

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ – HEMOCE

**AVALIAÇÃO DOS FILTROS DE LEUCODEPLEÇÃO NOS
CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS NA ROTINA DO
HEMOCE.**

CHRISTIANE MARIA PASSOS MARCOS

FORTALEZA- CE

2001

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
CENTRO DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA DO CEARÁ – HEMOCE

**AVALIAÇÃO DOS FILTROS DE LEUCODEPLEÇÃO NOS
CONCENTRADOS DE HEMÁCIAS NA ROTINA DO
HEMOCE.**

CHRISTIANE MARIA PASSOS MARCOS

**Monografia apresentada como requisito
final do curso de Especialização
em Hematologia e Hemoterapia
ministrado pelo HEMOCE juntamente
à Universidade Federal do Ceará.**

**Orientador:
Marcos Antônio Martins da Silva.**

**Co-Orientador:
Dr^a Luciana Maria de Barros Carlos.**

FORTALEZA- CE

2001

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, pela dedicação, paciência e compreensão com que sempre compartilharam dos meus sonhos e aspirações.

AGRADECIMENTOS

A professora Dr^a Geane Matos de Andrade Cunha pela dedicação de seu tempo e de sua experiência para que este trabalho fosse concluído com êxito.

A todos os profissionais e funcionários do Setor do Fracionamento pela imprescindível colaboração para a execução deste trabalho.

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira com que respondemos ao desafio. Somos combatentes, idealistas, mas plenamente conscientes. Porque o ter consciência não nos obriga a sermos conscientes. Problemas para vencer, liberdade para provar. E, enquanto acreditamos no nosso sonho, nada é por acaso.” **(Henfil)**

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

RESUMO

1- INTRODUÇÃO.....	9
2- REVISÃO DA LITERATURA.....	11
3- OBJETIVO.....	19
4- MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1- Casuística.....	20
4.2- Preparação do concentrado de hemácias.....	20
4.3- Filtração.....	21
4.4- Materiais e Equipamentos.....	22
4.5- Métodos.....	23
4.5.1- Dosagem de Hemoglobina.....	23
4.5.2- Determinação do microhematócrito.....	23
4.5.3- Contagem de Leucócitos antes da filtração.....	24
4.5.4- Contagem de Leucócitos depois da filtração.....	24
4.5.5- Determinação do Volume.....	25
4.5.6- Análise Estatística.....	25
5- RESULTADOS.....	27
6- DISCUSSÃO.....	32
7- CONCLUSÃO.....	34
8- ABSTRACT.....	35
9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
10- ANEXOS.....	39

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 1- Relação entre a redução logarítmica e eficiência de remoção dos leucócitos.....Pag.13.

Tabela 2- Número de leucócitos nos concentrados de hemácias antes e depois da filtração.....Pag.31.

Figura 1- Filtração dos concentrados de hemácias.....Pag.21.

Figura 2- Volume(mL) dos concentrados de hemácias antes e depois da filtração.....Pag.28.

Figura 3- Dosagem de Hemoglobina(g/unid) dos concentrados de hemácias antes e depois da filtração.....Pag.29.

Figura 4- Valor do Hematócrito (%) dos concentrados de hemácias antes e depois da filtração.....Pag.30.

RESUMO

Os leucócitos presentes nos componentes sangüíneos são responsáveis pela ocorrência de certas reações transfusionais, como a reação transfusional febril não-hemolítica, a aloimunização e refratariedade à transfusão de plaquetas, a doença enxerto-versus-hospedeiro e efeitos imunomodulatórios. Além disso, os leucócitos podem ser vetores de transmissão de agentes infecciosos, como o citomegalovírus, o HTLV I/II e o EBV. Para prevenir estes efeitos adversos, a filtração de sangue permite a produção de produtos sangüíneos leucodepletados com remoção de 99,99% de leucócitos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência dos filtros utilizados na rotina do HEMOCE para a remoção de leucócitos em concentrados de hemácias. Foram testados 30 filtros SEPACELL (4C2300) lote nº A99E17021, no período de 1 a 30 de Novembro de 2000 utilizando-se 30 concentrados de hemácias de doadores com hemoglobina de mobilidade eletroforética normal e estudos sorológico negativo para Sífilis, Chagas, AIDS, HTLV I/II e Hepatites B e C. Analizando-se o tempo de filtração, volume de sangue perdido, a dosagem de hemoglobina, o hematócrito e a contagem de leucócitos, verificamos que os resultados obtidos estão de acordo com o que preconiza a literatura, pois obtivemos uma remoção de 99,98% de leucócitos que equivale a uma leucorredução de $4 \log_{10}$, assegurando a eficácia do filtro e, conseqüentemente a garantia da qualidade do produto final.

1- INTRODUÇÃO

A opção medicamentosa no tratamento das doenças tem sido uma grande preocupação de cientistas e pesquisadores em decorrência dos efeitos adversos que podem ocorrer em maior ou menor intensidade no organismo.

As reações transfusionais decorrentes do tratamento com a utilização de sangue e de seus hemoderivados não fogem à regra, pois, são considerados medicamentos.

Estudos mostraram que várias complicações das transfusões sangüíneas eram resultantes da exposição do receptor aos leucócitos do doador através dos componentes sangüíneos, principalmente, concentrados de hemácias e plaquetas, surgindo desta forma o desafio de se conseguir remover os leucócitos indesejáveis a fim de se evitar a ocorrência de diversas reações transfusionais como: reação transfusional febril não-hemolítica, aloimunização, refratariedade à transfusão de plaquetas, doença enxerto-versus-hospedeiro pós-transfusional, transmissão de agentes infecciosos como o citomegalovírus (CMV), vírus Epstein-Barr (EBV), vírus dos linfócitos T humanos tipo I e II (HTLV I/II) e efeitos imunodulatórios.

Com o evoluir da ciência, várias técnicas para reduzir o número de leucócitos em componentes sangüíneos foram desenvolvidas e, recentemente, o avanço tecnológico e científico permitiu o desenvolvimento de filtros com capacidade de proporcionar uma baixa perda de hemácias combinada com uma profunda redução de leucócitos em até 99%, mostrando que a filtração é, sem dúvida, o mais simples e mais eficiente método para reduzir os leucócitos nas suspensões de células sangüíneas.

Seguindo as normas do Manual Técnico da Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB Standars Committee, 1999), os concentrados de hemácias leucodepletados devem ter níveis de leucócitos menor do que 5×10^6

por unidade transfundida e reter pelo menos 85% do número original de hemácias.

As razões expostas, conduzem à execução de testes que assegurem a eficácia dos filtros utilizados nas rotinas dos Bancos de Sangue a fim de manter um padrão de qualidade do produto final.

2- REVISÃO DA LITERATURA

Desde o início da história da humanidade, o sangue foi associado ao conceito de vida, passando esta associação a fazer parte do patrimônio do inconsciente coletivo do homem, como atestam a grande variedade de mitos e símbolos presentes em todas as culturas humanas (Junqueira, 1979).

Os povos primitivos untavam-se, banhavam-se, bebiam o sangue de jovens e bravos guerreiros para se beneficiarem de suas qualidades (Junqueira, 1979).

Após Harvey Ter descrito a circulação, alguns pesquisadores começaram a cogitar das possibilidades de passar o sangue de um animal para outro. Dentre estes pesquisadores, sobressaiu-se Richard Lower (Junqueira, 1979).

Em 1667 Jean Denis, médico de Luiz XIV, relatou casos em que o sangue de animal fora usado no homem e também fez o primeiro relato de uma reação hemolítica pós-transfusional (Junqueira, 1979).

Um novo marco foi em 22 de dezembro de 1818, quando James Blundell relatou em Londres uma transfusão de sangue de um homem para outro. Entretanto, o emprego do sangue como agente terapêutico tomou grande vulto através de uma base científica, a imunológica, adquirida a partir da descoberta por Landsteiner dos grupos sanguíneos ABO, identificando seus antígenos e anticorpos, estabelecendo a compatibilidade e a incompatibilidade entre os sangues dos indivíduos da espécie humana (Junqueira, 1979).

Somente em 1914, Luis Agote iniciou o uso do sangue citratado dando início assim a um novo período, permitindo desse modo a preservação do sangue *in vitro* para ser usado no momento apropriado (Junqueira, 1979).

O conhecimento cada vez maior da morfofisiologia dos componentes do sangue, e das exigências para preservá-los *in vitro* de tal maneira que, no organismo do receptor tenham sobrevivência normal, demonstrou a impossibilidade de mantê-los juntos em uma unidade de Sangue Total,

armazenada a 4°C. Daí, a necessidade de novos recursos que permitissem uma eficiente e segura separação dos componentes do sangue para preservá-los corretamente (Junqueira, 1979).

Sabe-se que o sangue e os componentes sangüíneos são considerados medicamentos, porque são empregados no tratamento de patologias. Da mesma forma que ocorre com outros medicamentos, podem ocorrer efeitos adversos, gerando a necessidade da cuidadosa consideração do binômio risco/benefício quando se lança mão do sangue para a terapia (Harmening, 1992).

Durante muitos anos, as transfusões de hemocomponentes contendo grande quantidade de leucócitos foram consideradas uma prática inevitável do ato transfusional. Com o desenvolvimento das metodologias para separar os vários componentes do sangue, ocorreu uma mudança radical na terapia transfusional e um avanço na qualidade do produto obtido, devido à constatação de que cada um dos elementos do sangue apresentam efeitos terapêuticos, mas também efeitos indesejáveis (Omoto, 1997b).

A ocorrência e os mecanismos fisiopatológicos de certas reações biológicas observadas em pacientes submetidos à transfusão sangüínea têm sido associadas à presença de leucócitos nos hemocomponentes alogênicos transfundidos (Bordin, 1997), daí surgiu a necessidade de se realizar a desleucotização que significa a obtenção de um componente pela remoção da maioria dos leucócitos de um concentrado de hemácias (Guide, 1999).

Hoje se sabe que, componentes sangüíneos pobres em leucócitos podem ser preparados de diversas maneiras como por exemplo a centrifugação invertida, lavagem de hemácias, centrifugação e filtração de microagregados, uso de filtros de terceira geração e hemácias congeladas e desglicerolizadas, sendo o uso dos filtros de terceira geração o método mais indicado por serem capazes de diminuir os níveis leucocitários a menos de 5%, ou seja, remove aproximadamente 95 a 99% dos leucócitos (Lee, 1998). Numerosos filtros são

comercialmente úteis e estão sendo aperfeiçoados, pois, a filtração é sem dúvida a técnica mais simples e mais eficiente para reduzir leucócitos nas suspensões de células sangüíneas (Masse, 1991). Diante disso, alguns investigadores sugerem que, previamente à transfusão, todas as unidades de hemácias ou plaquetas alogênicas devem ser filtradas com filtros leucocitários uma vez que o processo de filtração parece não modificar a qualidade funcional dos componentes sangüíneos submetidos à filtração e que, possivelmente, a remoção dos leucócitos (desleucotização) pode prevenir a ocorrência de certas reações transfusionais (Bordin, 1997).

De acordo com o Manual Técnico da Associação Americana de Bancos de Sangue (AABB Standars Committee, 1999), concentrados de hemácias leucodepletados devem ter nível de leucócitos menor que 5×10^6 por unidade transfundida e o método de leucodepleção deve reter pelo menos 85% das hemácias originalmente presentes no hemocomponente.

Filtros de concentrados de hemácias têm sido aperfeiçoados para que se consiga uma elevada remoção de leucócitos, combinada com uma baixa perda de hemácias (Reesink, 1982).

A taxa de remoção dos leucócitos pode ser medida através de uma escala logarítmica. A tabela 1 mostra a relação entre a redução logarítmica e eficiência de remoção (Omoto, 1997b).

TABELA 1- Relação entre a redução logarítmica e eficiência de remoção dos leucócitos.

Log	Taxa de remoção (%)
Redução de 1 log	90,0
Redução de 2 log	99,0
Redução de 3 log	99,9
Redução de 4 log	99,99
Redução de 5 log	99,999

Fonte: Fundação Pró-sangue Hemocentro de São Paulo

Recentes estudos indicam que os filtros redutores de leucócitos chamados de filtros de terceira geração, conseguem consistentemente uma redução de mais que $3 \log_{10}$ (Rapaille, 1997).

Filtros com capacidade de remoção de 3-4 log estão disponíveis comercialmente, e novas gerações de filtros estão em contínuo desenvolvimento. O procedimento é simples, rápido, clinicamente efetivo, não requer equipamentos caros e muito superior a outros métodos (Omoto, 1997a).

Os filtros de última geração são compostos de várias camadas de fibras de poliéster de alto grau de biocompatibilidade, selecionados por sua característica especial de formarem um único e eficiente filtro de leucócitos. A primeira camada de baixa densidade remove microagregados, plaquetas e uma grande porção de leucócitos, particularmente os granulócitos. A segunda camada remove os leucócitos remanescentes e assegura que o sangue seja completamente distribuído através do filtro, minimizando a possibilidade de rompimento por estresse e trauma. A terceira camada completa a remoção de leucócitos, particularmente os linfócitos, assegurando a eficiência da remoção para transfusão instantânea. A última camada assegura um fluxo de liberação ótima de sangue através da porta de saída do filtro (Omoto, 1997a).

O uso de hemocomponentes leucodepletados é indicado para prevenir reações biológicas, tais como: reação transfusional febril não-hemolítica, aloimunização e refratariedade à transfusão de plaquetas, doença enxerto-versus-hospedeiro pós-transfusional, transmissão de agentes infecciosos (CMV, EBV, HTLV I/II) e efeitos imunodulatórios. Além disso, a filtração pode auxiliar a remoção de bactérias e do *Trypanossoma cruzi* (Moraes, 1995).

A aloimunização é definida como a formação de anticorpos contra antígenos classe I do sistema HLA, que se formam em todas as células

nucleadas e plaquetas, ou contra antígenos específicos leucocitários não pertencentes ao sistema HLA (Omoto, 1997a).

A reação transfusional febril não-hemolítica é a principal manifestação clínica da aloimunização decorrente da transfusão de leucócitos e é precedida pela formação de anticorpos contra o sistema HLA dos leucócitos do doador após a transfusão. Uma vez o paciente imunizado, transfusões sangüíneas adicionais freqüentemente causam uma reação entre os leucócitos do doador e os anticorpos presentes no sangue do receptor. A gravidade da reação depende principalmente do número absoluto de leucócitos presentes no sangue transfundido, podendo, em alguns casos, ser fatal (Omoto, 1997a).

Clinicamente, as reações transfusionais febris não-hemolíticas são mais comuns em pacientes politransfundidos como aqueles com β talassemia maior e após a gravidez (Norfolk, 1995).

A doença do enxerto versus hospedeiro é uma espécie de reação de incompatibilidade em um indivíduo de baixa competência imunológica, que foi receptor de tecido linfóide imunologicamente competente de um doador que carece de pelo menos um antígeno possuído pelo hospedeiro receptor; a reação, ou doença, é o resultado da ação das células transplantadas para as do tecido do hospedeiro que possui o antígeno inexistente no doador (Stedman, 1996).

Estudos *in vitro* sugerem que a redução do número de linfócitos mediante uso de filtros leucocitários pode diminuir o risco de doença enxerto-versus-hospedeiro associada à transfusão de hemocomponentes alogênicos, embora essa complicação transfusional já tenha sido descrita em paciente transfundido exclusivamente com produtos hemoterápicos submetidos à filtração que removeu mais de 99% dos leucócitos (Akahoshi, 1992).

O uso de filtros leucocitários pode prevenir a transmissão de agentes infecciosos localizados primariamente em leucócitos, incluindo o

citomegalovírus (CMV), o vírus Epstein-Barr (EBV) e o vírus dos linfócitos humanos T tipo I e II (HTLV I/II) (Bordin, 1997).

A carga mínima de vírus necessária para causar uma infecção ativa após transfusões não é conhecida. Estudos têm demonstrado que a remoção de leucócitos por filtração de hemocomponentes diminui a incidência da infectividade do vírus HIV-I em experimentos *in vitro*, previne a infecção pelo CMV em doenças malignas hematológicas e previne a transmissão do vírus HTLV-I (Omoto, 1997a).

A transmissão do citomegalovírus (CMV) por produtos sanguíneos pode ser fatal em pacientes imunocomprometidos. O vírus é carregado pelos leucócitos dos doadores particularmente granulócitos e monócitos. A proporção de doadores soronegativos para o CMV tem células mononucleares que são positivas para o DNA CMV quando separadas pela reação em cadeia de polimerase (PCR). Deste modo, há grande interesse na depleção dos leucócitos para prevenir a transmissão do CMV (Norfolk, 1995).

Existem hipóteses de que a leucodepleção pré-armazenamento através de filtros pode diminuir a chance de crescimento bacteriano durante o armazenamento do sangue, por aderência direta das bactérias ao material do filtro, ligação ou ingestão bacteriana pelos leucócitos, os quais, então, são retidos pelo filtro, liberação da bactéria intracelular durante o armazenamento do sangue não filtrado, e remoção pelo filtro de fragmentos de pele contaminados com bactérias (Omoto, 1997b).

A redução do risco de crescimento bacteriano tem sido demonstrada experimentalmente com cepas de *Yersínea enterocolítica* em concentrados de hemácias armazenados a 4°C, cujos resultados menos convincentes têm sido obtidos com outras cepas de bactérias e com concentrados de plaquetas armazenados a 22°C (Omoto, 1997b).

Os objetivos clínicos para o uso de hemocomponentes leucodepletados devem ser atingidos com o suporte destes produtos com qualidade assegurada. Portanto, há necessidade de se dispor de técnicas sensíveis de contagem dos leucócitos residuais (Omoto, 1997b).

Conforme Friedman et al e Wens e Besso têm mostrado, os métodos de contagem automatizada de células, atualmente, não são capazes de contar em baixíssima escala (Friedman, 1990; Wens, 1989). No momento, as melhores técnicas de contagem eficazes incluem os métodos de contagem na câmara de Nageotte e a Citometria de Fluxo. Estes métodos são ambos mais sensíveis e mais precisos (Rebula, 1993). Os critérios que devem ser considerados na escolha do método são: exatidão, precisão, linearidade, rapidez, simplicidade e baixo custo. Assim, a contagem em câmara de Nageotte usando o cristal violeta como corante é a técnica mais utilizada e requer somente microscópio (Omoto, 1997a).

A demanda por hemocomponentes leucodepletados tem aumentado em decorrência da comprovação da eficácia da leucodepleção para prevenção de efeitos adversos. Em algumas questões, os benefícios da remoção de leucócitos permanece incerta, como por exemplo, na prevenção do desenvolvimento da imunossupressão em pacientes recém diagnosticados como HIV positivos, evitando-se a progressão da doença (Omoto, 1997b).

Por outro lado, existe uma variedade grande de benefícios potenciais resultantes da redução de leucócitos: redução da aloimunização e suas manifestações clínicas, como a redução da incidência da reação febril pós-transfusional e prevenção da refratariedade às plaquetas; prevenção da transmissão e reativação do CMV e outras viroses (Omoto, 1997b).

Sob o ponto de vista de análise custo-eficácia, tem-se demonstrado que é mais vantajoso utilizar hemocomponentes leucodepletados em pacientes com leucemia mieloide aguda ou após transplante de medula óssea, para evitar

condições que possam prejudicar a eficácia da terapia transfusional ou causar uma morbidade significativa no paciente. Em outros casos clínicos, os estudos da análise custo-eficácia da aplicação de filtros para remoção dos leucócitos deverão ser ampliados, visto que este método tem se apresentado como o método de escolha para obtenção do hemocomponente leucodepletado (Omoto, 1997b).

3- OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência dos filtros SEPACELL (4C2300), Lote A99E17021, fornecidos pela Baxter Hospitalar LTDA, utilizados para remoção de leucócitos em concentrados de hemácias do HEMOCE, esperando-se uma contagem residual de leucócitos consistentemente menor que 5×10^6 /unidade a fim de assegurar a qualidade dos hemocomponentes leucodepletados.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- CASUÍSTICA:

Foram analisados 30 filtros SEPACELL (4C2300, Lote nº A99E17021) fabricados pela Baxter Healthcare Corporation, para remoção de leucócitos em concentrados de hemácias para armazenamento no Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE), no período de 01 a 30 de Novembro de 2000, utilizando-se 30 concentrados de hemácias de doadores com hemoglobina de mobilidade eletroforética normal e estudo sorológico negativo para Sífilis, Chagas, AIDS, HTLV I/II e Hepatites B e C.

4.2- PREPARAÇÃO DO CONCENTRADO DE HEMÁCIAS:

O concentrado de hemácias, produto biológico de origem humana, é um componente do sangue resultante da separação asséptica dos eritrócitos da mistura plasma/solução anticoagulante preservadora e é obtido a partir de sangue total coletado.

Para a obtenção dos concentrados de hemácias foram usadas bolsas triplas, contendo 63 mL de solução C.P.D. (Citrato de Sódio – Ácido Cítrico – Fosfato de Sódio Monobásico – Dextrose) para coleta de 450 mL de Sangue Total e 100 mL de SAG-M (Cloreto de Sódio – Manitol – Dextrose), para preservação do concentrado de hemácias em uma das bolsas satélite.

As bolsas de sangue total foram submetidas a uma centrifugação, usando 3.500 R.P.M. durante 15 minutos em centrífuga refrigerada a +4°C. Em seguida, o plasma foi decantado para uma bolsa satélite usando-se o extrator de plasma até que as hemácias se encontrassem no macarrão. À bolsa do concentrado de hemácias obtido, acrescentou-se os 100 mL de solução de Sag-Manitol que estava presente em uma das bolsas satélite e estocou-se em

geladeira com temperatura controlada e estável ($+4^{\circ}\text{C}$ a $+6^{\circ}\text{C}$) por no máximo 5 dias para se realizar a filtração.

4.3- FILTRAÇÃO:

Para se realizar a filtração, os concentrados de hemácias estocados a $+4^{\circ}\text{C}$ foram todos previamente ordenhados e homogeneizados por 10 minutos no Hemomix, pesados e, amostras de 10mL foram retiradas para se fazer as análises pré-filtração. Em seguida, os concentrados de hemácias foram filtrados (Figura.01), o tempo de filtração foi observado e, após este processo, realizou-se uma nova pesagem e retirada de nova amostra para a execução das análises pós-filtração e determinação do volume.

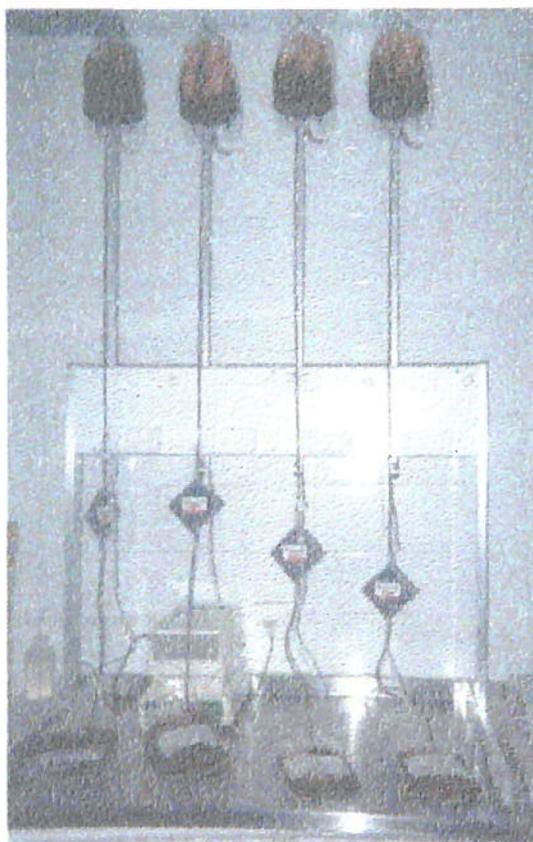


Figura 1: Filtração dos Concentrados de hemácias.

4.4- MATERIAIS E EQUIPAMENTOS:

- ✓ Câmara de Nageotte;
- ✓ Câmara de Neubauer;
- ✓ Lamínulas de cristal;
- ✓ Pipetas automáticas/ponteiras;
- ✓ Tubos de ensaio;
- ✓ Estante para tubos de ensaio e para tubos de hemólise;
- ✓ Tubos de hemólise;
- ✓ Solução de Turk;
- ✓ Tubo capilar não graduado;
- ✓ Escala para leitura do hematócrito;
- ✓ Algodão/gaze;
- ✓ Massa de modelar;
- ✓ Lápis marcador/caneta;
- ✓ Microscópio óptico;
- ✓ Centrífuga para microhematócrito;
- ✓ Homogeneizador mecânico;
- ✓ Cronômetro;
- ✓ Filtros removedores de leucócitos;
- ✓ Balança semi-analítica;
- ✓ Espectrofotômetro;

4.5- MÉTODOS:

Algumas variáveis foram medidas antes e após a filtração.

4.5.1- DOSAGEM DE HEMOGLOBINA

A hemoglobina foi dosada usando-se o Kit da Labtest diagnóstica através do método da cianometahemoglobina.

- 1) Identificar os tubos de ensaio como antes e depois da filtração;
- 2) Adiciona-se 5,0mL do Reagente de Cor de uso em todos os tubos;
- 3) Coloca-se 20 μ L das amostras de sangue previamente homogeneizadas em seus respectivos tubos;
- 4) Homogeneiza-se e espera-se 5 minutos;
- 5) Determina-se a absorbância do teste em 540nm ou filtro verde (520 a 550), acertando o zero com água destilada e o valor é obtido em g/dL;
- 6) Para se obter a porcentagem de recuperação de hemoglobina total, usou-se a fórmula: $\% = \text{HbD} \times 100/\text{HbA}$

Onde:

HbD = concentração de hemoglobina pós-filtração

HbA = concentração de hemoglobina pré-filtração

4.5.2- DETERMINAÇÃO DO MICROHEMATÓCRITO

- 1) Aspira-se, por capilaridade um pequeno volume de sangue bem homogeneizado em um tubo capilar não graduado, com 75mm de comprimento e 1,2mm de diâmetro interno, deixando vazios cerca de 15mm;
- 2) Sela-se a extremidade com massa de modelar;
- 3) Centrifuga-se por 5 a 10 minutos em alta rotação (entre 10.000 e 15.000g) em um centrifugador pequeno, especialmente projetado para esse fim;

- 4) Lê-se visualmente, em escala apropriada, excluindo-se da leitura a camada de leucócitos e plaquetas expressando o resultado em porcentagem.

4.5.3- CONTAGEM DE LEUCÓCITOS ANTES DA FILTRAÇÃO

- 1) Em tubos de hemólise devidamente identificados, pipeta-se 20 μL da amostra de concentrado de hemácias não filtrado previamente homogeneizado e adiciona-se 380 μL da solução de Turk, resultando em uma diluição de 1:20;
- 2) Homogeneizar bem e deixar em repouso por 10 minutos para que as hemácias sejam destruídas;
- 3) Agita-se por rotação os tubos de hemólise para misturar o conteúdo e enche-se a câmara de Neubauer que já deve estar previamente montada;
- 4) Espera-se 5 minutos e conta-se ao microscópio usando-se objetiva de 10X e condensador baixo, na área da câmara destinada à contagem de leucócitos;
- 5) Calcula-se o número de leucócitos por mm^3 de sangue usando-se a seguinte fórmula:

$\text{n}^\circ \text{ de leuc. contados} \times \text{inverso da diluição} \times \text{inverso da profundidade da câmara} / 4(\text{mm}^2 \text{ contados})$

4.5.4- CONTAGEM DE LEUCÓCITOS DEPOIS DA FILTRAÇÃO

- 1) Em tubos de hemólise devidamente identificados, pipeta-se 100 μL da amostra de concentrado de hemácias filtrado previamente homogeneizado e adiciona-se 900 μL da solução de Turk, resultando em uma diluição de 1:10;
- 2) Homogeneizar bem e deixar em repouso por 10 minutos para que as hemácias sejam destruídas;
- 3) Agita-se por rotação os tubos de hemólise para misturar o conteúdo e enche-se a câmara de Nageotte que já deve estar previamente montada;
- 4) Espera-se 15 minutos e conta-se ao microscópio usando-se objetiva de 20X e condensador baixo efetuando-se a contagem dos 40 retângulos da câmara.

5) Calcula-se o número de leucócitos através da seguinte fórmula:

$$\text{Leucócitos}/\mu\text{L} = L \times D/V$$

Onde:

L = número de leucócitos contados

D = fator de diluição (10)

V = volume do campo de contagem (40 retângulos = 50 μ L)

A porcentagem de remoção de leucócitos é calculada pela fórmula:

$$\% = 100 - (D \times 100/A)$$

Onde:

D = concentração de leucócitos pós-filtração

A = concentração de leucócitos pré-filtração

4.5.5- DETERMINAÇÃO DO VOLUME

O volume é medido através da relação entre a massa(g) e a densidade (g/mL) do hemocomponente.

- 1) Tarar a balança com a respectiva tara;
- 2) Pesar as bolsas e anotar os pesos;
- 3) Calcular o volume através da seguinte fórmula:

$$V = m/1,065$$

Onde: V = volume

m = massa

1,065 = densidade do concentrado de hemácias em g/mL

4.5.6- ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas dos resultados obtidos com o presente estudo foram realizados usando o programa Instat versão 2.05a, GraphPad Software e as amostras foram comparadas através do teste “ t “ de student pareado antes e

depois da filtração com 30 filtros SEPACELL (4C2300), Lote A99E17021, fornecidos pela Baxter Hospitalar LTDA.

5- RESULTADOS

Sabendo-se da importância do fluxo durante a filtração, pois um fluxo muito rápido pode diminuir a eficiência de remoção, assim como parece que um fluxo muito lento pode ocasionar a fragmentação dos leucócitos, o tempo de filtração de todas as bolsas foi observado obtendo-se uma média de 7,8 minutos por unidade filtrada.

Durante a filtração, um certo volume de sangue é perdido nas malhas do filtro. Houve uma diminuição significativa ($p < 0,0001$) nos volumes dos concentrados de hemácia submetidos a filtração pelos filtros SEPACELL (4C2300), correspondendo a um valor em percentagem de 22,8% (antes: $3,64 \pm 5,1$; depois: $2,8 \pm 5,9$) (Figura 2). Conseqüentemente, houve uma perda significativa de hemoglobina ($p < 0,0001$) equivalente a 24,3% (antes: $64,6 \pm 1,2$; depois: $48,9 \pm 1,01$) (Figura 3).

Não houve diferença estatística significativa ($p = 0,0874$) nos valores dos hematócritos analisados nos concentrados de hemácias cujos valores dos hematócritos ($59,1 \pm 0,7$) e ($58,3 \pm 0,6$) antes e depois da filtração respectivamente, corresponderam a uma diminuição de 1,3% (Figura 4).

Foi observada uma diminuição significativa ($p < 0,0001$) na contagem de leucócitos por unidade filtrada com valores antes e depois da filtração de ($1,78 \times 10^9 \pm 1,49 \times 10^8$) e ($2,15 \times 10^5 \pm 2,54 \times 10^4$) respectivamente, equivalentes a um percentual de 99,98% de leucócitos removidos (Tabela 2).

Todos os valores das análises realizadas encontram-se no quadro em anexo.

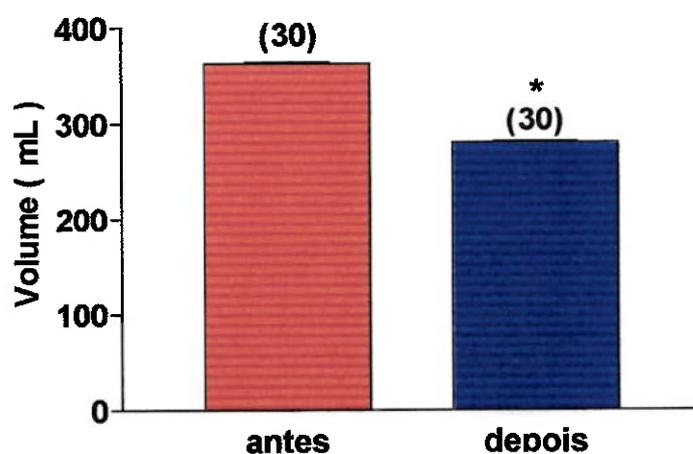


FIGURA 2- Volume(mL) dos concentrados de Hemácias antes e depois da filtração usando filtros SEPACELL (4C2300).

Os valores representam média \pm EPM. Os números entre parênteses referem-se ao número de filtros utilizados. *vs antes ($p < 0,0001$, teste “t” de Student pareado).

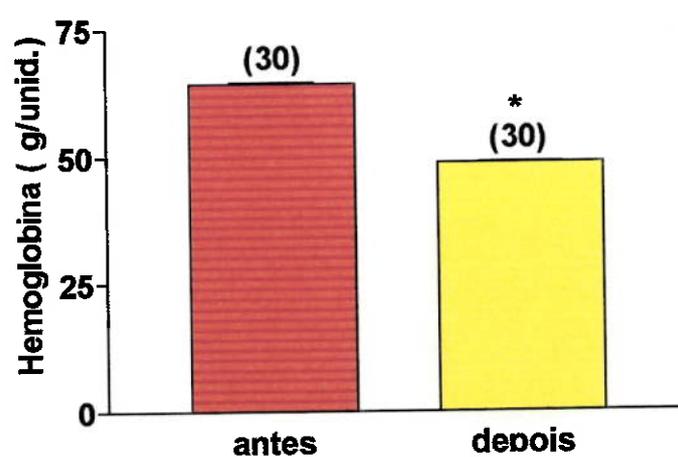


FIGURA 3- Dosagem de Hemoglobina (g/unid) dos concentrados de hemácias antes e depois da filtração usando filtros SEPACELL (4C2300). Os valores representam média \pm EPM. Os números entre parênteses referem-se ao número de filtros utilizados. * vs antes ($p < 0,0001$, teste “t” de Student pareado).

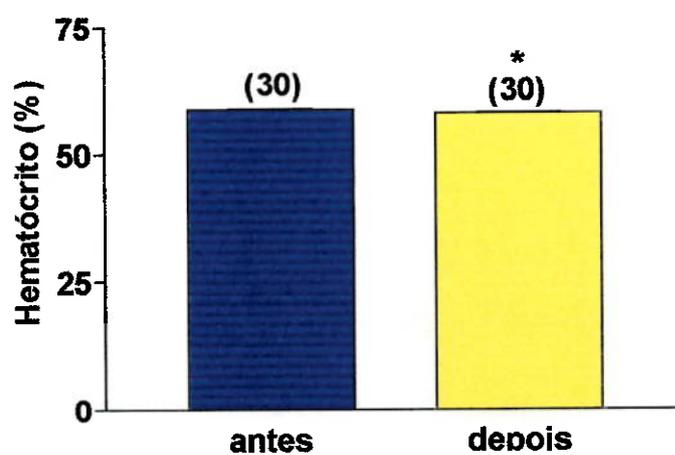


FIGURA 4- Valor do Hematócrito (%) dos concentrados de hemácias antes e depois da filtração usando filtros SEPACELL (4C2300).

Os valores representam média \pm EPM. Os números entre parênteses referem-se ao número de filtros utilizados.

Tabela 2 – Número de Leucócitos nos Concentrados de Hemácias antes e depois da Filtração.

Filtro (Modelo)	Antes da filtração n=30	Depois da filtração n=30
Sepacell (4C2300)	$1,78 \times 10^9 \pm 1,49 \times 10^8$	$2,15 \times 10^5 \pm 2,54 \times 10^4$ *

Os valores estão expressos com a média \pm EPM. ($p < 0,0001$, teste “t” de Student pareado)

6- DISCUSSÃO

Durante muito tempo, a principal indicação para uso dos hemocomponentes leucodepletados foi a prevenção das reações transfusionais febris não-hemolíticas. O desenvolvimento dos filtros de terceira geração e os resultados de alguns estudos sugerem que metas mais ambiciosas, tais como a redução ou prevenção do citomegalovírus, HTLV-I/II e Aloiminização primária para o antígeno HLA, podem ser atingidas com esta tecnologia em receptores de transfusão de sangue, pois, dentre as técnicas utilizadas para reduzir leucócitos nas suspensões de células sangüíneas, a filtração é a mais simples e eficiente (Rebulla, 1993).

Neste estudo, avaliamos a ação de 30 filtros SEPACELL (4C2300) na redução dos leucócitos nos concentrados de hemácias comparando os resultados de acordo com os padrões atuais exigidos pelo Council of Europe (1999) e pela Associação Americana de Bancos de Sangue – AABB (1999) que dizem que os produtos de sangue leucodepletados devem conter níveis inferiores a 1×10^6 leucócitos/unidade filtrada e inferiores a 5×10^6 leucócitos/unidade filtrada respectivamente.

A perda do volume em 22,8% não compromete o uso dos filtros leucorreductores avaliados neste trabalho porque a diferença entre os valores do volume obtido antes e depois da filtração foi decorrente da retirada das amostras para as análises e também do volume retido que se concentrou nas malhas dos filtros, pois, de acordo com Van Der Meer et al (1999), filtros de fibras com diâmetro de 10 a $20 \mu\text{m}$ levam a uma maior perda de volume e, conseqüentemente, perda de hemoglobina que, apesar de ter sido elevada (24,3%) com valor depois da filtração de 48,9g/unidade filtrada, ainda está dentro do limite mínimo permitido pelo Council of Europe que é de 45g/unidade filtrada. Masse et al (1991), avaliaram diferentes filtros e justificaram essa perda

de hemoglobina pelas diferenças de medida e procedimento de filtração e também por um grau de imprecisão na medição.

No tocante aos valores encontrados na determinação do hematócrito, encontramos uma redução não significativa de 1,3% que pode ser justificada devido ao plasma retido ao se realizar a técnica do microhematócrito (England, 1975).

Em relação aos leucócitos, obtivemos um valor residual de $2,5 \times 10^5$ /unidade filtrada, ou seja, menos que 1×10^6 /unidade filtrada e observamos uma remoção de 99,98% de leucócitos que equivale a uma leucorredução de $4 \log_{10}$. Estudos feitos por Heaton et al (1994) confirmaram que a depleção de leucócitos em concentrados de hemácias pré-armazenados utilizando um filtro íntegro, produziu uma leucorredução na ordem de $3-5 \log_{10}$ tal que os níveis de leucócitos residuais nas hemácias foram menores que 1×10^6 /unidade filtrada como foi observado no nosso estudo. Os resultados para a leucorredução também estão de acordo com os que Van Der Meer et al (1999) encontraram com os filtros BPF4 cujo valor residual de leucócitos foi de $2,5 \times 10^5$ /unidade filtrada e com os filtros Imugard com valor residual de leucócitos de $2,4 \times 10^5$ /unidade filtrada.

7- CONCLUSÃO

Os resultados expostos neste estudo confirmam que a depleção de leucócitos em concentrados de hemácias pré-armazenados utilizando os filtros SEPACELL (4C2300) como parte do componente processado teve consistentemente uma leucorredução na ordem de 3 – 5 \log_{10} tal que os níveis de leucócitos das hemácias restantes foram inferiores a 1×10^6 por produto, constatando a eficácia dos filtros pesquisados.

8- ABSTRACT

Leukocytes present in blood components are concerned with the occurrence of certain transfusional reactions, such as the non-hemolytic febrile transfusion reaction, alloimmunization and the refractability to platelet transfusion, graft-versus-host disease, immunodulatory effects. Furthermore, leukocytes may be vectors for infections agents, such as cytomegalovirus, HTLV I/II and EBV. In order to prevent these adverse effects, blood filtration allows the production of leukodepleted blood products with the removal of 99,99% of leukocytes. The present paper had as its objective to evaluate the effectiveness of the filters which were used in the removal of leukocytes in red blood cell concentrates. Thirty filters SEPACELL were tested (4C2300) lot number A99E17021, in the period from November 1st to 30th , 2000, with the use of thirty red blood cell concentrates from donors with hemoglobine with normal electrorethical mobility and negative-sorum-studies for syphilis, Chagas'disease, AIDS, HTLV I/II and Hepatitis A and B. With the analysis of the infiltration time, volume of lost blood, hemoglobine dosage, the hematocryte and the leukocyte count we were able to get the removal of 99,98% of leukocytes which is equivalent to a leukoreduction of 4 log₁₀, what makes certain the effectiveness of the filter and hence, the quality of the final product.

9- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAHOSHI, M. et al. A case of transfusion-associated graft-versus-host disease not prevented by white cell-reduction filters. **Transfusion**, v. 32, p. 169-171, 1992.

ALCORTA, I. et al. Influence of the red blood cell preparation method on the efficacy of a leukocyte reduction filter. **Vox Sang.**, v. 71, p. 78-83, 1996.

AMERICAN ASSOCIATION OF BLOOD BANKS. **Standards for blood banks and transfusion services**. 19th. ed. Bethesda, c1999.115p.

BORDIN. J. O.; FABRON JR., A. Aplicação clínica de filtros leucocitários. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, n. 3, p. 205-208, 1997.

ENGLAND. J. M.; DOWN M.C. Determination of packed cell volume using ¹³¹I human serum albumin: **Br. I. Haematol**, v.30, 365p, 1975.

FRIEDMAN, L. I. et al. White cell counting in red cells and platelets: How few can we count? **Transfusion**, v. 30, p. 387-389, 1990.

GUIDE to the preparation use and quality assurance of blood components. 5th. ed. Strasbourg: Council Europe, c1999.

HARMENING, D.; CALHOUN, L.; POLESKY, H. F. **Técnicas modernas em banco de sangue e transfusão**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1992. p. 272-284.

HEATON, W. A. et al. Effects of 3 - 5 log₁₀ pre-storage leucocyte depletion on red cell storage and metabolism. **Br. J. Hematol.**, v. 87, p. 363-368, 1994.

JUNQUEIRA, P. C. **O essencial da transfusão de sangue**. São Paulo: Andrei, 1997. p.17-22.

LEE, G. R. et al. **Wintrobe hematologia clínica**. São Paulo: Manole, 1998. v.1.

MASSE, M. et al. A multicenter study on the efficiency of white cell reduction by filtration of red cells. **Transfusion**, v. 31, n. 9, p. 792-797, 1991.

MORAES, H. S. et al. Prevention of transfusion-associated Chagas disease: efficacy of white cell-reduction filters in removing *Trypanosoma cruzi* from infected blood. **Transfusion**, v. 35, p. 723-726, 1995.

NORFOLK, D. R.; WILLIAMSON, L. M. Leukodepletion of blood products by filtration. **Blood Transf.**, v. 9, p. 7-14, 1995.

OMOTO, R.; OTTA, M. I. **Leucodepleção em medicina transfusional**. São Paulo: ASSEM-NPBI Produtos Hospitalares, 1997a. 41p.

_____. Leucodepleção: aspectos gerais. **Hematologia & Hemoterapia**, v. 2, n. 1, p. 60-63, 1997b.

RAPAILLE, A. et al. Prestorage leukocyte reduction with in-line filtration of whole blood: evaluation of red cells and plasma storage. **Vox Sang.**, v. 73, p. 28-35, 1997.

REBULLA, P. et al. White cell-reduced red cells prepared by filtration: a critical evaluation of current filters and methods for counting residual white cells. **Transfusion**, v. 33, n. 2, p. 128-133, 1993.

REESINK, H. W. et al. Removal of leukocytes from blood by fibre filtration A comparison study on the performance of two commercially available filters. **Vox Sang.**, v. 42, p. 281-288, 1982.

STEDMAN, T. L. **Stedman Dicionário médico**. 25. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1657p.

VAN DER MEER, P. F. et al. Six filters for the removal of white cells from red cell concentrates, evaluated at 4°C and/or at room temperature. **Transfusion**, v. 39, p. 265-270, 1999.

WENS, B.; BESSO, N. Quality control and evaluation of leukocyte-depleting filters. **Transfusion**, v. 29, p.186-187, 1989.

ANEXO

Análise de Filtros da Baxter modelo Sepacell

Nº Bolsa	Vol. Antes	Vol. Depois	Hb g/unid. Antes	Hb g/unid. Depois	Ht (%) Antes	Ht (%) Depois	Tempo (min.)	Cont. Leuc/unid. Antes	Cont. Leuc/unid. Depois
181067-6	351,2	244,1	60,8	42,4	64	64	8	1,00E+09	2,40E+05
181063-4	336,2	287,3	55,2	47,7	60	60	6	1,20E+09	2,30E+05
181072-3	349,3	299,5	59,3	52,1	64	64	7	2,70E+09	1,80E+05
181546-6	347,4	326,2	56,4	54,6	59	60	10	2,80E+09	1,30E+05
181015-4	342,7	262,9	57,5	46,6	60	60	7	1,20E+09	3,20E+05
181025-1	353,9	268,5	54,8	46	61	61	9	3,20E+09	4,30E+05
181089-8	399,1	324,9	77,9	55,2	59	59	10	3,40E+09	6,50E+04
181051-0	374,6	304,2	67,4	49,8	56	56	8	2,70E+09	6,00E+04
181077-4	376,5	315,4	71,9	55,4	61	61	11	3,50E+09	4,40E+05
181458-3	396,2	311,7	71,8	54,9	63	64	6	2,80E+09	1,20E+05
181297-1	354,9	264,8	66,2	49,3	64	64	8	8,40E+08	5,00E+04
181476-1	345,5	253,5	62,4	44,8	60	60	5	1,40E+09	3,00E+05
181294-7	388,7	302,3	74,7	56,4	60	60	7	2,00E+09	6,00E+05
181454-0	356,8	279,8	69	52,2	64	64	59	2,10E+09	2,20E+05
181329-3	379,3	292,9	60,4	45,2	53	53	8	1,50E+09	2,90E+05
181079-0	424,4	339,9	68,2	51,8	52	52	6	1,90E+09	2,00E+05
181011-1	401,9	300,5	67,3	50,9	53	53	6	2,00E+09	4,20E+05
181460-5	386,9	304,2	66,5	56,8	57	57	8	2,10E+09	2,40E+05
181229-7	383,1	304,2	72,6	57,3	60	60	7	1,10E+09	3,60E+05
181570-9	279,8	195,3	56,5	36,6	64	64	7	6,90E+08	8,00E+04
181197-5	353,1	274,2	58,1	47,6	55	55	8	1,40E+09	7,00E+04
181488-5	362,4	255,4	64,9	41,2	59	59	11	8,70E+08	1,40E+05
182343-4	377,5	276,1	66,4	49,7	55	55	8	1,50E+09	2,10E+05
182342-6	354,5	259,2	66,6	46,8	60	60	7	8,50E+08	8,00E+04
182148-2	360,6	261	60,4	46,5	58	58	13	1,10E+09	5,00E+04
182101-6	383,1	285,4	72,8	52,3	59	59	7	4,90E+08	1,70E+05
182151-2	364,3	262,9	64,1	43,1	57	57	7	1,20E+09	5,00E+04
181289-0	364,3	281,7	69,1	50,3	60	60	9	1,20E+09	2,20E+05
182251-9	309,9	206,6	55,6	36,2	55	55	7	1,60E+09	1,20E+05
182512-7	375,6	291,1	61,9	46,6	50	50	7	2,1E+09	3,5E+05
Média	364,07241	280,84828	64,64827586	48,95517241	59,03448276	58,5862069	7,827586207	1,78E+09	2,15E+05
DP	28,412194	32,858252	6,464773816	5,648930759	3,499824063	2,994247358	1,794216214	8,54E+08	1,41E+05