

VÓLIA ANDREA RODRIGUES DE MOURA

CRIOPRECIPITADO

CONTRÔLE DE QUALIDADE NA RECUPERAÇÃO FINAL DO FATOR VIII

Trabalho apresentado como  
requisito final ao Curso de  
Especialização em Hematologia  
e Hemoterapia - Convênio UFC -  
MEC - BID III.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

NEMOCE

1988

## AGRADECIMENTOS

A Dra. Rosângela de Albuquerque Ribeiro, pela orientação na realização do trabalho;

Ao Dr. José Murilo de Carvalho Martins, pelo incentivo ao aprendizado;

A Dra. Maria da Silva Pitombeira, pela revisão do trabalho;

Ao Professor Roberto Cláudio, pela análise estatística;

A Dra. Maria Luiza Schmitt, colega do curso, pela inestimável colaboração na coleta dos dados;

A Técnica Cecília, do Setor de Fracionamento do HEMOCE, pela excelente colaboração na coleta dos dados;

A todos hemofílicos, que incognitamente contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

DAGOBERTO, CARMEM e MENDES.

# Í N D I C E

	<u>pág.</u>
1 - INTRODUÇÃO .....	05
2 - MATERIAL E MÉTODOS .....	07
2.1 - COLETA DO SANGUE .....	07
2.2 - PROCESSAMENTO .....	07
2.3 - MEDIDA DE ATIVIDADE DO FATOR VIII .....	08
2.4 - TESTES ESTATÍSTICOS .....	10
3 - RESULTADOS .....	11
4 - DISCUSSÃO .....	15
5 - CONCLUSÃO .....	17
6 - SUMMARY .....	18
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	19

## CRIOPRECIPITADO

### CONTROLE DE QUALIDADE NA RECUPERAÇÃO FINAL DO FATOR VIII

*VÓLIA ANDRÉA RODRIGUES DE MOURA\**

No período de agosto a novembro de 1988, no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará, foram dosados o fator VIII de 30 bolsas de crioprecipitados, produzidos rotineiramente, originados do congelamento de plasmas frescos a -20°C, -40°C e -80°C.

Os crioprecipitados provenientes de plasmas frescos a -20°C apresentaram uma média atividade de 125% com 50 unidades de fator VIII por bolsa.

Os crioprecipitados originados de plasmas frescos a -40°C apresentaram uma média de atividade de 138,5%, tendo uma média de 55 unidades de fator VIII por bolsa.

Os crioprecipitados originados de plasmas frescos a -80°C apresentaram uma média de atividade de 144,7%, com 57 unidades de fator VIII por bolsa.

O presente estudo verificou que o tempo do congelamento dos crioprecipitados afeta a recuperação final do fator VIII. Isto vem ressaltar a sugestão dada em 1986 por Martins et alii, sobre a necessidade de aferições periódicas do nível de fator VIII no crioprecipitado.

---

(\*) Médica do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Amapá (HEMOAP) e aluna do Curso de Especialização em Hematologia e Hemoterapia.

## 1 - INTRODUÇÃO

Uma das maiores contribuições para o tratamento da hemofilia, foi dada pela Dra. Judith Graham Pool (fig.1) e colaboradores em 1964 e 1965 (26, 28, 30). Seus trabalhos foram baseados no uso de bolsas plásticas estéreis, com sistema fechado, tendo a finalidade de separar o plasma dos elementos celulares do sangue. Este plasma submetia-se ao congelamento e posterior degelo, de onde era retirado um precipitado insolúvel no frio, contendo aproximadamente 100 unidades do fator VIII (10, 27). Sendo o crioprecipitado, uma preparação concentrada do fator VIII coagulante do sangue humano (globulina anti-hemofília (G.A.H.) (22, 26 e 28), sua produção pelos bancos de sangue constitui uma importante fonte terapêutica para os portadores da hemofilia A (1, 15, 29).

A G.A.H., tem a vantagem de ser um produto altamente ativo, específico, pouco dispendioso, administrado em pequeno volume, sem o inconveniente de causar hipervolemia (4, 6, 7, 13, 14, 17, 30).

Apesar dos avanços técnicos na hemoterapia, a hepatite e a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), constituem os principais inconvenientes no uso do crioprecipitado (3, 18, 21).

Embora algumas variações dos níveis do fator VIII ocorram no plasma do doador, rendimentos baixos no crioprecipitado são frequentemente devidos ao processamento técnico subótimo (31).

O presente trabalho examina a utilização da técnica de preparação do crioprecipitado, pelo setor de fracionamento do HEMOCE, influenciando na qualidade da recuperação final do fator VIII.

FIGURA I



JUDITH POOL

## 2 - MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 - COLETA DO SANGUE

O sangue foi obtido de 30 indivíduos, doadores, regularmente triados no Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), no período de 01 a 30 de agosto de 1988.

Cerca de 450ml de sangue foram colhidos em sistema de bolsas plásticas duplas da Fenwal, contendo 63 ml do anticoagulante CPD-A<sub>1</sub> (citrato de sódio - Dextrose - Fosfato monobásico de sódio - Adenina), sob agitação contínua.

### 2.2 - PROCESSAMENTO

Para a obtenção do crioprecipitado foi empregado o método de Pool e Shannon por uma modificação parcial (28). 3 (três) horas após a coleta, as 30 bolsas de sangue foram centrifugadas por 15 minutos, a 3.000 r.p.m., a 6°C, em centrífuga refrigerada DPR-6.000 da DAMON/IEC DIVISION. O plasma sobrenadante foi transferido para bolsa plástica satélite, com capacidade de 300ml.

O volume plasmático foi determinado pesando-se a bolsa plástica satélite com seu conteúdo, e subtraindo-se do peso da bolsa vazia. Uma amostra de cada exemplar de plasma fresco foi colocada em um tubo plástico e armazenada a -80°C, para posterior medida da atividade do fator VIII. Do plasma restante tomou-se a seguinte conduta:

10 bolsas foram armazenadas em freezer a -20°C, congelando em 8 horas;

10 bolsas foram armazenadas em freezer a -40°C, congelando em 2 horas;

10 bolsas foram armazenadas em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , congelando em 30 minutos.

60 dias após o congelamento, os 30 plasmas foram transferidos para um refrigerador a  $4^{\circ}\text{C}$ , onde permaneceram por 18-20 horas até o completo degelo, sendo logo após centrifugados a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos, a  $6^{\circ}\text{C}$ . O plasma sobrenadante foi passado para uma bolsa de transferência, restando o crioprecipitado e um volume adicional de 40ml. de plasma. O tempo gasto para preparação do crioprecipitado foi de 4 horas. Logo após, os mesmos foram recongelados e estocados nas seguintes temperaturas:

10 crioprecipitados a  $-20^{\circ}\text{C}$  — congelando em 4 horas;

10 crioprecipitados a  $-40^{\circ}\text{C}$  — congelando em 1 horas;

10 crioprecipitados a  $-80^{\circ}\text{C}$  — congelando em 15 minutos.

Após 15 dias, foi realizada a medida da atividade do fator VIII das bolsas.

### 2.3 - MEDIDA DA ATIVIDADE DO FATOR VIII

Para dosar a atividade do fator VIII dos plasmas e dos crioprecipitados, utilizou-se o método de Langdell (20) pela determinação do tempo de tromboplastina parcial. O plasma do hemofílico A severo, usado como substrato, foi proveniente do Instituto Santa Catarina Hemoderivados e Reagentes Ltda (Lotes 96 e 98) e a cefalina (Actin - Activated Cephaloplastin Reagent, Lote APAC - 457H) pelo laboratório da American Dade.

As amostras de plasmas e crioprecipitados foram dosadas em duplicata, em quatro diluições, onde

foi considerada a média dos resultados. O controle foi feito por uma mistura de plasmas citratados de dez adultos normais, cujas alíquotas foram estocadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  por um período máximo de quatro semanas.

Considerou-se como 100% a atividade do fator VIII do plasma controle. Diariamente uma curva-padrão foi construída, dosando as quatro diluições do plasma-controle em solução salina a 0,9%.

A atividade do fator VIII das amostras de plasmas e crioprecipitados foi determinada graficamente com o auxílio da curva padrão feita em papel duplo logarítmico (23).

O total da globulina anti-hemofílica foi expressa em unidades, sendo uma unidade definida como a atividade do fator VIII existente em 1 ml. de plasma humano normal (8). O total de unidades e a recuperação do fator VIII no crioprecipitado foram calculados da seguinte maneira (6):

$$\text{Unidades de fator VIII no plasma de origem (Up)} = \frac{\text{Fator VIII (\%)} \times \text{volume de plasma (ml.)}}{100}$$

$$\text{Unidades de fator VIII no Crioprecipitado (Uc)} = \frac{\text{Fator VIII (\%)} \times \text{volume de crioprecipitado}}{100}$$

$$\text{Recuperação do fator VIII no crioprecipitado} = \frac{Uc}{Up}$$

#### 2.4 - TESTES ESTATÍSTICOS

A descrição estatística dos dados teve por base o cálculo de algumas medidas como: média ( $\bar{X}$ ), valor mínimo ( $X_m$ ), valor máximo ( $X_M$ ) e desvio padrão ( $S$ ). Tais medidas foram calculadas para os grupos plasma fresco e crioprecipitado, tanto para atividade do fator VIII como para unidade do fator VIII.

### 3 - RESULTADOS

30 bolsas de crioprecipitados foram analisadas em diferentes temperaturas de congelamento, com relação ao plasma fresco de origem, e obtivemos os seguintes resultados:

A) Quanto a Atividade Pro-coagulante do Fator VIII:

a  $-20^{\circ}\text{C}$  = o plasma fresco de origem apresentou uma média de 83,1% de atividade, variando de 63 a 100%, enquanto que o crioprecipitado apresentou uma média de 125% de atividade, variando de 53 a 175,3%;

a  $-40^{\circ}\text{C}$  = o plasma fresco de origem apresentou uma média de 97,6% de atividade, variando de 60 a 182%, enquanto que o crioprecipitado apresentou uma média de 138,5% de atividade, variando de 65 a 189,3%;

a  $-80^{\circ}\text{C}$  = o plasma fresco de origem apresentou uma média de 86,1% de atividade, variando de 57 a 147% e o crioprecipitado apresentou uma média de 144,7% de atividade, variando de 88 a 182%.

B) A determinação em Unidades de Fator VIII mostrou:

a  $-20^{\circ}\text{C}$  = o plasma fresco de origem com uma média de 163,7 unidades de fator VIII, variando de 124,1 a 197, enquanto que o crioprecipitado apresentou uma média de 50 unidades, variando de 21,2 a 70,1;

a  $-40^{\circ}\text{C}$  = o plasma fresco de origem apresentou uma média de 191,5 unidades de fator VIII, variando de 111,2 a 358,5 e o crioprecipitado apresentou uma média de 55,4 unidades, variando de 26 a 75,7;

a  $-80^{\circ}\text{C}$  = o plasma fresco de origem apresentou uma média de 169,7 unidades de fator VIII, variando de 112,3 a 289,6 e o crioprecipitado uma média de 57,9 unidades, variando de 35,2 a 72,8.

Todos os resultados estão expressos nas Tabelas I e II e nos gráficos I e II.

DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA ATIVIDADE PRO-COAGULANTE  
DO FATOR VIII NO PLASMA FRESCO DE ORIGEM E NO CRIOPRECI-  
PITADO EM DIFERENTES TEMPERATURAS

TABELA-I

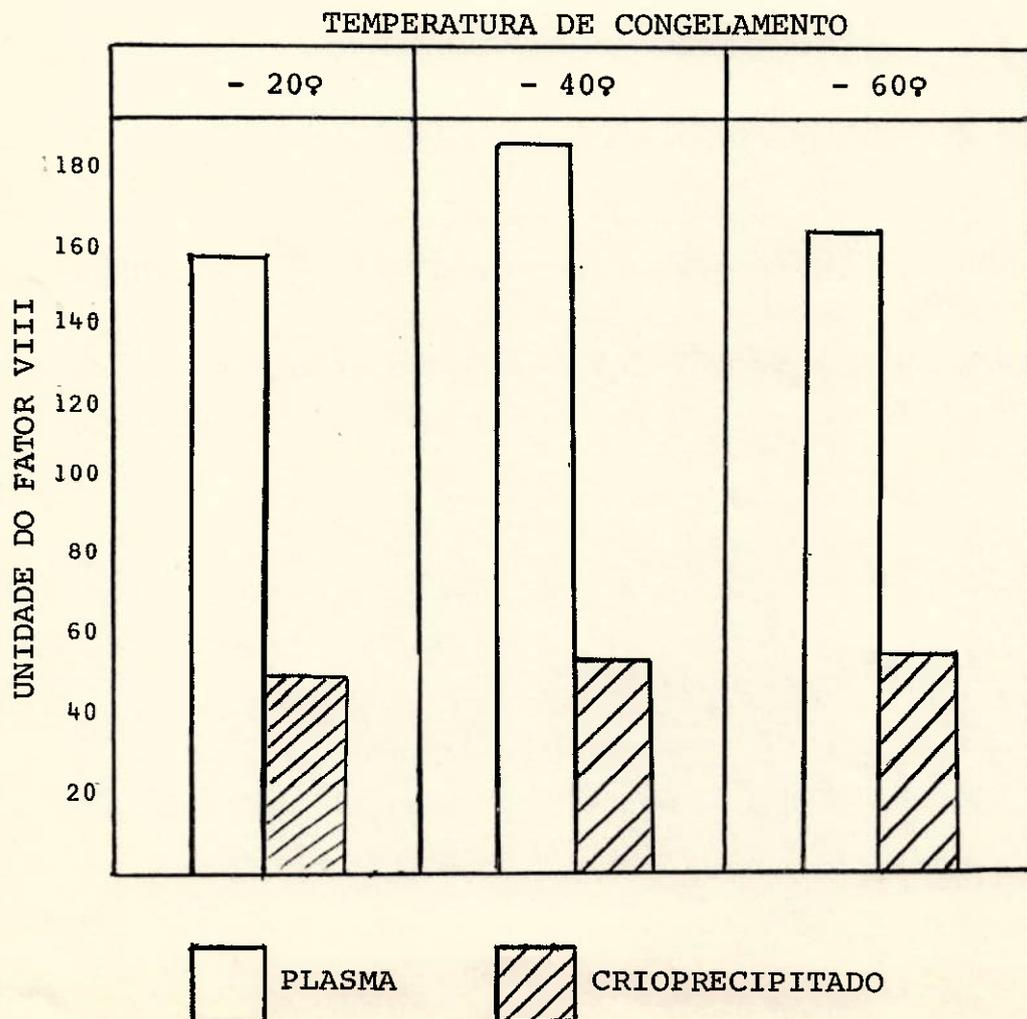
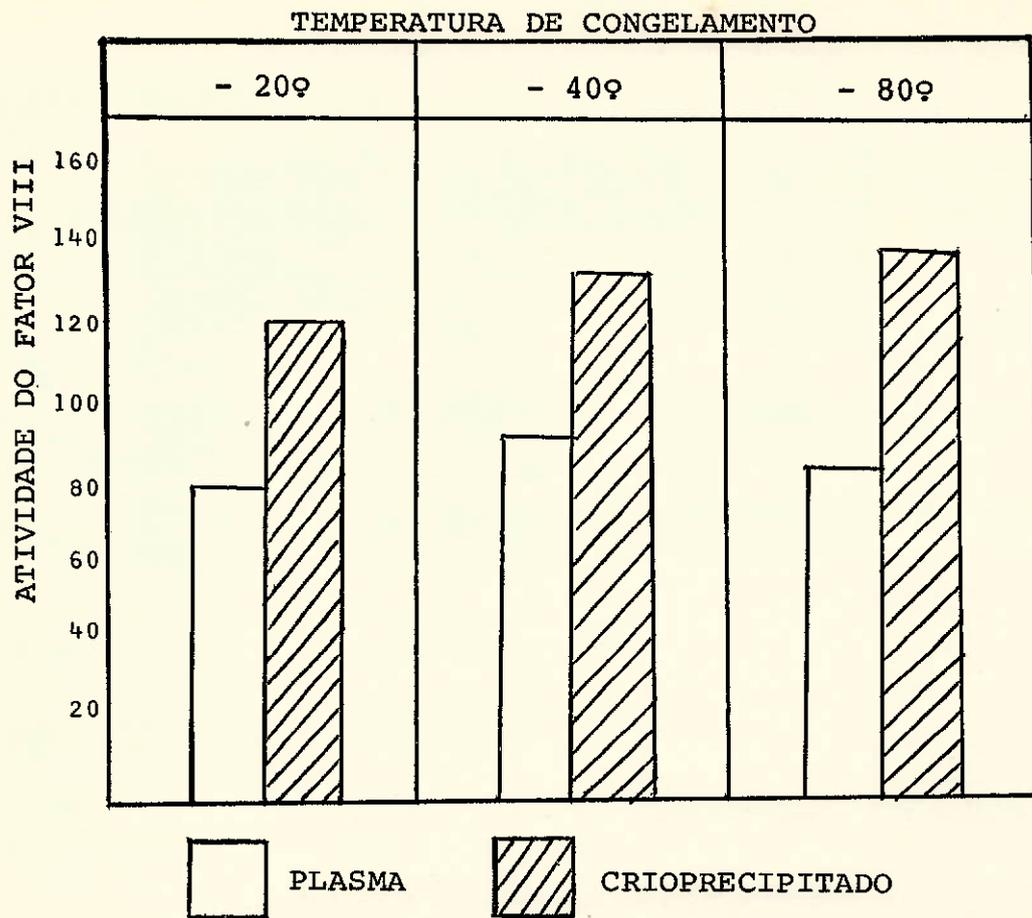
	- 20º				- 40º				- 80º			
	$\bar{X}$	Xm	XM	S	$\bar{X}$	Xm	XM	S	$\bar{X}$	Xm	XM	S
PLASMA FRESCO DE ORIGEM	83,1	63,0	100,0	10,7	97,6	60,0	182,0	32,2	86,1	57,0	147,0	26,1
CRIOPRECIPITADO	125,0	53,0	175,3	38,4	138,5	65,0	189,3	37,1	144,7	88,0	182,0	25,0

DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DA UNIDADE DE FATOR VIII NO  
 PLASMA FRESCO DE ORIGEM E NO CRIOPRECIPITADO EM DIFEREN

TES TEMPERATURAS

TABELA-II

	- 20º				- 40º				- 80º			
	$\bar{X}$	Xm	XM	S	$\bar{X}$	Xm	XM	S	$\bar{X}$	Xm	XM	S
PLASMA FRESCO DE ORIGEM	163,7	124,1	197,0	21,0	191,5	111,2	358,5	64,4	169,7	112,3	289,6	51,4
CRIOPRECIPITADO	50,0	21,2	70,1	15,3	55,4	26,0	75,7	14,8	57,9	35,2	72,8	10,0



#### 4 - DISCUSSÃO

Não é de boa prática hemoterápica a análise de todos os crioprecipitados produzidos no setor de fracionamento dos bancos de sangue, devido a exposição deste hemoderivado a contaminação bacteriana (10). Contudo, um programa de controle de qualidade deverá ser estabelecido pela dosagem de uma amostra da produção mensal. O Código Federal de Regulamentos (21 CFR 640-36) dos Estados Unidos, recomenda um mínimo de 80 unidades de fator VIII por bolsa de crioprecipitado (2). Uma unidade foi definida como correspondente a atividade do fator VIII em 1 ml de plasma normal (8, 12).

Vários trabalhos propuseram modificações na técnica original de preparação do crioprecipitado, garantindo uma melhor recuperação final do nível de fator VIII (5, 9, 19, 22, 24, 25, 32, 33). Esta recuperação é afetada tanto pela técnica do processamento quanto pelos níveis de fator VIII do doador (11, 16). Como já foi descrito na literatura (12, 18, 31) e como ficou demonstrado neste trabalho, as técnicas de congelamento e descongelamento do plasma fresco de origem e recongelamento do crioprecipitado, são de importância crítica.

No presente estudo, verificou-se que a técnica do recongelamento do crioprecipitado afetou diretamente a recuperação final da globulina anti-hemofílica, uma vez que os níveis encontrados nos plasmas de origem foram satisfatórios, enquadrando-se dentro da normalidade que varia de 50 a 200 por cento (19).

Foram analisadas todas as etapas do processamento, desde a coleta do sangue até o recongelamento do crioprecipitado. Observou-se que:

- a) o intervalo da coleta ao fracionamento do sangue foi de 4 horas, portanto, dentro das normas internacionais, que estipula um prazo de 4 a 6 horas, permitindo um bom nível de recuperação do fator VIII (4, 10, 31);
- b) a finalidade do uso dos três diferentes tipos de congela

mento, deveu-se ao fato de que a temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  foi uma técnica muito usada no setor de fracionamento do HEMOCE, e ainda funciona como medida emergencial, quando ocorre algum defeito técnico com o freezer a  $-40^{\circ}\text{C}$ . O freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$ , gentilmente cedido pelo projeto HOPE, foi utilizado como padrão de temperatura de congelamento (31).

Verificou-se uma queda acentuada na recuperação do fator VIII do crioprecipitado nas três temperaturas dadas acima, onde:

- a) a  $-20^{\circ}\text{C}$  encontramos uma média de 50 unidades de fator VIII por bolsa, com valor mínimo de 21 unidades e máximo de 70 unidades;
- b) a  $-40^{\circ}\text{C}$  encontramos uma média de 55 unidades, variando de 26 unidades a 75 unidades;
- c) a  $-80^{\circ}\text{C}$  encontramos uma média de 58 unidades, com a amplitude de 35 a 73 unidades.

Acredita-se que a discrepância entre os valores máximo das unidades de fator VIII obtidos a  $-40^{\circ}\text{C}$  e  $-80^{\circ}\text{C}$  deveu-se ao fato do freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  não estar situado no mesmo local do processamento, havendo um retardo no recongelamento e possível perda de atividade do fator VIII.

Um estudo similar realizado em 1986 por Martins et alii, no mesmo laboratório do HEMOCE, mostrou uma média de 58 unidades de fator VIII a  $-20^{\circ}\text{C}$  e uma média de 92 unidades a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Estes achados quando comparados com os dados atuais, denunciam falência técnica no processamento, sendo a recuperação do fator VIII afetada diretamente pelo tempo gasto para o recongelamento do crioprecipitado. Esta demora no recongelamento, de 3 horas, quando o exigido é de no máximo 1 hora (2, 19) é devido a carência de recursos humanos, uma vez que, no momento, o setor de fracionamento do HEMOCE, no turno da manhã, depende do trabalho de um só assistente técnico.

**5 - CONCLUSÃO**

Verificou-se a influência do tempo de recongelamento do crioprecipitado, afetando a recuperação final do nível de fator VIII, e que seu controle de qualidade é de grande importância para que seja garantida ao paciente hemofílico uma terapêutica de reposição mais adequada, assegurando ao médico a confiabilidade do seu trabalho.

06 - SUMMARY

From August to November, 1988, in Hematology and Blood Therapy Center of Ceará (Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará), the factor VIII of 30 cryoprecipitated bag, habitually produced, coming from fresh plasmas at - 20°C, - 40°C and - 80°C, were dosed.

The Cryoprecipitated coming from fresh plasmas at - 20°C presented an activity medium of 125%, with 50 unities of factor VIII per bag.

The cryoprecipitated coming from fresh plasmas at -40°C presented an activity medium of 138,5%, with a medium of 55 unities of factor VIII per bag.

The cryoprecipitated coming from fresh plasmas at - 80°C presented an activity medium of 144,7%, with 57 unities of factor VIII per bag.

The present study verified that the refreezing time of cryoprecipitated affects the final recuperation of factor VIII. This comes emphasize the sugestion given in 1986 by Martins et alii about the necessity of periodical gauging of factor VIII level in cryoprecipitated.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALEDORT, J.M. Current concepts in diagnosis and management of haemophilia. Hosp Prac. 17: 77-92, 1982;
02. AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. Technical manual. 8 ed. Washington, 1981;
03. \_\_\_\_\_ Technical Workshop on new developments in the treatment of plasma coagulation disorders. Arlington.VA, 1988;
04. AVOY, D.R. et alii. The effect of delayed refrigeration on red blood cells, platelet concentrates and cryoprecipitable AHF. Transfusion. 18(2): 160-168, 1978;
05. BASS, H. et alii. Microwave - thawed plasma for cryoprecipitate production. Vox Sang. 48: 65-71, 1985;
06. BENNETTE, E. et alii. Cryoprecipitate and the plastic blood-bag. System: provision of adequate replacement therapy for routine treatment of haemophilia. Br. Med. J. 2:88-91, 1967;
07. BIGGS, R., RIZZA, C.R.C. et alii. Factor VIII concentrates made in the United Kingdom and the treatment of haemophilia based on studies made during. 1969 - 72. Br. J. Haematol. 27(3) : 391-405, 1974;
08. BIGGS, R., RUSH, B.M. et alii. Further experience in use of human antihæmophilic globulin (H.A.H.G.) for the control of bleeding after dental extraction in hæmophilic patients. Lancet 1: 969-974, 1965
09. BROWN, D.L. et alii. Antihæmophilic globulin: preparation by an improved cryoprecipitation method and clinical use. Br. Med.J. 2: 79-85, 1967;

10. BURKA, E.R. et alii. A protocol for cryoprecipitate production  
Transfusion. 15(4) : 307-311, 1975;
11. BURKA, E.R., PUFFER, T. & MARTINEZ, J. The influence of donor characteristics and preparation methods on the potency of human cryoprecipitate. Transfusion. 15(4) : 323 - 328, 1975;
12. CARLEBJÖRK, G., BLOMBÄCK, M. & PIHLSTEDT, P. Freezing of plasma and recovery of factor VIII. Transfusion. 26 (2):159-162, 1986;
13. COOKE, J.V., HOLLAND, P.V. & SHULMAN, N.R. Cryoprecipitate concentrates of factor VIII for surgery in hemophiliacs. Ann. Inter. Med. 68: 39-47, 1969;
14. DALLMAN, P.R. & POOL, J.G. Treatment of hemophilia with factor VIII concentrates. Engl. J. Med. 278: 199-202, 1968;
15. FARRUGIA, A., PROWSE, C. Studies on the procurement of blood coagulation factor VIII: effects of plasma freezing rate and storage conditions on cryoprecipitate quality. J. Clin. Pathol. 38: 433-437, 1985;
16. GRAYBEAL, F.Q., MODRESIDE Jr., D.E., & LANGDELL, R.D. Clotting Factor activity in cryoprecipitates and supernatant plasma prepared from blood collected into ACD, ACD-adenine, CPD and CPD-adenine and from plasma collected by plasmapheresis. Transfusion. 9(3):135-140, 1969;
17. HATTERSLEY, P.G., the treatment of classical hemophilia with cryoprecipitates. Laboratory control with readily available tests. JAMA. 198 (3): 243-247, 1966;
18. KASPER, C.K., & DIETRICH, S.L. Comprehensive management of haemophilia. Clin. Haematol. 14(2) : 489-512, 1985;
19. KASPER C.K., et alii. Determinants of factor VIII recovery in cryoprecipitate. Transfusion. 15(4): 312-322, 1975;

20. LANGDELL, R.D., WAGNER, R.H. & BRINKHOUS, K.M. Effect of anti hemophilic factor on one-stage clotting Tests. J. Loab. Clin. Med. 41: 631-647, 1953;
21. LEVINE, P.H. The acquired immunodeficiency syndrome in persons with hemophilia. Ann. Inst. Med. 103: 723 - 726, 1985;
22. MASON, E.C. Thaw-Siphon Technique for production of cryoprecipitate concentrate of factor VIII. Lancet. 2(8079): 15 - 27, 1978;
23. MARTINS, J.M.C. et alii. Crioprecipitado. Influência da temperatura de congelamento do plasma sobre a recuperação final do fator VIII. HEMO Inform. 24(4):10-21, 1986;
24. OFOSU, F.A. et alii. Use of plasma segments for estimating factor VIII activity in pools of fresh frozen plasma. Vox Sang. 52: 254-256, 1987;
25. POOL, J.G. The effect of several variables on cryoprecipitated factor VIII (AHG) concentrates. Transfusion. 7(3)165-167, 1967;
26. POOL, J.G., HERSHGOLD, E.J. & PAPPENHAGEN, A.R. High - Potency antihaemophilic factor concentrate prepared from cryoglobulin precipitate. Nature. 203 : 312, 1964;
27. POOL, J.G. & ROBINSON J. Observations on plasma banking and transfusion procedures for haemophilic patients using a quantitative assay for antihaemophilic globulin (AHG). Br. J. Haematol. 5: 24-30, 1959;
28. POOL, J.G. & SHANNON, A.E. Production of high-potency concentrates of antihemophilic globulin in a closed-bag system. Assay in vitro and in vivo. New Engl. J. Med. 273 (27) : 1443-1447, 1965;

29. RIZZA, C.R., SPOONER, R.J.D. Treatment of haemophilic and related disorders in Britain and Northern Ireland during 1976-80: report on behalf of the directors of haemophilia centres in the United Kingdom. Br. Med.J. 286:929.3;
30. ROBERTS, H.R. Cryoprecipitate for the treatment of classic hemophilia: a contribution of Judith Pool. Vox Sang. 55: 48-49, 1988;
31. SLICHTER, S.F. et alii. Preparation of cryoprecipitate factor VIII concentrates. Transfusion. 16(6): 616-626, 1976;
32. STRAND, C.L. et alii. Production of high-potency cryoprecipitate from exercised blood donors and the treatment of haemophilia A with this material. Ar. J. Clin. Pathol. 62 (4):496-501, 1974;
33. ROCK, G. Influence of the primary anticoagulant on the recovery of factor VIII. Vox Sang. 54:125-126, 1988.