

Terapie trasfusionali nel cane parte I. Il sangue intero e i suoi componenti - raccolta, produzione e stoccaggio



Per una corretta pratica trasfusionale è necessario comprendere alcune semplici nozioni sulle caratteristiche biologiche del sangue e dei suoi componenti, e sulle metodiche di raccolta, lavorazione e conservazione di questi prodotti. Il sangue, raccolto in un sistema sterile chiuso, può essere somministrato come **sangue intero fresco** entro 8 ore dal prelievo, apportando al ricevente tutti i componenti cellulari e plasmatici del sangue. Il **sangue intero conservato** contiene globuli rossi funzionali e proteine plasmatiche, ma presenta un progressivo decremento di piastrine e fattori della coagulazione. Le tecniche di processazione e separazione del sangue intero in **emocomponenti** (globuli rossi concentrati, plasma, o altri prodotti) consentono di ottimizzare la donazione e di trattare il paziente in modo specifico, riducendo i rischi di reazioni avverse.



Chiara Agnoli
Med Vet, PhD

INTRODUZIONE

In medicina veterinaria, così come in medicina umana, l'utilizzo del sangue e dei suoi componenti a scopo trasfusionale e riparativo costituisce una risorsa unica e fondamentale nel trattamento sintomatico di diverse patologie sia acquisite sia congenite, e nella stabilizzazione dei pazienti critici, internistici/chirurgici e dei pazienti ematologici in senso lato. Così come le soluzioni cristalloidi e colloidali, il sangue ed i suoi componenti rappresentano terapie di supporto somministrate con la finalità di correggere transitoriamente deficit ematologici o emostatici, consentendo al clinico di avere il tempo necessario per l'esecuzione di accertamenti diagnostici e di stabilizzare il paziente in attesa della risposta terapeutica. In Italia l'utilizzo del sangue intero in medicina veterinaria è regolamentato da apposite linee guida (*Linee guida relative all'esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario - 2007*)¹, mentre la produzione degli emocomponenti è inserita nell'ambito di progetti di ricerca o produzioni farmaceutiche (*Decreto Legislativo 6 aprile 2006 - n°193*)².

La raccolta e la somministrazione di sangue intero sono pratiche relativamente semplici, da effettuarsi anche ambulatorialmente, e necessitano di un'attrezzatura minima e poche fondamentali accortezze. La produzione degli emocomponenti richiede invece strumenti dedicati e procedure codificate, ma garantisce diversi vantaggi in termini di praticità di somministrazione, ottimizzazione delle risorse e del trattamento, maggior sicurezza e riduzione degli effetti collaterali associati alla somministrazione di sangue omologo³. Conoscere i prodotti somministrabili, le loro prerogative, le moda-



Video 1 - <http://cms.scivac.it/it/v/11795/1>

Donazione di sangue: modalità con le quali effettuare la raccolta di sangue intero nel cane donatore.

lità di produzione e conservazione, nonché le caratteristiche immuno-ematologiche del sangue canino, è fondamentale per tutelare la sicurezza e la salute del donatore e del ricevente, e per condurre con buon esito ogni tipologia di trattamento trasfusionale^{4,5}.

DONATORI E DONAZIONE

Il sangue è un tessuto connettivo fluido e complessivamente rappresenta circa l'otto per cento (8%) del peso corporeo canino; quando trasfondiamo sangue intero fresco apportiamo al ricevente tutti i componenti ematici fisiologicamente presenti nel donatore:

Il sangue ed i suoi componenti rappresentano terapie di supporto somministrate con la finalità di correggere transitoriamente deficit ematologici o emostatici.

globuli rossi, globuli bianchi, piastrine e proteine plasmatiche (prevalentemente fattori della coagulazione e altre proteine emostatiche, albumine, immunoglobuline). In medicina veterinaria non esiste uno standard relativo al volume ematico che costituisce una unità di sangue. Essendo la scelta dei dispositivi utilizzabili nel cane frequentemente limitata dalla disponibilità dei prodotti commercializzati in ambito umano, comunemente un'unità di sangue intero canino corrisponde a 450 ml (\pm 45 ml) combinati con 63 ml di anticoagulante. Questo quantitativo di sangue si ot-

tiene da donatori di peso superiore ai 25 kg (sulla base del volume massimo prelevabile raccomandato, il quale non deve superare i 19 ml/kg (15-22% del volume ematico totale stimato)³. Oltre al peso corporeo, un donatore è selezionato anche sulla base dell'età (generalmente compresa fra 1 e 7 anni), dello stato di salute, attestato attraverso esame clinico e screening laboratoristici (Tabella 1), dello stile di vita (esecuzione regolari delle profilassi e ambiente di vita sicuro e controllato) e soprattutto dell'indole. Infatti, i cani docili necessitano generalmente di un minore contenimento e, di conseguenza, subiscono minori eventi stressanti in grado di inficiare il benessere del donatore durante la procedura. Patologie sottostanti, trattamenti terapeutici per il controllo di patologie croniche (come ad esempio farmaci antinfiammatori, immunosoppressivi, anticonvulsivanti, etc.) e positività a test sierologici o di diagnostica molecolare per le malattie infettive testate, rappresentano criteri di esclusione permanente dal programma di donazione³. Altri criteri di esclusione permanente sono considerati i pregressi trattamenti trasfusionali. A seguito di una o più trasfusioni, un cane svilupperà anticorpi contro antigeni ematici non propri e questi, se trasfusi, implementeranno il rischio di reazioni avverse in un successivo ricevente⁶. Precedenti gravidanze nel cane sono state considerate a lungo un criterio di esclusione dalla donazione, tuttavia, l'ipotesi che un cane negativo per determinati antigeni eritrocitari si sensibilizzi attraverso l'esposizione al sangue fetale dei propri

Tabella 1 - Elenco degli esami di laboratorio da eseguire sul sangue intero canino reperibile in commercio secondo quanto indicato nell'allegato numero 1 della "Linea guida relativa all'esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario". ALP: fosfatasi alcalina (U/L); ALT: alanina amino transferasi (U/L); aPTT: tempo di tromboplastina parziale attivato (s); DEA: dog erythrocyte antigen; ELISA: test immunoenzimatico - Enzyme Linked Immunosorbent Assay; IFI: immunofluorescenza indiretta; Hct: valore ematocrito (%); Hgb: concentrazione emoglobinica g/dL; MCH: contenuto cellulare medio di emoglobina (pg); MCHC: concentrazione cellulare media di emoglobina (g %); MCV: volume cellulare medio (fL); MPV: volume piastrinico medio (fL); PLT: piastrine ($\times 10^9/\text{mm}^3$); PT: tempo di protrombina (s); RBC: globuli rossi ($\times 10^6/\text{mm}^3$); RDW: ampiezza di distribuzione eritrocitaria (%); WBC: leucociti ($\times 10^3/\text{mm}^3$)

Esame	Determinazione
Tipizzazione gruppo sanguigno	DEA 1
Esame emocromo-citometrico completo	RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW, WBC con formula leucocitaria, PLT, MPV, valutazione morfologica dello striscio ematico
Chimica clinica	Profilo biochimico ristretto (parametri indicati espressamente = proteine totali, albumina, urea, ALT, ALP)
Valutazione emostatica	PT, aPTT, fibrinogeno
Indagini malattie infettive (IFI) (ELISA)	Ehrlichia canis, Leishmania infantum, Rickettsia rickettsii, Babesia canis Ricerca antigene filaria - Dirofilaria immitis
Esame delle urine	Esame chimico-fisico delle urine e valutazione del sedimento
Esame delle feci	Esame parassitologico

cuccioli³, ad oggi, appare poco plausibile per la conformazione anatomica della placenta canina (placenta zonale) e per la scarsa evidenza scientifica presente in letteratura⁷. Criteri di esclusione transitori sono invece rappresentati da condizioni patologiche temporanee, gestazione, estro, trattamenti chirurgici (durata dell'esclusione due mesi), trattamenti immunologici/vaccinali (durata dell'esclusione 2 settimane)^{1,4,8}.

Come anticipato, la raccolta di sangue intero dal cane donatore è una procedura piuttosto semplice per la quale è sufficiente l'utilizzo di un sistema di raccolta di tipo chiuso facilmente reperibile (Figura 1). Questo sistema di raccolta (sacche trasfusionali) previene, se manipolato correttamente, qualunque esposizione del sangue o dei suoi componenti all'ambiente esterno e a potenziali patogeni. A seconda del sistema di raccolta utilizzato (sacca di raccolta singola, oppure sacca di raccolta collegata ad un numero variabile di sacche satellite: sacca doppia, tripla o quadrupla), sarà possibile collezionare e somministrare il sangue sotto forma di sangue intero o, in seguito a processazione, ottenerne un numero variabile di componenti. Le sacche maggiormente utilizzate in medicina trasfusionale canina sono sacche da 450 ml singole, triple o quadruple e sacche da 350 ml singole o doppie (sacche di minor capienza, contenenti proporzionalmente una concentrazione inferiore di anticoagulante). Generalmente i sistemi quadrupli (Figura 2) contengono in una delle tre sacche satellite una soluzione nutriente additiva che ha la finalità di preservare le emazie concentrate dai danni che fisiologicamente subirebbero durante lo stoccaggio e rallentarne l'invecchiamento; per questo motivo le sacche quadruple sono preferibili rispetto alle sacche doppie, nel caso in cui si proceda con la produzione degli emocomponenti. Durante il prelievo, il volume del sangue raccolto è stimato come peso anziché come volume; considerando che il peso specifico del sangue a 37°C è pari a 1.053, l'unità raccolta dovrà pesare idealmente 474 grammi netti, con un intervallo di accettabilità



Figura 1 - Sacca quadrupla per la raccolta e la separazione del sangue intero. In particolare: **A)** ago e camicia protettiva post prelievo; **B)** sacca da 40 ml per campionamento pre-donazione, vuota e sterile, utilizzabile in veterinaria per ridurre il quantitativo totale di anticoagulante, mantenendo il sistema chiuso; **C)** clamp; **D)** valvola a rottura tramite doppio movimento che assicura che le varie parti del sistema di raccolta rimangano separate. Terumo Italia® S.r.l. Roma (IT).

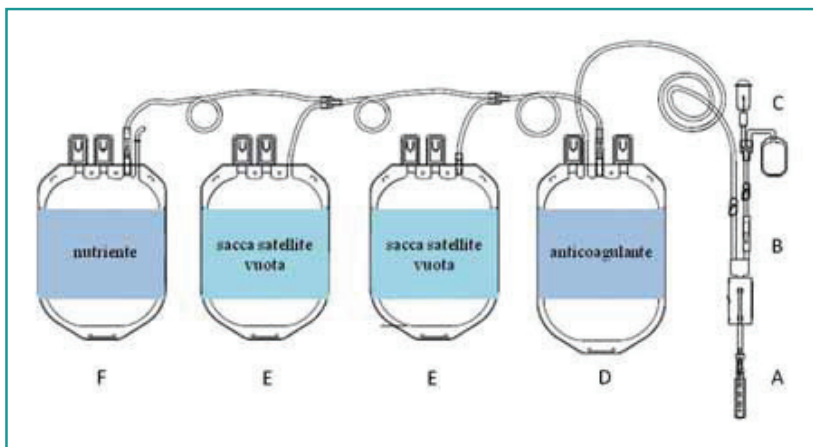


Figura 2 - Schema di una sacca quadrupla. Da destra: **A)** ago e camicia protettiva post prelievo, **B)** valvola a rottura tramite doppio movimento (da aprire nel momento in cui ci si accinge ad effettuare il prelievo), **C)** sacca pre-campionamento (utilizzata in medicina umana per prelevare le matrici necessarie agli esami di routine ai quali è sottoposto il donatore), **D)** sacca principale, pre-riempita con soluzione anticoagulante (per esempio CPD), **E)** due sacche satellite vuote, separate e protette da valvole a rottura tramite doppio movimento (destinate alla raccolta del plasma), **F)** una sacca satellite pre-riempita con sostanza nutriente (per esempio SAGM), sempre protetta da valvole a rottura. Terumo Italia® S.r.l. Roma (IT).

compreso fra i 425 e i 520 grammi. Infatti, volumi di sangue inferiori presenteranno un pericoloso eccesso di anticoagulante e non potranno essere somministrati. Eccezioni a questa regola dovranno essere valutate solo nel caso in cui il sangue raccolto sia processato negli emocomponenti, e il plasma, contenente l'eccesso di anticoagulante, eliminato (il volume complessivo prelevato non deve essere comunque inferiore ai 300 ml). Infine, nel caso non si disponga di una sacca di capienza inferiore ai 450 ml, e il nostro donatore sia un cane di dimensioni ridotte (25 kg), una possibilità consiste nel fare defluire attraverso il sistema chiuso parte dell'anticoagulante in una delle sacche satellite (o quando presente in una piccola sacca di campionamento localizzata in prossimità dell'ago) che sarà momentaneamente clampata e poi eliminata. Questo tipo di escamotage può essere effettuato anche ogni qual volta si dubita di riuscire ad effettuare un buon prelievo, gestendo l'eventuale eccesso di anticoagulante a donazione ultimata.

La raccolta di sangue intero è una procedura piuttosto semplice, effettuabile ambulatorialmente, e per la quale è sufficiente l'utilizzo di un sistema di raccolta di tipo chiuso.

La vena giugulare rappresenta il vaso d'elezione dal quale effettuare il prelievo. Generalmente il cane è posto sul tavolo in decubito laterale (il decubito sternale rappresenta un'alternativa non sempre ottimale, ma valutabile per pazienti poco tolleranti la contenzione, tuttavia non consigliata dagli autori) e il sito del prelievo deve essere tricotomizzato e sottoposto ad accurata asepsi. Il sangue può essere raccolto semplicemente sfruttando la forza gravitazionale, avendo l'accortezza di creare un adeguato dislivello fra il paziente e la sacca. Il tempo di raccolta, utilizzando questa modalità di prelievo, varia dai 5 ai 10 minuti circa, e può impegnare dai 3 ai 4 operatori. Oltre a chi effettua il prelievo, infatti, una o due persone si occuperanno di effettuare il contenimento, idealmente unitamente al proprietario, ed un ultimo operatore si occuperà della gestione della sacca e degli eventuali imprevisti⁹ (video 1). Un'alternativa alla raccolta del sangue attraverso la semplice forza gravitazionale, è rappresentata dall'utilizzo di un aspiratore, tramite il quale il tempo effettivo del prelievo può essere ridotto anche a qualche minuto. Studi recenti, che hanno valutato le alterazioni emodinamiche di cani donatori prima e dopo il prelievo di 450 ml di sangue intero, hanno evidenziato un decremento della pressione sistolica¹⁰, ma non clinicamente significativo. Al fine di tutelare il più possibile il benessere del donatore, le condizioni clini-

che del cane devono essere monitorate attentamente sia prima (valutazione anamnestica ed esame fisico diretto), sia durante e dopo la donazione (valutazione delle mucose, caratteri del polso e del respiro del donatore e suo stato mentale) e a maggior ragione nel momento in cui la riduzione della volemia può essere repentina, come durante prelievi effettuati con l'ausilio di un aspiratore. Dopo aver raggiunto il volume desiderato l'ago deve essere rimosso dalla vena, e il circuito immediatamente chiuso per evitare il contatto con l'ambiente esterno; per lo stesso motivo il sangue presente nel tubo di raccordo deve essere fatto defluire fino alla sacca attraverso l'utilizzo di apposite pinze spremi tubo (*tube stripper*). La sacca, una volta riempita, deve essere miscelata delicatamente; una parte del sangue può essere fatta refluire nel tubo di raccordo (video 1), e questo può essere chiuso in vari punti con appositi morsetti in alluminio (clamp) o saldatore, in modo da formare piccole aliquote sigillate, utilizzabili per effettuare prove di compatibilità o eventuali controlli di qualità.

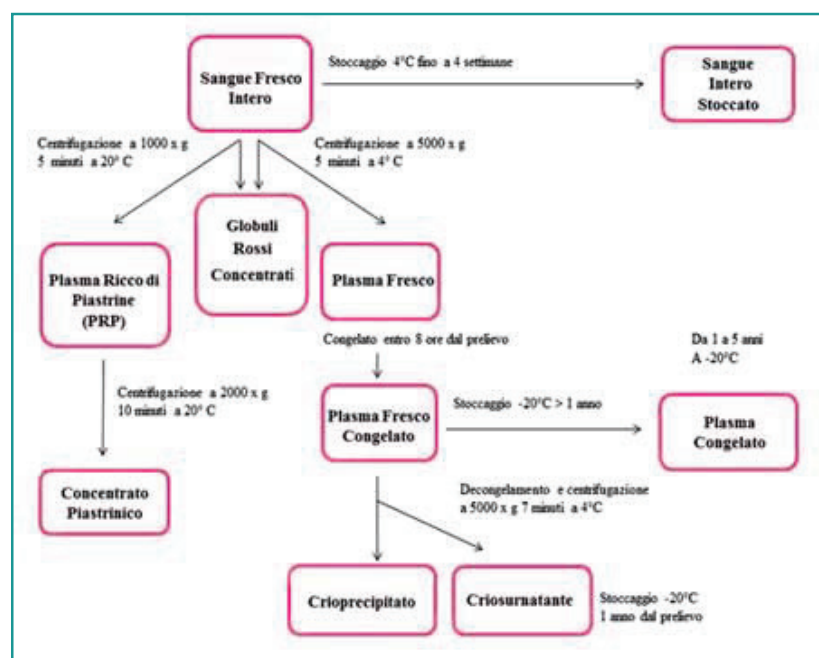
SANGUE INTERO ED EMOCOMPONENTI

Il sangue fresco intero deve essere somministrato entro le otto ore dal prelievo, per garantire l'ottimizzazione di tutti i suoi componenti. Quando stoccato, invece il sangue intero deve essere conservato a temperatura refrigerata controllata ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Durante la conservazione, oltre all'aggregazione delle piastrine e alla progressiva riduzione della concentrazione dei fattori della coagulazione, i globuli rossi sono sottoposti ad un processo complessivamente noto come *danno da stoccaggio* che comprende alterazioni di tipo morfologico e metabolico ed è responsabile di una riduzione della loro sopravvivenza post-trasfusionale media nel ricevente a 24 ore dall'infusione, e della riduzione della loro funzionalità (capacità di trasporto e cessione dell'ossigeno ai tessuti)¹¹. Convenzionalmente il sangue intero è stoccato per un periodo non superiore alle 4 settimane. La processazione degli emocomponenti, come anticipato, può essere effettuata in strutture dotate di un'attrezzatura specifica comprensiva essenzialmente di centrifuga refrigerata da pavimento e dotata di rotore oscillante, frigoemoteca, congelatore e altri accessori per la separazione manuale dei componenti (separatori del plasma o *plasma extractor* e termosaldatori)⁴ (Figura 3).

Le procedure aferetiche, frequentemente utilizzate in medicina umana, permettono di ottenere dal donatore una specifica componente del sangue. Gli apparecchi utilizzati per l'aferesi immettono il sangue in un circuito sterile anticoagulato e, mediante un processo di centrifugazione e filtrazione, lo separano consentendo



Figura 3 - Strumentazione e passaggi fondamentali della processazione del sangue fresco intero. Centrifugazione delle sacche, separazione del plasma e dei globuli rossi concentrati attraverso *plasma extractor* e pinze spremi tubo, saldatura delle unità prodotte.



Box 1 - Schema per la gestione e processazione del sangue intero canino, da Abrams-Ogg ACG, Schneider A. Principles of canine and feline blood collection, processing and storage. In: Schalm's Veterinary Hematology, 6th edition.

la raccolta degli emocomponenti desiderati, generalmente plasma e/o piastrine, restituendo la componente eritrocitaria al donatore³. Questa tecnica in medicina umana è di notevole utilità poiché permette di ottenere da un unico donatore una maggiore quantità di un singolo emocomponente riducendo l'immunogenicità del prodotto finale. Nel cane e nella pratica clinica veterinaria l'afesi presenta lo svantaggio di essere

una procedura piuttosto lunga (da 1 a 2 ore), costosa (filtri e circuiti dedicati al singolo donatore) e potenzialmente rischiosa, a causa della tossicità indotta dal citrato utilizzato nel circuito come anticoagulante e progressivamente infuso nel donatore^{12,13,14}, tuttavia è sviluppata in contesti sperimentali ed in particolare applicata nella produzione di concentrati piastrinici (CP). Come precedentemente accennato, la separazione degli emocomponenti permette di ottimizzare la donazione, ottenendo da una sacca di sangue intero prodotti diversi, e consente di stoccare ogni componente secondo le modalità più appropriate, migliorandone le caratteristiche terapeutiche³. Nel box 1 è sintetizzato il processo di separazione standard per la produzione degli emocomponenti più comunemente utilizzati in medicina veterinaria. Sfruttando infatti i diversi gradienti di densità di plasma, piastrine, globuli bianchi e globuli rossi, è possibile, attraverso mezzi fisici quali la centrifugazione, isolare le varie componenti ematiche⁴.

GLOBULI ROSSI CONCENTRATI

I globuli rossi concentrati che si ottengono dopo la separazione del plasma possono essere stoccati con o senza aggiunta di una specifica soluzione nutriente. Normalmente nei dispositivi di raccolta è già presente una soluzione anticoagulante nella quale, oltre al sodio citrato, posso-

no essere presenti altri componenti quali destrosio, acido citrico e fosfato (Tabella 2). Queste sostanze preservano, in parte, le emazie dai fisiologici processi di invecchiamento cellulare che durante lo stoccaggio risultano accelerati. Per ridurre ulteriormente gli inevitabili danni da stoccaggio a carico dei globuli rossi, tuttavia, è possibile e consigliabile utilizzare sacche trasfusionali che possiedono all'interno di una delle sac-

Tabella 2 - Soluzioni anticoagulanti e soluzioni nutritive additive, generalmente presenti nelle sacche trasfusionali disponibili sul mercato, e rispettiva indicazione della durata di stoccaggio dei globuli rossi canini		
Sacca Principale: soluzione anticoagulante	Sacca satellite: soluzione nutriente	Tempo massimo di conservazione del prodotto con la combinazione dell'esempio
ACD (acido citrico, citrato di sodio, destrosio)	//	n.p.
CPDA-1 (citrato di sodio, fosfato, destrosio, adenina)	//	20 giorni
CPD (citrato di sodio, fosfato, destrosio)	ADSOL: adenina, α D-glucopiranosio, mannitolo, sodio cloruro	37 giorni
	OPTISOL: mannitolo, destrosio, adenina, sodio cloruro	35 giorni
CP2D (citrato di sodio, fosfato, destrosio x2)	NUTRICEL: destrosio, sodio fosfato, sodio cloruro, adenina	35 giorni



Figura 4 - Sacca quadrupla: **A)** sacca principale contenente i globuli rossi concentrati ottenuti dopo l'allontanamento del plasma; **B)** sacche satellite nelle quali è possibile raccogliere il plasma fresco; **C)** sacca satellite contenente soluzione additiva nutriente. La soluzione nutriente è aggiunta ai globuli rossi concentrati, e il volume complessivo potrà essere eventualmente suddiviso nelle due sacche di raccolta (**A** e **C**). Terumo Italia® S.r.l. Roma (IT)

che satellite una soluzione nutriente additiva (generalmente a base di adenina, mannitolo, soluzione salina). Quando presente, questa soluzione può essere unita ai globuli rossi concentrati dopo l'allontanamento del plasma (Figura 4). Ovviamente la presenza o meno di questi nutrienti influenza la durata del periodo di conservazione sia del sangue intero, sia dei globuli rossi concentrati (secondo quanto riportato nella Tabella 2³). Oltre alla durata dello stoccaggio, altri aspetti sembrano poter influenzare la qualità e la funzionalità dei globuli rossi trasfusi e il loro effetto nel ricevente. In particolare, nell'ultimo decennio, si è consolidata l'opinione secondo la quale la presenza di globuli bianchi nel sangue intero e negli emocomponenti possa essere responsabile dell'accumulo di sostanze pro infiammatorie e fattori di crescita, associabili a effetti avversi in alcune categorie di riceventi. La leucoriduzione pre-stoccaggio è un processo mediante il quale globuli bianchi e piastrine possono essere rimossi dal sangue intero, prima della sua processazione in vari emocomponenti, attraverso uno specifico filtro (Figura 5 e

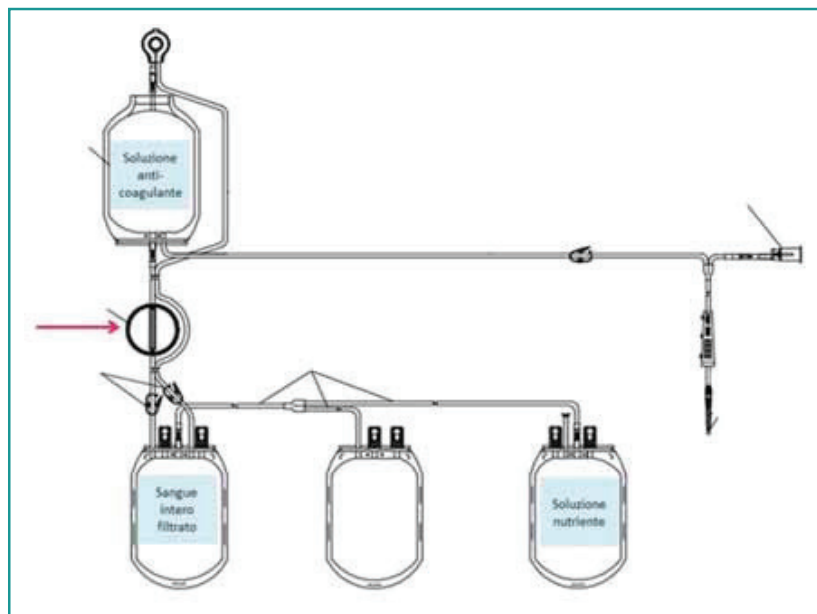


Figura 5 - Schema di una sacca quadrupla per leucoriduzione. La freccia indica il filtro in linea, attraverso il quale transita il sangue intero (generalmente dopo essere stato stoccato un paio d'ore a 4°C). Il sangue si raccoglie nella prima sacca satellite in un tempo variabile fra i 20 ed i 40 minuti. A questo punto (dopo aver eliminato il raccordo, il filtro e la sacca principale ormai vuota), il sangue intero può essere centrifugato, il plasma separato e i globuli rossi concentrati risospesi con la soluzione nutriente presente nell'ultima sacca satellite. Pall - Haemonetics® Braintree Massachusetts (USA).

La trasfusione con gli emocomponenti consente di trattare più pazienti con una sola donazione.



Figura 6 - Dispositivo per la raccolta e la leucoriduzione pre-stoccaggio di sangue intero e fase del filtraggio. La leucoriduzione avviene attraverso il passaggio gravitazionale del sangue dalla sacca di raccolta ad una sacca accessoria attraverso il filtro posto in linea fra le due. Pall - Haemonetics® Braintree Massachusetts (USA).

Figura 6). In particolare, in base alle linee guida della *American Association of Blood Bank Standards*¹⁵, è possibile definire un emocomponente leucoridotto quando la concentrazione di globuli bianchi al suo interno risulta complessivamente inferiore a 5×10^6 globuli bianchi/unità. Studi preliminari condotti in medicina veterinaria hanno valutato l'efficacia nel rimuovere i globuli bianchi dal sangue intero, e l'effetto sui globuli rossi di alcuni filtri per leucoriduzione comunemente in uso in ambito umano¹⁶. In base a questi lavori la leucoriduzione pre-stoccaggio del sangue canino sembra effettivamente poter rimuovere fino al 99% dei leucociti, preservando la funzionalità dei globuli rossi filtrati^{17,18}. Il crescente interesse presente in ambito umano per tecnologie e innovazioni in grado di ridurre o prevenire i potenziali effetti nocivi del trattamento trasfusionale^{19,20,21}, ha influenzato anche la letteratura veterinaria. Recentemente sono stati pubblicati alcuni interessanti studi, i quali hanno evidenziato una differenza significativa della concentrazione di citochine pro-infiammatorie o fattori di crescita, quali ad esempio il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), fra emocomponenti leucoridotti e non leucoridotti^{22,23}. Purtroppo ad oggi le valutazioni effettuate *in vivo* (ampi trial clinici e studi di meta-analisi condotti in medicina umana, e studi sperimentali condotti in medicina veterinaria^{17,24}) non sono concordi nel correlare trattamenti trasfusionali specifici (ad esempio globuli rossi concentrati non leucoridotti o stoccati per periodi prolungati) ad effetti collaterali precisi e, al momento,

le condizioni cliniche individuali del paziente, e i meccanismi patologici in corso, sembrano essere il fattore preponderante nello sviluppo di una reazione avversa o di una prognosi favorevole nel ricevente.

COMPONENTI PIASTRINICI

Un'altra importante componente cellulare oggetto delle terapie trasfusionali in medicina veterinaria è costituita dalle piastrine. Ad oggi il sangue fresco intero rappresenta l'opzione maggiormente utilizzata nelle strutture veterinarie per apportare piastrine ad un paziente, ma esistono anche altri prodotti come: il plasma ricco di piastrine (PRP) e il concentrato piastrinico (CP). Questi prodotti, ottenuti attraverso apposite centrifugazioni, devono essere conservati a temperatura ambiente controllata (20-24°C) e possibilmente in agitazione continua. Il sangue intero può essere conservato con queste modalità per non più di 8 ore, a

La leucoriduzione pre-stoccaggio è un processo che, mediante uno specifico filtro, è in grado di rimuovere globuli bianchi e piastrine dal sangue intero, prima della sua processazione in emocomponenti.

causa dell'elevato rischio di contaminazione batterica, e per questo motivo spesso deve essere prelevato appositamente¹². Il plasma ricco di piastrine ed il concentrato piastrinico possono invece essere conservati, come precedentemente descritto, circa 5 giorni; lo stoccaggio può inoltre aumentare fino a 7 giorni nel caso in cui le piastrine siano preservate in dispositivi costituiti da specifici materiali plastici e mantenute in costante agitazione. Il plasma ricco di piastrine si ottiene attraverso una centrifugazione a ridotta velocità che ha la finalità di sfruttare il basso gradiente di densità piastrinica permettendo a queste cellule di rimanere in sospensione nel plasma anziché incorporarsi al buffycoat come avviene invece durante le centrifugazioni di routine a maggiore velocità. Questa procedura dovrebbe consentire di ottenere un plasma nel quale sono risospese circa l'80% del numero delle piastrine iniziali²⁶. Centrifugando a maggiore velocità un plasma ricco di piastrine e risospendendo in pochi ml di plasma (35-50 ml) il *pellet* piastrinico che si formerà sul fondo della sacca, si può ottenere il concentrato piastrinico. Il plasma rimanente, definito plasma povero di piastrine (PPP), potrà essere utilizzato come plasma fresco congelato. Il concentrato piastrinico presenta il vantaggio di trasfondere rapidamente e in piccoli volumi, elevati quantitativi di piastrine ($\geq 5,5 \times 10^{10}$ piastrine per unità di CP), tuttavia le problematiche legate alla conservazione di queste cellule ne limitano mol-

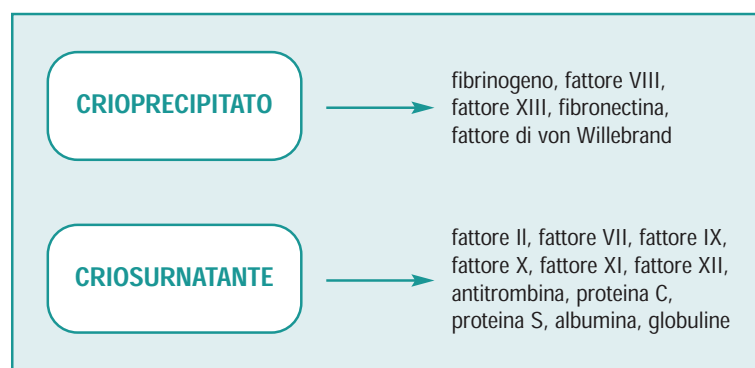
to l'utilizzo. La crioconservazione delle piastrine canine potrebbe rappresentare una soluzione a questo problema, ma al momento i dati presenti in letteratura non sono incoraggianti a causa della ridotta emivita post trasfusionale delle piastrine criopreservate (<2 giorni) rispetto a quelle fresche (3,5-3,8 giorni)⁵.

PLASMA E SUOI DERIVATI

Per quanto riguarda la parte non cellulare del sangue generalmente ci si riferisce a plasma fresco congelato (PFC) e plasma congelato (PC). Per essere definito *plasma fresco congelato*, questo emocomponente deve essere separato e congelato entro 8 ore dal prelievo di sangue intero; il plasma sarà definito invece *plasma congelato* se processato e congelato dopo le 8 ore dal prelievo, o se si tratta di un plasma fresco congelato conservato per un periodo superiore all'anno ad una temperatura di -20°C, o superiore ai sette anni ad una temperatura di -65°C. Le differenze fra questi due prodotti riguardano la concentrazione dei fattori emostatici più labili (quali fattore V e fattore VIII) e sono invece trascurabili in termini di concentrazioni proteiche, di antitrombina e concentrazione dei fattori della coagulazione vitamina K dipendenti^{28,29}. Il plasma fresco congelato può essere ulteriormente processato ottenendo altri due componenti: crioprecipitato e criosurnatante (Box 2). Il crioprecipitato ha la prerogativa di concentrare in un volume esiguo (circa il 10% del volume plasmatico di partenza) un'elevata concentrazione di fibrinogeno e del complesso Fattore di von Willebrand - fattore VIII -, permettendo al paziente di ricevere in infusione rapida, in pochi mi-

Il plasma fresco congelato deve essere separato e congelato entro 8 ore dal prelievo dal donatore per contenere la maggiore concentrazione di fattori della coagulazione.

nuti, concentrazioni terapeutiche di questi fattori. Dal punto di vista pratico, per ottenere crioprecipitato e criosurnatante, è necessario che il plasma fresco di partenza sia congelato in una sacca alla quale è connessa una seconda sacca vuota che servirà per il successivo trasferimento del surnatante. Il crioprecipitato si ottiene facendo scongelare lentamente il plasma fresco congelato (generalmente in 8-10 ore a 1-6°C) e centrifugandolo quando, prima del completo scongelamento, si evidenzierà al suo interno una parte di prodotto torbida e cristallizzata. Dopo la centrifugazione, la parte liquida che costituisce il surnatante (criosurnatante) sarà appunto fatta defluire nella sacca satellite annessa. Il precipitato presente sul fondo



Box 2 - Composizione dei componenti plasmatici ottenuti attraverso crioprecipitazione.

della sacca di partenza (volume variabile intorno ai 10-15 ml) costituirà invece il crioprecipitato. Crioprecipitato e criosurnatante, una volta prodotti, possono essere conservati a -20°C fino ad un anno dalla data del prelievo e della produzione del plasma fresco congelato di partenza^{9, 30}. Riguardo la conservazione dei prodotti plasmatici, è importante segnalare che procedure di scongelamento e ricongelamento rapido non sembrano alterare la concentrazione dei fattori della coagulazione presenti (fattore V e fattore VIII compresi). Le potenzialità emostatiche di un'unità di plasma fresco congelato, ricongelato entro 1 ora dallo scongelamento restano quindi complessivamente sovrapponibili a quelle di partenza³¹.

ANTIGENI ERITROCITARI NEL CANE

Oltre alla comprensione delle caratteristiche biologiche del sangue intero e alle necessità che esso presenta in termini di raccolta, eventuale processazione e soprattutto stoccaggio, è importante conoscerne le caratteristiche immuno-ematologiche al fine di rendere il trattamento trasfusionale il più efficace e sicuro possibile per il ricevente³². Il cane possiede numerosi "gruppi sanguigni" (almeno una dozzina) riconosciuti in un unico sistema convenzionalmente definito DEA.: *Dog Erythrocyte Antigen*⁵. Ogni gruppo sanguigno, DEA 1, DEA 3, DEA 4, eccetera, si esprime nella presenza o meno di un determinato antigene (proteina, glicoproteina, glicolipide o altra molecola presente sulla superficie eritrocitaria). Tutti questi gruppi sanguigni possono essere espressi anche contemporaneamente e sono una caratteristica individuale e determinata geneticamente (per esempio un soggetto sarà definito rispettivamente DEA 7 positivo e DEA 4 negativo, in presenza ed in assenza dei corrispettivi antigeni)^{5,6}. Prerogativa della specie canina è quella di non presentare spontaneamente degli anticorpi nei confronti degli antigeni eritrocitari non propri, ma di ri-

chiedere una precedente sensibilizzazione (per esempio un trattamento trasfusionale) per produrli. Il gruppo DEA 1 rappresenta il gruppo sanguigno più noto del cane a causa dell'elevato potere antigenico che possiede il suo antigene e che si esprime nella capacità di indurre nel ricevente che ne è sprovvisto la produzione di anticorpi che sono importanti agglutinine ed emolisine. Dal punto di vista pratico un cane DEA 1 negativo trasfuso con sangue DEA 1 positivo, svilupperà nell'arco di qualche giorno (circa 4) anticorpi in grado di indurre gravi

reazioni trasfusionali³³. Trattamenti trasfusionali incompatibili in un soggetto precedentemente sensibilizzato all'antigene DEA 1 esiteranno quindi in gravi reazioni emolitiche, caratterizzate dalla rapida distruzione dei globuli rossi trasfusi e da segni clinici quali emoglobinuria, iperbilirubinemia, ipertermia e altri sintomi riconducibili a una risposta infiammatoria sistemica. Reazioni trasfusionali secondarie alla sensibilizzazione di un cane nei confronti di altri antigeni eri-

Un cane DEA 1 negativo trasfuso con sangue DEA 1 positivo, svilupperà nell'arco di qualche giorno anticorpi in grado di indurre gravi reazioni trasfusionali nel caso di una successiva riesposizione.

trocitari (ad esempio DEA 4 o DEA 7) sono descritte in letteratura solo come eventi sporadici^{5,32,34}, tuttavia spesso è difficile caratterizzare questi eventi, e sicuramente sono molti gli aspetti che devono essere ancora chiariti riguardo l'immuno-ematologia canina e che sono oggetto di studi attuali. Nel sistema DEA 1, per esempio, per anni si era ipotizzata la presenza di tre diversi antigeni: DEA 1.1, DEA 1.2, DEA 1.3, con caratteristiche immunizzanti non chiare. Studi molto recenti sembrano dimostrare invece come l'eterogeneità rilevata in passato dai test sierologici, sia in realtà secondaria alla differenza quantitativa e non qualitativa di uno stesso antigene (un cane precedentemente definito DEA 1.2 positivo sarà pertanto considerato oggi DEA 1 debolmente positivo)³⁵. I gruppi sanguigni spesso sono riconosciuti solo indirettamente, attraverso la presenza in un soggetto di specifici anticorpi. Nel 2007 è stato identificato in questo modo un nuovo antigene eritrocitario, non associato a DEA 1, 3, 4, 5 e 7 e denominato *Dal*. Questo antigene è stato individuato grazie alla presenza di specifici anticorpi evidenziati in un cane dalmata e sviluppatosi nel paziente in se-