

Leucorreducción en sangre de caninos y equinos para transfusión de eritrocitos

Leukoreduction in dogs and horses whole blood for erythrocyte transfusion

H Aguilar*, D Ortiz, A Silva, H Böhmwald, F Wittwer

Instituto de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

SUMMARY

Leukoreduction is the process of removing white blood cells contained in blood products of a Blood Bank to rule out adverse reactions in the receptor. The objective of this study was to test the leukoreduction effectiveness of the "Top and Bottom System" centrifugation method in canine and horse blood units. Blood was obtained in a transfusion system, Optipac® cuádruplex CPD/Adsol, Baxter®, from healthy animals, 10 dogs and 10 horses. 450 ml of blood was extracted from each donor and collected in the total blood unit (ST) of the system and centrifuged. After centrifugation, the ST unit was processed in the Optipress®, Baxter® to obtain the leukoreduced red blood cells concentrate (CE) into a separated plastic unit. Blood samples of 1 ml were collected from each animal during the blood extraction, a second from the ST unit and a third from the CE unit. Samples were analyzed to determine red cell count, haemoglobin concentration, packed cell volume, mean corpuscular volume, mean corpuscular haemoglobin concentration, and leucocyte count (WBC) using an haematological analyzer, Sysmex KX-21N. Descriptive statistics and "t" Student matching group test were used to analyze data. The CE obtained at the end of the process had a Packed Cell Volume (PCV) = 57% in both species and the erythrocyte characteristics remained unchanged after the leukoreduction process. The CE of the canine blood was efficiently leukoreduced (mean = 95.5%) with a remaining WBC content of 0 to 3100 μ L (mean 790 μ L). The CE of the horse blood was also efficiently leukoreduced (mean = 93.4%) remaining a WBC content between 200 to 800 μ L (mean 450 μ L). These results show that the Top and Bottom System is efficient in obtaining leukoreduced erythrocyte units to be used for transfusion in dogs and horses.

Palabras clave: leucorreducción, transfusión, sangre, caninos, equinos.

Key Words: leukoreduction, transfusion, dogs, horses.

INTRODUCCION

Transfusión sanguínea o de componentes es el procedimiento a través del cual se introduce, por vía venosa, sangre reconstituida o componentes específicos para restituir o sustituir la función del elemento deficiente (García y col 2003). La transfusión sanguínea se define como un tratamiento de apoyo que se administra para corregir deficiencias en un paciente hasta que se haya superado el trastorno (Hohenhaus y Rentko 2002).

La administración de sangre total está indicada en animales que cursan con anemia severa, suficiente para impedir la correcta oxigenación de los tejidos (Sellon 2000). Las indicaciones más frecuentes para una transfusión sanguínea son la destrucción acelerada de eritrocitos y las hemorragias masivas producto de accidentes o traumas (Williamson 1993).

En medicina veterinaria, la mayor parte de las veces se administra sangre fresca y completa del donante, pero es preferible administrar los componentes de la sangre por separado, porque proporciona al paciente sólo lo que necesita y se evitan reacciones adversas (Cotter y Stone 1994). El plasma ha sido utilizado para terapia primaria

o de soporte en variadas enfermedades, reemplazando inmunoglobulinas perdidas, factores de coagulación, enzimas y proteínas, ayudando a mantener la presión oncótica vascular (Feige y col 2003). En animales normovolémicos y anémicos existe la alternativa de transfundir sólo eritrocitos en vez de sangre total, exponiendo al receptor a una menor cantidad de proteínas extrañas (Sellon 2000). Además, la administración de sangre total puede predisponerlo a una sobrecarga de fluido, mientras que la administración individual del componente deficiente es más apropiada (Collatos 2003).

A pesar que las transfusiones de sangre se consideran con frecuencia como una terapia necesaria y de importancia vital, no están libres de riesgo de reacciones adversas. Debido a que cada transfusión conlleva el riesgo de provocar una reacción adversa, los médicos veterinarios deben considerar siempre los beneficios terapéuticos y el riesgo de una reacción, previo a la administración (Hohenhaus 2000). El uso de componentes sanguíneos con alto contenido de leucocitos tiene un importante rol en las reacciones posttransfusionales (Benavides 2000). La reacción inmediata febril, no hemolítica, se produce por la interacción de los leucocitos y citoquinas del producto transfundido con los anticuerpos del receptor (Zamudio 2003). Las reacciones tardías de aloinmunización y refractariedad plaquetaria se presentan como resultado de respuestas inmunológicas a leucocitos de transfusiones previas. Además, se ha

Aceptado: 20.03.2007.

* Casilla 567, Valdivia, Chile; hernanaguilar@uach.cl

planteado que los leucocitos transfundidos favorecen la inmunomodulación en el receptor con la recurrencia de cáncer, metástasis y crecimiento tumoral e infecciones postoperatorias.

Para minimizar o prevenir las reacciones adversas señaladas previamente está indicado someter a la unidad de sangre a un procedimiento de leucorreducción antes de ser transfundida al receptor (Lombana y col 2002, Disk 2002). La leucorreducción se refiere al proceso mediante el cual se obtiene un hemoproducto con un número reducido de leucocitos, entendiendo como tal en medicina humana productos con concentraciones residuales de leucocitos menores de 5×10^6 por unidad de hemoproducto (Disk 2002). Para lograr estas cifras se requiere de métodos de leucorreducción que permitan obtener un producto con menos de un 20% de los leucocitos originales y que no afecte la viabilidad de las células rojas (Brownlee y col 2000).

Existen diversas técnicas que se utilizan para leucorreducir la sangre, entre ellas la sedimentación, el lavado de eritrocitos y la centrifugación. En la actualidad la técnica más utilizada es la filtración (Bravo 2002), pero este proceso no remueve las citoquinas y fragmentos de células blancas liberadas durante el tiempo de almacenamiento del componente leucorreducido (Benavides 2000). En oposición a esto, los componentes fraccionados por centrifugación son leucorreducidos en un 80 a 90%, siendo éste el método que proporciona el menor número de leucocitos contaminantes en sangre almacenada (Benavides 2000).

La tecnología del sistema Top and Bottom de Optisystem® descrita por Hogman y col (1988) se basa en la centrifugación, mediante la cual se logra reducir sobre un 80% de leucocitos totales. El método consiste en centrifugar la unidad de sangre recolectada del donante para dividirla en tres capas; plasma, costra flogística y eritrocitos. Posterior a esto se separan mediante presión las tres capas anteriormente descritas, depositando el plasma en una bolsa, los eritrocitos en otra que contiene Adsol como líquido diluyente (anticoagulante y nutriente), mientras que la costra flogística permanece dentro de la bolsa original. Este procedimiento se hace posible mediante un sensor óptico que detecta el movimiento de la costra flogística a medida que la unidad de sangre entera se vacía, regulando el paso del plasma y de los eritrocitos a sus respectivas bolsas (Benavides 2000).

En medicina veterinaria existen escasos antecedentes sobre el empleo de la leucorreducción. En un estudio realizado en la Universidad de Washington (Brownlee y col 2000) obtuvieron una reducción en el número de leucocitos de 88,9% cuando la unidad de sangre canina fue leucorreducida con un sistema de filtración durante los 30 minutos posteriores a su recolección.

El empleo de estas técnicas para la transfusión de hemoproductos en medicina veterinaria permitiría reducir la presentación de reacciones transfusionales adversas y optimizar el uso de la sangre. Con dicho propósito el

presente trabajo tiene como objetivo estimar la eficiencia de una técnica de leucorreducción en unidades de sangre de caninos y equinos.

MATERIAL Y METODOS

Se emplearon 10 caninos y 10 equinos de diferente sexo y de un peso vivo mayor a 25 kg en el caso de los caninos y 350 kg para los equinos, con edades entre los 2 y 8 años, y que cumplieran con las características de un donante (Lubas 1996). Para confirmar el estado de salud de los animales empleados como donantes, éstos fueron sometidos a un examen clínico y se realizó un hemograma. Cabe señalar que todos los animales poseían propietario, los cuales fueron informados, dando su consentimiento. Los animales no sufrieron ningún inconveniente durante ni posteriormente al procedimiento de extracción de sangre, siendo éste habitual dentro de la medicina en animales de compañía.

Para la leucorreducción se utilizó el sistema de bolsas Optipack® cuádruples de Baxter®, compuesto por una bolsa para recibir la sangre del donante, denominada unidad de sangre total (ST) y tres bolsas satélites para recibir el plasma, el concentrado plaquetario y el concentrado de eritrocitos (CE).

De los animales seleccionados se obtuvo sangre mediante punción de la vena yugular, la que se recolectó en la bolsa ST del sistema Optipack®. La bolsa se llenó por diferencia de gravedad, mezclándola constantemente de forma suave y pesándola hasta obtener 500 mL totales de sangre y anticoagulante.

Las bolsas se centrifugaron dentro de las 4 horas de obtenida la sangre a 3.800 rpm durante 12 minutos a 22 °C en una centrífuga Sorwell Instruments® RC-3B y luego mediante el equipo de sensibilidad óptica Optipress®, de Baxter, se separaron los eritrocitos en la bolsa CE y el plasma en otra de las bolsas, quedando en la bolsa original los leucocitos y plaquetas con el resto del plasma.

Se obtuvieron muestras de sangre de 1 mL, con EDTA desde la unidad ST, una vez terminado el proceso de recolección y homogeneización de la sangre con el anticoagulante y otra desde la unidad CE terminado el proceso de leucorreducción. Además se obtuvo una muestra previa desde el sistema de recolección de sangre durante el proceso de recolección.

En las muestras se determinaron los valores de recuento de eritrocitos, hematocrito, concentración de hemoglobina y el recuento de leucocitos mediante un analizador hematológico Sysmex KX-21N. El valor del recuento de leucocitos totales se cotejó con un recuento manual en cámara de Neubauer. También se realizó la fórmula leucocitaria diferenciando 100 leucocitos en frotis teñidos con Wright-Giemsa.

Los datos obtenidos fueron analizados utilizando el programa computacional Statistix 8.0. Se determinaron los promedios, desviación estándar y rango y se compararon

los valores obtenidos mediante "t" para muestras pareadas considerando significativo un valor de $P < 0,05$. La eficiencia del proceso de leucorreducción se determinó por la diferencia porcentual entre el número de leucocitos previo y posterior al procedimiento de leucorreducción.

RESULTADOS Y DISCUSION

Procesar una unidad ST en el sistema Top and Bottom, optimiza la utilización de la sangre del donante, porque se pueden obtener tres unidades a partir de una (una unidad CE, una unidad de plasma y una unidad de plaquetas). De esta forma se benefician tres receptores a partir de un donante (Hohenhaus y Rentko 2002). Además cada uno de los receptores recibe sólo el componente sanguíneo que necesita para superar su deficiencia, sin la necesidad de exponer su organismo a sustancias extrañas que puedan desencadenar respuestas inmunológicas que podrían perjudicar el pronóstico de su enfermedad.

El número de eritrocitos, la concentración de hemoglobina y el valor de hematocrito de la sangre de los caninos disminuyeron ($P < 0,05$) después de la dilución de la sangre del donante con la solución anticoagulante en la unidad ST, diferencia que no se apreció en la sangre de equinos.

En la unidad de CE de sangre de caninos y de equinos la cantidad de eritrocitos, el hematocrito y la concentración de hemoglobina aumentaron significativamente ($P < 0,05$) producto de la remoción del plasma (cuadro 1). El tamaño (VCM) así como el contenido de hemoglobina de los eritrocitos (CHCM) de equinos no se modificaron ($P > 0,05$) durante el proceso de obtención de la sangre y de leucorreducción. Los eritrocitos de caninos presentaron una leve disminución ($P < 0,05$) de su tamaño, asociado a un incremento relativo en su contenido de hemoglobina, esto producto de la mantención de los eritrocitos en el anticoagulante CPD/Adsol un medio levemente hipertónico.

Cabe destacar que el valor del hematocrito obtenido en las unidades CE caninas y equinas fue de 57% para ambas, valor aún adecuado para administrar la unidad CE. Si la unidad CE es muy viscosa se debe mezclar con una solución fisiológica para alcanzar una velocidad de transfusión adecuada. Este procedimiento aumenta las posibilidades de contaminación por manipulación de la unidad (Williamson 1993).

En sangre humana de similares características a las usadas en este trabajo, con 4×10^6 eritrocitos/ μL , un hematocrito de 36% y una concentración de hemoglobina de 12 g/dL también se observó el efecto de concentración de la sangre en las unidades CE leucorreducidas por el sistema Top and Bottom, ya que los valores obtenidos fueron de $6,4 \times 10^6/\mu\text{L}$, 61% y 19,6 g/dL para el número de eritrocitos, el valor del hematocrito y la concentración de hemoglobina, respectivamente (Hurtado y col 2000).

El número de leucocitos totales de la sangre de caninos disminuyó ($P < 0,05$) levemente al diluirse con la solu-

Cuadro 1. Número de eritrocitos, hematocrito, concentración de hemoglobina, VCM y CHCM en sangre de caninos y equinos, previo a la obtención en la bolsa de recolección de la unidad de sangre total y posterior al proceso de leucorreducción en la unidad de eritrocitos concentrados.

Erythrocyte count, packed cell volume, hemoglobin concentration, MCV and MCHC in blood for transfusion from dogs and horses, before obtained, in the collection bag of the total blood unit and after leukoreduction in the red blood cells concentrate.

	Caninos		Equinos	
	Promedio \pm	DE	Promedio \pm	DE
Eritrocitos (1×10^6 / μL)				
previo	6,21 ^a	0,88	8,2 ^a	1,2
unidad ST	5,46 ^b	0,71	7,8 ^a	1,1
unidad CE	8,66 ^c	2,17	11,1 ^b	1,5
Hematocrito (%)				
previo	43,2 ^a	6,1	43,2 ^a	6,5
unidad ST	36,6 ^b	5,4	39,1 ^a	6,9
unidad CE	57,0 ^c	14,7	57,3 ^b	8,1
Hemoglobina (g/dL)				
previo	13,9 ^a	1,7	13,9 ^a	1,8
unidad ST	12,7 ^b	1,5	12,9 ^a	1,8
unidad CE	20,7 ^c	4,9	18,3 ^b	2,3
VCM (fL)				
previo	69,7 ^a	2,6	50,4 ^a	1,8
unidad ST	67,1 ^b	4,4	49,7 ^a	1,9
unidad CE	65,6 ^b	2,3	51,6 ^a	1,5
CHCM (g/dL)				
previo	32,4 ^a	2,2	32,2 ^a	0,8
unidad ST	35,0 ^b	2,7	33,2 ^a	0,9
unidad CE	36,7 ^b	2,5	32,1 ^a	0,9

Letras diferentes señalan diferencias entre promedios $P < 0,05$.

ción anticoagulante, disminución que no fue significativa ($P > 0,05$) en la sangre de equinos. Posterior al proceso de leucorreducción se apreció una fuerte disminución ($P < 0,05$) en el número de leucocitos tanto de la sangre de caninos como de equinos (cuadro 2). Esta disminución permitió que en la unidad de concentrado de eritrocitos, CE, quede sólo el 4,5% y el 6,6% de los leucocitos originales de la sangre de caninos y equinos, respectivamente, señalando una eficacia promedio de 95,5% y 93,4 % de leucorreducción para las sangres de caninos y equinos, respectivamente (cuadro 3).

Lombana y col (2002) definieron que la leucorreducción es el proceso de remover sobre el 90% de los leucocitos contenidos en los hemoproductos de un Banco de Sangre de humanos, valor que coincide con los resultados obtenidos. Por otro lado, Browlee y col (2000) determinaron un 88,9% de reducción del número de leucocitos de unidades de sangre de caninos utilizando la filtración previa al almacenamiento como método de leucorreducción, no existiendo antecedentes previos en equinos

Cuadro 2. Número de leucocitos en sangre de caninos y equinos previo a la obtención, en la bolsa de recolección de la unidad de sangre total y posterior al proceso de leucorreducción en la unidad de eritrocitos concentrados.

Leukocyte count in blood for transfusion from dogs and horses before obtained, in the collection bag in the total blood unit and after leucoreduction in the red blood cells concentrate.

Leucocitos (N°/μL)	Promedio	DE	Rango	
			Mínimo	Máximo
Caninos				
previo	11550 ^a	5096	5700	22500
unidad ST	9850 ^b	3662	6100	18500
unidad CE	790 ^c	966	0	3100
Equinos				
previo	7380 ^a	1322	6000	9500
unidad ST	7000 ^a	1090	4800	8500
unidad CE	450 ^b	210	200	800

Letras diferentes señalan diferencias, entre promedios P < 0,05.

Cuadro 3: Porcentaje de leucorreducción logrado mediante el sistema Top and Bottom en unidades de concentrado de eritrocitos de sangre de 10 caninos y 10 equinos.

Percentage of leukoreduction obtained with the Top and Bottom system in erythrocyte units from 10 dogs and 10 horses.

Caso	Leucorreducción (%)	
	Caninos	Equinos
1	100,0	94,5
2	99,2	95,8
3	91,2	92,5
4	91,7	93,7
5	87,9	90,1
6	96,9	89,1
7	97,2	93,7
8	99,2	97,6
9	100,0	97,2
10	91,4	90,0
Promedio ± DE	95,5 ± 4,5	93,4 ± 3,0

El mayor porcentaje de leucorreducción fue de 100%, observado en 2 unidades CE de caninos y el porcentaje más bajo fue de 87,9% también observado en sangre de caninos. La fórmula diferencial se realizó en las muestras del concentrado de eritrocitos con un recuento >500 leucocitos/μL, donde se observaron mayoritariamente neutrófilos (60 a 90%) además de linfocitos en bajos porcentajes y escasos eosinófilos y monocitos.

La obtención de unidades CE leucorreducidas permite transfundir eritrocitos como un hemoproducto sin reacciones febriles no hemolíticas en el receptor. Además, puede evitar que se manifiesten otros tipos de reacciones

adversas a los leucocitos del donante (Benavides 2000, Bravo 2002).

Las unidades CE de sangre de humanos leucorreducidas por el sistema Top and Bottom procesadas en el Hospital Base de Valdivia presentan un número promedio de leucocitos de 1.967/ μL¹. Por otro lado el número de leucocitos obtenido por Hurtado y col (2000) en unidades CE de sangre humana fue de 1.792/μL. Al comparar estos resultados con los obtenidos en este estudio, en donde la unidad CE de sangre de caninos y equinos contiene un número promedio de 790 leucocitos/μL y 450 leucocitos/μL, respectivamente (cuadro 2), se demuestra que el método de leucorreducción utilizando el sistema Top and Bottom es más eficiente si se procesan unidades ST de sangre de caninos y equinos.

Los resultados del presente trabajo permiten concluir que el sistema Top and Bottom es eficiente para obtener, con sangre de caninos y de equinos, unidades de concentrado de eritrocitos leucorreducidos acorde con los estándares establecidos para ser utilizados en transfusiones sanguíneas.

RESUMEN

Leucorreducción es el proceso de remover los leucocitos contenidos en unidades de sangre obtenidas para transfusión con el objeto de reducir reacciones adversas. En este estudio se evaluó la eficiencia de un sistema de leucorreducción basado en centrifugación en sangre de caninos y equinos. Se emplearon 10 perros y 10 caballos clínicamente sanos. De cada animal se extrajo hasta 450 mL de sangre empleando el sistema para obtención de sangre Optipac® cuádruplex CPD/Adsol, Baxter®, depositándose 450 mL en la unidad de sangre total (ST). Posterior a una centrifugación, la unidad fue sometida a presión en el equipo Optipress®, Baxter® obteniendo el concentrado de eritrocitos leucorreducidos (CE). Muestras de 1 mL de sangre fueron obtenidas desde: 1. el tubo de recolección, 2. la bolsa con ST y 3. la bolsa con CE. En las muestras se determinó el recuento de eritrocitos, hematocrito, hemoglobina, VCM, CHCM y recuento de leucocitos empleando un analizador hematológico Sysmex KX-21N. Los datos se analizaron mediante estadística descriptiva y análisis de "t" para muestras pareadas. El concentrado de eritrocitos obtenido al final del proceso de leucorreducción tuvo un hematocrito promedio de 57% en ambas especies, manteniendo los eritrocitos sus características. El proceso de leucorreducción logró disminuir el número de leucocitos en la unidad de CE en un 95,5% y 93,7%, quedando sólo una media de 790 y 450 leucocitos/μL en la sangre de los caninos y equinos respectivamente. Estos resultados muestran que el sistema Top and Bottom es eficiente para obtener unidades de eritrocitos leucorreducidos para ser empleados en transfusiones en caninos y equinos.

AGRADECIMIENTOS

Al personal del Banco de Sangre del Hospital Base de Valdivia, por su colaboración en la realización del trabajo.

¹ Planilla de control de calidad del sistema de leucorreducción Optisystem II del Banco de Sangre del Hospital Base de Valdivia en el año 2003.

REFERENCIAS

- Benavides ME. 2000. *Optisystem: Manual de operaciones*. Gráfica y Científica Ltda., Bogotá, Colombia.
- Bravo A. 2002. Leucorreducción. ¿Para qué? ¿Cuándo? ¿Cómo? *Gac Med Mex* 138, 40-41.
- Brownlee L, K Wardrop, R Sellon, K Meyers. 2000. Use of a pre storage leukoreduction filter effectively removes leukocytes from canine whole blood while preserving red blood cell viability. *J Vet Intern Med* 14, 412-417.
- Collatos C. 2003. Blood and blood component therapy. In: Robinson N E (ed). *Current Therapy in Equine Medicine*. 4th ed. Saunders, Philadelphia, USA, Pp 290-291.
- Cotter S, M Stone. 1994. Consejos prácticos para las transfusiones. En: Kirck R (ed). *Terapéutica Veterinaria de Pequeños Animales*. 11^a ed. Interamericana, México, Pp 473-478.
- Dzik W. 2002. Leukoreduction of blood components. *Curr Opin Hematol* 9, 521-526.
- Feige K, B Ehrat, S Kastner, C Schwartzwald. 2003. Automated plasmapheresis compared with other plasma collection methods in the horse. *J Vet Med* 50, 185-189.
- García A, L Zamudio, A Aguilar. 2003. Terapia de componentes sanguíneos. *Gac Med Mex* 139, 35-40.
- Högman CF, L Eriksson, K Hedlund, J Wallvik. 1988. The bottom and top system: a new technique for blood component preparation and storage. *Vox Sang* 55, 211-217.
- Hohenhaus A. 2000. Transfusion reactions. In: Feldman B (ed). *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, Pp 864-869.
- Hohenhaus A, V Rentko. 2002. Transfusiones sanguíneas y sustitutos de la sangre. En: Dibartola S (ed). *Terapéutica de líquidos en pequeñas especies*. 2^a ed. McGraw-Hill Interamericana, Iztapalapa, México, Pp 483-497.
- Hurtado C, S Bonard, M Soler, V Mirabet, I Blasco, M Planelles, A De Miguel. 2000. Quality analysis of blood components obtained by automated buffy-coat layer removal with a Top and Bottom system (Optipress® II). *Haematológica* 85, 390-395.
- Lombana O, L Cortez, H Diez. 2002. Evaluación del desarrollo de la refractariedad plaquetaria en pacientes con neoplasias de origen hematológico, transfundidos con concentrado de plaquetas obtenidos por el método de CB-BC en presencia o ausencia de filtros leucocitarios. *Universitas Scientiarum* 7, 17-22.
- Lubas G. 1996. Transfusión de sangre en perros y gatos. *Waltham Focus* 4, 2-9.
- Sellon D. 2000. Blood Transfusions in Large Animals. In: Feldman B. *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, USA, Pp 849-854.
- Williamson L. 1993. Highlights of blood transfusions in horses. *Compendium on Continuing Education for practicing Veterinarians* 15, 267-269.
- Zamudio L. 2003. Reacciones transfusionales. *Gac Med Mex* 139, 173-175.