

---

# Evaluarea efectelor biologice ale terapiei transfuzionale și determinarea necesarului de sânge transfuzabil în anemie la viței din rasa Holstein

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

---

Doctorand **Vasile Ioan Muntean**

---

Conducător de doctorat **Prof. Dr. Ioan Marcus**

---



---

## INTRODUCERE

Transfuzia de sânge reprezintă un act terapeutic ce constă în administrarea sângelui integral sau a unor componente din sânge la un animal. Primele relatări cu privire la această procedură sunt datate din secolul XVII, însă dezvoltarea transfuziei de sânge ca terapie în medicina veterinară a început după 1960.

Principalele dificultăți în dezvoltarea ca ramură terapeutică în medicina veterinară au fost reprezentate de absența unor structuri organizate care să asigure produse sanguine, a unor bănci de sânge și a costurilor ridicate implicate, în pofida faptului că terapia transfuzională în domeniul veterinar are aceleași indicații ca în cazul medicinei umane. Inițial transfuzia de sânge a fost utilizată pentru animalele de companie, doar în ultimii ani fiind folosită în practica de teren în medicina bovinelor. Indicațiile majore ale transfuziei de sânge sunt reprezentate de anemie (cele mai frecvente fiind cele de tip hemoragic), restaurarea funcției hemostazei (mai ales caz de intoxicații cu rodenticide), restaurarea proteinemiei și a presiunii oncotice prin macromoleculele plasmatică furnizate, diareea neonatală a vițeilor și refacerea titrului anticorpilor plasmatici la vițeii la care transferul pasiv din colostru a fost neadecvat.

În prezent există foarte puține studii care să analizeze amănunțit efectele biologice ale transfuziei cu sânge integral la bovine, atât din punct de vedere hematologic și biochimic cât și din punct de vedere al impactului asupra markerilor stresului oxidativ plasmatic. De asemenea, în medicina bovinelor nu există o formulă de calcul pentru determinarea necesarului de sânge transfuzabil utilizabilă în condiții de teren, utilizând masa corporală, hematocritul pacientului și hematocritul donatorului, așa cum există în cazul carnivorelor domestice.

---

## STRUCTURA LUCRĂRII

Lucrarea intitulată „Evaluarea efectelor biologice ale terapiei transfuzionale și determinarea necesarului de sânge transfuzabil în anemie la viței din rasa Holstein ” conține 115 pagini și este structurată în două părți.

Prima parte este structurată în 6 capitole și tratează stadiul actual al cunoașterii. În cadrul acestei părți am sintetizat principalele elemente din domeniul transfuziei cu sânge integral la bovine. Capitolul 1 are ca subiect fiziologia eritropoiezei, cu o descriere succintă a principalelor stadii și etape din hemato și eritropoieză. Capitolul 2 cuprinde cele mai frecvente tulburări eritrocitare ce reprezintă principalele indicații pentru transfuziile de sânge. În acest capitol este descrisă anemia (regenerativă și neregenerativă), alături de tulburările de coagulabilitate la bovine și rolul transfuziei cu sânge în restabilirea proeinemiei. În capitolul 3 sunt descrise principalele aspecte legate de grupele sanguine la bovine și testele de compatibilitate, iar în capitolul 4 sunt prezentate elementele care stau la baza alegerii donatorului și aspecte legate de tehnica de administrare ale transfuziei cu sânge integral. În capitolul 5 sunt prezentate cele mai frecvente reacții post-transfuzionale iar în capitolul 6 sintetizat câteva elemente ce țin de stresul oxidativ post-transfuzional.

Partea a 2-a este structurată în capitole și cuprinde contribuția personală din cadrul acestei lucrări. Capitolul 7 prezintă ipoteza de lucru, iar în capitolul 8 sunt prezentate obiectivele lucrării. În capitolul 9 sunt descrise materialele și metodele generale de lucru care stau la baza protocolului experimental pentru toate cele 3 studii prezentate în cadrul acestei lucrări, și anume materialul biologic utilizat, construirea loturilor experimentale, protocolul de inducere al anemiei experimentale și metodele de evaluare a compatibilității sângelui folosite. În capitolul 10 este reprezentat de primul studiu din cadrul acestei cercetări, intitulat ” Evaluarea efectului transfuziei cu sânge integral asupra stresului oxidativ plasmatic la viței din rasa Holstein”, urmat de capitolul 11 care cuprinde studiul 2 intitulat ” Evaluarea eficienței transfuziilor cu

---

sânge integral la viței din rasa Holstein” și capitolul 12 în care este prezentat studiul 3 intitulat ”Calculul volumului necesar de sânge transfuzabil pentru tratarea anemiei la viței Holstein”. Concluziile generale fac obiectul capitolului 13, iar în capitolul 14 sunt reprezentate elementele de originalitate și caracterul inovator al lucrării. Lucrarea se încheie cu lista bibliografiei citate (146 titluri bibliografice).

## REZULTATELE CERCETĂRII

În partea a doua a lucrării am studiat efectele biologice ale transfuziei cu sânge integral la viței din rasa Holstein. Studiile au fost efectuate în cadrul fermei SC Stazoo SRL, Galda de Jos, Jud. Alba, care are obiectul principal de activitate producerea de lapte de vacă. Obiectivele principale pe care ni le-am propus:

- 1) Evaluarea nivelului stresului oxidativ plasmatic determinat de transfuzia cu sânge integral la bovine;
- 2) Evaluarea eficienței transfuziei cu sânge integral prin analiza parametrilor hematologici și biochimici consecutiv transfuziei cu sânge integral;
- 3) Dezvoltarea unei formule matematice care să permită calculul cantității de sânge necesare pentru transfuzie, utilizând parametri determinați în condiții de teren;

**Capitolul 9**, intitulat „materiale și metode generale” cuprinde selectarea materialului biologic pentru construirea loturilor experimentale, alături de metodele de evaluare ale statusului de sănătate ale animalelor ce au format loturile, alături de metodele de prelevare a probelor biologice și intervalele în care acestea s-au făcut. În cadrul aceluiași capitol este descris protocolul de inducere al anemiei experimentale, dezvoltat pornind de la un model utilizat pentru iepuri descris de Dunne și colab., 2006, care au indus un anumit grad de anemie în condiții izovolemice. Acest protocol a constatat în extragerea a aproximativ 38% din volumul total de sânge circulant al fiecărui vițel, menținând volumul constant al sângelui din patul vascular. Condițiile de izovolemie au fost esențiale pentru a obține o anemie moderată și a evita posibilele efecte secundare date de hipovolemie. În prima etapă a fost fixat prin sutură un cateter venos (12 G 80 mm) la nivelul venei jugulare, urmat de plasarea unui cateter venos la nivelul venei

---

safene (12 G, 60 mm). Sângele a fost extras în 2 etape: în prima etapă a fost extras 20 din volumul de sânge circulant fără să fie nevoie de compensare de fluide i.v. (Mudge, 2020), iar în a doua etapă, restul de 18% a fost extras în timp ce prin cateterul plasat în vena safenă s-au administrat fluide, concomitent cu extragerea sângelui, în volume egale cu volumul de sânge extras. Astfel, volumul sângelui circulant a rămas constant. Sângele a fost colectat în pungi de transfuzie de 450 ml de uz uman (pungă de sânge integral CPDA-1, Lotus Global, Londra, Regatul Unit). Compatibilitatea sângelui a fost evaluată prin metoda Crossmatch (major și minor). Crossmatch-ul major constă în adăugarea serului pacientului peste hematiile donatorului, urmată de un protocol specific pentru a determina prezența hemolizei și/sau aglutinării. Crossmatch-ul minor se efectuează prin adăugarea serului donatorului peste hematiile pacientului, într-un tub pentru hemoliză, după care sunt evaluate din punct de vedere al aglutinării (aglutinare + indică incompatibilitate între cele 2 probe de sânge, în timp ce lipsa aglutinării semnifică faptul că cele 2 probe sunt compatibile).

**Capitolul 10**, intitulat „Evaluarea efectului transfuziei cu sânge integral asupra stresului oxidativ plasmatic la viței din rasa Holstein” a avut drept scop analiza unor parametri de stres oxidativ plasmatic (capacitatea antioxidantă totală (CAT), statusul antioxidant total (SAT), disponibilitatea oxidului nitric (ON), malon dialdehida (MDA), tiolii și indicele stresului oxidativ (ISO)) în contextul utilizării transfuziilor de sânge la viței din rasa Holstein. Pentru realizarea acestui studiu, au fost utilizate 3 loturi a câte 3 animale (categoria 100,1 ± 3,1 kg). După inducerea anemiei experimentale, lotul 1 (martor) a primit fluide i.v. (soluție salină, Duphalyte și Borogluconat de calciu) 18 ml/kgc masă corporală. Lotul 2 (heterotransfuzie) a primit sânge compatibil în aceeași cantitate (18 ml/kg MC), iar lotul 3 (autotransfuzie) a primit sângele propriu. Viteza de administrare a fost de 20-40 ml/kg/h, fără să se depășească 1000 ml/h (Hubans-Belkilani, 2001). Acest studiu a pornit de la premisa că stresul oxidativ joacă un rol important în deteriorarea biologică și fagocitoza eritrocitelor, sau chiar în eritropoieza inefficientă (Fibach și colab., 2008). Consecutiv terapiei transfuzionale în anemie nu a fost observată nici o variație semnificativă din punct de vedere statistic, la niciunul din cei 6 parametri evaluați, pe parcursul celor 14 zile posttransfuzie. Aceste rezultate sunt în concordanță cu concluziile studiilor din literatură, stresul oxidativ având un rol

---

important în eritrogeneză, iar mai apoi în durata de viață și mecanismelor de distrugere a eritrocitelor. Conform rezultatelor obținute în studiile noastre, terapia transfuzională nu are capacitatea de a genera un stres oxidativ semnificativ la nivel plasmatic.

**Capitolul 11**, intitulat „Evaluarea eficienței transfuziilor cu sânge integral la vițeii din rasa Holstein” a avut ca scop verificarea în vivo a eficienței transfuziei cu sânge integral la bovine, din punct de vedere hematologic și biochimic, folosind un protocol experimental în condiții controlate. Pentru realizarea acestui studiu, au fost utilizate 3 loturi a câte 3 animale (categoria  $100,1 \pm 3,1$  kg). Consecutiv protocolului de inducere a anemiei experimentale, valorile obținute (ziua 2- înaintea efectuării transfuziei) sunt reprezentative pentru o anemie moderată (HGB  $7.22 \pm 0.45$  g/dL; E  $7.48 \pm 0.36$   $10^6/\mu\text{L}$ ; HCT  $21.99 \pm 1.42$  %). După inducerea anemiei experimentale, lotul 1 (martor) a primit fluide i.v. (soluție salină, Duphalyte și Borogluconat de calciu) 18 ml/kg masă corporală. Lotul 2 (heterotransfuzie) a primit sânge compatibil în aceeași cantitate (18 ml/kg MC), iar lotul 3 (autotransfuzie) a primit sângele propriu. Viteza de administrare a fost de 20-40 ml/kg/h, fără să se depășească 1000 ml/h. Parametrii hematologici ai animalelor (supuse AIP) incluse în studiu au fost comparați cu indivizii care au primit transfuzii cu sânge compatibil, cu lotul martor (care a primit soluție salină) dar și cu un lot la care au fost efectuate autotransfuzii. Această manieră de lucru a fost aleasă pentru a verifica ipoteza conform căreia durata scurtă de viață a hematiilor transfuzate în sistemul circulator al organismului receptor se datorează numai unor mecanisme mediate imun, sau sunt implicate alte mecanisme în eliminarea rapidă a hematiilor transfuzate. Rezultatele obținute indică faptul că transfuzia cu sânge integral are o eficiență limitată în cazul bovinelor, parametri eritrocitari începând să scadă la doar 2 zile consecutiv transfuziei (lotul heterotransfuzie), urmând ca după alte 3 zile să fie relativ la același nivel cu lotul martor, la care nu a fost administrat sânge. În următoarele zile în care animalele au fost monitorizate din punct de vedere al parametrilor hematologici, transfuzia de sânge nu a influențat recuperarea animalelor, eritrocitele înregistrând o dinamică similară la toate cele trei loturi. Hemoliza post-transfuzională nu a influențat semnificativ parametrii biochimici studiați, iar în cadrul globulelor albe nu au existat variații semnificative cu excepția bazofilelor și a eozinofilelor. Dar și în cazul acestora, au avut caracter tranzitoriu, revenind la nivelele similare celor de la debutul studiilor.

---

Autotransfuzia a fost mai puțin eficientă decât era preconizat, numărul eritrocitelor scăzând după ziua a 5-a. Mecanismele implicate în distrugerea hematiilor pot fi doar prezumtive, putând fi implicați factori care țin mai degrabă de procedurile de recoltare și/sau conservare și/sau administrare, decât de compatibilitate.

**Capitolul 12**, intitulat „Calculul volumului necesar de sânge transfuzabil pentru tratarea anemiei la viței Holstein”, a avut scopul de a dezvolta o formulă care să elimine factorii subiectivi din procesul terapeutic și care să permită determinarea mai precisă a volumului necesar de sânge pentru transfuzie la viței, într-un interval de timp mai scurt, folosind drept parametri hematocritul donatorului, masa corporală și hematocritul pacientului și o constantă (CC) caracteristică fiecărei specii. Pentru efectuarea acestui studiu, au fost folosite 2 loturi experimentale (categoria  $100,1 \pm 3,1$  kg și  $151,1 \pm 3,0$  kg), a câte 10 indivizi fiecare. După 24 de la inducerea anemiei experimentale, fiecare lot a fost tratat prin autotransfuzie: indivizii din primul grup a primit câte 1800 ml, iar cei din al doilea grup, au primit câte 2700 ml sânge, cu un debit de administrare de 20-40 ml/kg/h, fără a depăși un litru pe oră. Aceasta cantitate a fost administrată pentru a crește HCT cu maximum 10% și pentru a evita supraîncărcarea circulatorie post transfuzional. Pornind de la formula descrisă de Godinho-Cunha și colab., (2011) și Helm (2014), pentru a calcula valoarea constantei CC pentru bovine cu intervale de greutate specifice, am înlocuit toate variabilele utilizate în formulă cu valori cunoscute: masa corporală, volumul de sânge transfuzat, HCT-ul donator, HCT-ul dorit (HCT\_Fin) și HCT-ul pacientului (HCT\_ini), constanta CC rămânând singurul parametru necunoscut în ecuație. Valorile constantelor CC obținute în urma experimentelor au fost de 80,6 pentru grupul de  $100,1 \pm 3,1$  kg și 76,5 pentru grupul  $151,1 \pm 3,0$  kg și a validat statistic (prin regresie liniară cu punct fix) valorile medii ale constantelor CC calculate prin dovedirea „planeității” seriei ordinale în corelație cu valorile greutății corporale (MC). De asemenea, se poate afirma (pe baza testului ANCOVA,  $P = 0,05$ ) că aceste două grupe de greutate au valori medii ale constantelor CC diferite, cu distribuții de valori diferite și aceiași coeficienți de variație. Acest experiment a analizat doar două grupe de greutate separat ( $100,1 \pm 3,1$  kg și  $151,1 \pm 3,0$  kg) și a generat două valori statistice diferite ale constantelor CC. Diferența greutății corporale (MC) dintre grupurile analizate poate fi considerată mare, dar nu acoperă

întregul interval de greutate întâlnit în practica clinică. Metoda propusă se aplică la două categorii de greutate specifice și, pentru a atenua această limitare experimentală, lucrările viitoare ar trebui să ia în considerare analiza unei game mai largi de greutate și grupuri mai mari.



---

## Bibliografie

1. Drieu, C. (2009): Hematologie en Medecine Bovine et Application a la Realisation d'une Transfusion, Ecole Nationale Veterinaire d'Alfort, 109-111.
2. Dunne, J., Caron, A., Menu, P., Alayash, A. I., Buehler, P. W., Wilson, M. T., Silaghi-Dumitrescu, R., Faivre, B., Cooper, C. E., (2006): Ascorbate removes key precursors to oxidative damage by cell-free haemoglobin in vitro and in vivo. *Biochemical Journal* 399, 513-524.
3. Fibach Eitan, Rachmilewitz Eliezer (2008): The role of oxidative stress in hemolytic anemia. *Current Molecular Medicine*, Volume 8, Number 7, 2008, pp. 609-619(11).
4. Godinho-Cunha, L. F., Ferreira, R. M. R. F., Silvestre-Ferreira, A. C. (2011): Whole blood transfusion in small animals: indications and effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 83, 611-617.
5. Helm, J. (2014): Canine and feline blood transfusions in practice. *Veterinary Ireland Journal*, 4, 525-529.
6. Hubans-Belkilani, V. J. (2001): La transfusion sanguine chez les bovins. *Ecole Nationale Veterinaire D'Alfort*, 34-37.
7. Mudge, M. C. (2010) Blood Transfusion in Large Animals, In: Weiss, D. J., Wardrop, K. J., Schalm's Veterinary Hematology. Blackwell Publishing Lfd., 2121 State Avenue, Ames, Iowa 50014-8300, USA, 757-762.