality control in veterinary blood banks: evaluation of canine platelet concentrates stored for five days. **BMC veterinary research**, v.16, n.1 p. 25,30 jan.2020.

LEVINE, M.; PADAYATTY, S. J.; ESPEY, M. G. Vitamin C: A Concentration-Function Approach Yields Pharmacology and Therapeutic Discoveries. **Advances in Nutrition**, v. 2, n. 2, p. 78–88, 1 mar. 2011.

LEVY, J. H.; NEAL, M. D.; HERMAN, J. H. Bacterial contamination of platelets for transfusion: strategies for prevention. **Critical Care**, v. 22, n. 271, p. 212-219, 2018.

LICHTENBERGER M. **Transfusion medicine in exotic pets**. Clin Tech Small Anim Pract. 2004. <<http://doi:10.1053/j.ctsap.2004.01.006>>. Acesso em: 13 de abril de 2022.

LIU D, PEI D, HU H, GU G, CUI W. **Effects and Mechanisms of Vitamin C Post-Conditioning on Platelet Activation after Hypoxia/Reoxygenation**. *Transfus Med Hemother*. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/doi:10.1159/000500492>>. Acesso em: 13 de abril de 2022.

LOUKHMAS, L. et al. [Prevalence of bacterial contamination of standard platelet units: prospective study]. **Transfusion Clinique Et Biologique: Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine**, v. 7, n. 2, p. 171–176, 1 abr. 2000.

MAGIORAKOS, A.P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, pp. 268–281, 2012.

MALLE, E.; SATTTLER, W. Platelets and the Lipoproteins: Native, Modified and Platelet Modified Lipoproteins. **Platelets**, v. 5, n. 2, p. 70–83, jan. 1994.

MALLHI, R. S; PHILIP, J. A comparative assessment of quality of platelet concentrates prepared by buffy coat poor platelet concentrate method and apheresis derived platelet concentrate method. **Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion**, v. 31, n. 4, p. 453- 459, 2015.

MARCONDES J. V. **Transfusão de Sangue**. Tese (Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro), 1879, pp.73-77.

MITTAL, K.; KAUR, R. Platelet storage lesion: An update. **Asian journal of transfusion science**, v. 9, n. 1, p. 1–3, 2015.

MOHR, H.; BAYER, A; GRAVEMANN, U; MÜLLER, T. H. Elimination and multiplication of bacteria during preparation and storage of buffy coat-derived platelet concentrates. **Transfusion**, v. 46, n. 6, p. 949-55, 2006.

MURPHY, S.; SCHIFFER, C. A.; KATZ, A. J. Panel VIII: Platelet concentrates: Functional considerations, storage, and quality control. **Journal of Clinical Apheresis**, v. 1, n. 3, p. 185–189, 1983.

NG, M. S. Y.; TUNG, J.-P.; FRASER, J. F. Platelet Storage Lesions: What More Do We Know Now? **Transfusion Medicine Reviews**, v. 32, n. 3, p. 144–154, 2018.

NGO, A. et al. Blood Banking and Transfusion Medicine Challenges During the COVID-19 Pandemic. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 40, n. 4, p. 587–601, dez. 2020.

OLAS, B.; WACHOWICZ, B. Resveratrol and vitamin C as antioxidants in blood platelets. **Thrombosis Research**, v. 106, n. 2, p. 143–148, abr. 2002.

PERROTTA, P. L. et al. Effects of methylene blue-treated plasma on red cells and stored platelet concentrates. **Transfusion**, v. 39, n. 1, p. 63–69, 1 jan. 1999.

PONTIGGIA, L. et al. Platelet microparticle formation and thrombin generation under high shear are effectively suppressed by a monoclonal antibody against GPIIb/IIIa. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 96, n. 6, p. 774–780, 1 dez. 2006.

POPESCU MN, ILIESCU MG, BEIU C, POPA LG, MIHAI MM, BERTEANU M, IONESCU AM. **Autologous Platelet-Rich Plasma Efficacy in the Field of Regenerative Medicine: Product and Quality Control**. Biomed Res Int. 2021. Disponível em: <<https://doi.org/doi:10.1155/2021/4672959>>. Acesso em: 13 de abril de 2022.

PURVER, M. *The Royal Society: Concept and Creation*. London: Routledge and Kegan Paul, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.4324/9780203706268>>. Acesso em: 30 de janeiro de 2022.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; LEONARD, F. C.; FITZPATRICK, E. S.; FANNING, S.; HARTIGAN, P. J. **Veterinary Microbiology and Microbial Diseases**. 2.ed., UK: Wiley- Blackwell, 2011. 1231p.

RAZOUK, F. H; REICHE, E. M. V. Caracterização, produção e indicação clínica dos principais hemocomponentes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 26, n. 2 p. 126-134, 2004.

REICHMANN, P.; DEARO, A. C. O. Transfusão de sangue e seus derivados em grandes animais. **Seminário Ciências Agrária**, v. 22, n. 2, p. 223-228, 2001.

ROSENBLIT, J.; BARISON, M.; SANTOS, L. G.; MACIEL H. Informações pessoais no ano 2000. In IBGE. **Pesquisa domiciliar sobre cães e gatos humanizados e padrões de comportamento de consumo** (CDHPET), p. 36-39, 2008. Disponível em:<<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv39560.pdf>>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2022.

ROSSI, C. C. et al. Identification of *Staphylococcus epidermidis* with transferrable mupirocin resistance from canine skin. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 235, p. 70–72, 1 maio 2018.

SAHA, B. K.; BURNS, S. L. The Story of Nitric Oxide, Sepsis and Methylene Blue: A Comprehensive Pathophysiologic Review. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 360, n. 4, p. 329–337, out. 2020.

SANDGREN, P.; STJEPANOVIC, A. High-yield platelet units revealed immediate pH decline and delayed mitochondrial dysfunction during storage in 100% plasma as compared with storage in SSP+. **Vox sanguinis**, v. 103, n. 1, p. 55-63, 2012.

SCHNEIDER, Ann. Blood Components: collection, processing, and storage. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**, [S.L.], v. 25, n. 6, p. 1245-1261, nov. 1995. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0195-5616\(95\)50152-4](http://dx.doi.org/10.1016/s0195-5616(95)50152-4).

SEIFERT, H.; KALTHEUNER, M.; PERDREAU-REMGTON, F. *Micrococcus luteus* endocarditis: Case report and review of the literature. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 282, n. 4, p. 431–435, out. 1995.

SHARPE, K. S. et al. Influence of treatment with ultralow-dose aspirin on platelet aggregation as measured by whole blood impedance aggregometry and platelet P-selectin expression in clinically normal dogs. **American Journal of Veterinary Research**, v. 71, n. 11, p. 1294–1304, 1 nov. 2010.

SRIVASTAVA, K. C. Ascorbic acid enhances the formation of prostaglandin E1 in washed human platelets and prostacyclin in rat aortic rings. **Prostaglandins, Leukotrienes, and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 227–233, 1 maio 1985.

STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. 2. ed. Ames: Blackwell Publishing, 2008, 196 p. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022453/>>. Acesso em: 23 de fevereiro de 2022.

TAKAHIRA, R. K. et al. Plano de divulgação e recrutamento de doadores para o banco de sangue canino do Hospital Veterinário FMVZ UNESP, Botucatu, SP. In: 8º Congresso de Extensão Universitária da UNESP, p. 1-5, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/142574>>. Acesso em: 01 de março de 2022.

TANNER, L.; MÜLLER, M. M. [Blood Transfusion: a Guide to Clinical Decision Making]. **Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS**, v. 54, n. 3, p. 194–205, 1 mar. 2019.

THOMAS, M. J. Physiological aspects of low-density lipoprotein oxidation. **Current Opinion in Lipidology**, v. 11, n. 3, p. 297–301, 1 jun. 2000.

THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

TOLIOPOULOS, I. K. et al. Inhibition of platelet aggregation and immunomodulation of NK lymphocytes by administration of ascorbic acid. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 49, n. 12, p. 904–908, 1 dez. 2011.

TOSTES, M. A. V. et al. Influência da coleta, da produção e da estocagem na qualidade dos concentrados de plaquetas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 367-373, 2008.

TRIOLA, M. F. **Introdução à Estatística**. 9ª ed. LTC: Rio de Janeiro, 2005. 682 p.

TYNNGÅRD, N. Preparation, storage and quality control of platelet concentrates. **Transfusion and Apheresis Science: Official Journal of the World Apheresis Association: Official Journal of the European Society for Haemapheresis**, v. 41, n. 2, p. 97–104, 1 out. 2009.

UENO, T. E. H. et al. Ehrlichia canis em cães atendidos em hospital veterinário de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 03, p. 57–61, 2009.

VASCONCELOS, E; FIGUEIREDO, A. C.; SEGHATCHIAN, J. Quality of platelet concentrates derived by platelet rich plasma, buffy coat and apheresis. **Transfusion and apheresis science**, v. 29, n. 1, p. 13-16, 2003.

VERRASTRO, T. **Hematologia e Hemoterapia: Fundamentos de Morfologia, Fisiologia, Patologia e Clínica**. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 237-293, 1996.

VUK, T. et al. Quality control of leucocyte-depleted platelet concentrates obtained by buffy-coat method. **Transfusion Medicine**, p. n/a-n/a, jun. 2013.

Tabela 3. Controle de qualidade hematológica e microbiológica de bolsas de concentrado de plaquetas de 14 cães, segundo tempo de estoque. Botucatu, SP, 2021-2022.

Momento de avaliação		Peso	Volume	pH	Glicose	Plaquetometria	Leucometria	G.V.	Swirling	Micro
		(g)	(mL)			X 10 ³ /mm ³	X 10 ³ /mm ³	X 10 ³ /mm ³		
M1	CP1	78	75	7	2	236	0,1	0,02	5	NEG
	CP2	70	67	7	2	471	0,3	0,04	5	NEG
	CP3	71	68	7	3	82	0,2	0,03	4	NEG
	CP4	75	72	8	2	63	0,2	0,02	5	NEG
	CP5	68	66	8	3	237	0,2	0,02	5	NEG
	CP6	73	70	8	3	58	0,1	0,01	5	NEG
	CP7	65	63	7	3	71	0,3	0,02	5	NEG
	CP8	62	60	7	2	83	0,3	0,04	5	NEG
	CP9	62	60	7,5	3	159	0,2	0,02	5	NEG
	CP10	62	60	7	3	317	0,2	0,03	5	NEG
	CP11	62	60	7	3	360	0,4	0,07	5	NEG
	CP12	62	60	8	3	190	0,2	0,02	5	NEG
	CP13	62	60	8	3	83	0,2	0,02	3	NEG
	CP14	62	60	8	3	260	0,3	0,03	5	NEG
M2	CP1	76	73	7	2	142	0,2	0,03	3	NEG
	CP2	67	65	7	2	568	0,2	0,05	2	NEG
	CP3	68	66	8	2	53	0,2	0,04	3	NEG
	CP4	73	70	8	2	60	0,2	0,03	2	NEG
	CP5	65	63	7,5	2	230	0,4	0,02	2	NEG
	CP6	70	67	8	3	50	0,3	0,03	1	NEG
	CP7	63	61	7	3	67	0,2	0,01	1	NEG
	CP8	60	58	7	2	79	0,4	0,03	2	NEG
	CP9	59	57	7	3	175	0,2	0,02	1	POS
	CP10	59	57	7	2	262	0,2	0,05	3	NEG
	CP11	60	58	6,5	3	343	0,4	0,06	3	NEG
	CP12	60	58	7,5	3	180	0,2	0,03	3	NEG
	CP13	60	58	7	3	80	0,2	0,02	2	NEG

	CP14	60	58	7,5	3	180	0,1	0,03	3	NEG
M3	CP1	73	70	7	3	103	0,2	0,04	0	NEG
	CP2	65	63	6	2	484	0,2	0,04	1	NEG
	CP3	66	64	8	2	48	0,2	0,01	0	NEG
	CP4	70	67	8	2	34	0,4	0,02	0	NEG
	CP5	61	59	7,5	2	200	0,3	0,01	0	NEG
	CP6	66	64	8	4	23	0,3	0,01	0	NEG
	CP7	59	57	6,5	2	63	0,3	0,01	0	NEG
	CP8	57	55	7	2	27	0,2	0,03	0	NEG
	CP9	55	53	7	2	170	0,3	0,02	0	POS
	CP10	56	54	6	3	229	0,4	0,01	0	NEG
	CP11	57	55	6	3	300	0,4	0,06	0	NEG
	CP12	57	55	7	2	100	0,3	0,03	0	NEG
	CP13	57	55	6,5	3	70	0,2	0,03	0	NEG
	CP14	57	55	7	3	150	0,2	0,02	0	NEG

NEG= Negativo

POS= Positivo

PRANCHA A



Figura 1. Bolsa de concentrado de plaquetas com presença de hemólise e grande quantidade de hemácias integras dispersas no plasma sanguíneo. Botucatu, SP, 2022.



Figura 2. Bolsa de concentrado de plaquetas rompida na segunda centrifugação, onde é separado o plasma rico em plaquetas do plasma pobre em plaquetas. Botucatu, SP, 2022.