



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Scienze Veterinarie

Corso di Laurea Magistrale in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

**LA TRASFUSIONE NEL CANE:
VALUTAZIONE RETROSPETTIVA
DI ALCUNI PARAMETRI
CLINICO-PATOLOGICI**

RELATORE

Prof. George Lubas

CANDIDATA

Silvia Vaglica

CORRELATORE

Dott.ssa Alessandra Gavazza

ANNO ACCADEMICO: 2015-2016

Sommario

1	RIASSUNTO.....	1
2	ABSTRACT.....	2
	PARTE GENERALE	3
3	INTRODUZIONE.....	3
4	GRUPPI SANGUIGNI E TEST DI CROSS-MATCH.....	4
4.1	Gruppi sanguigni.....	4
4.2	Studi di prevalenza dei gruppi sanguigni	4
4.3	Significato clinico dei gruppi sanguigni	6
4.4	Determinazione del gruppo sanguigno	7
4.5	Prove di cross-match	9
5	DONAZIONE DI SANGUE.....	10
5.1	Donatori di sangue	10
5.2	Criteri di esclusione permanente e temporanea dalla donazione.....	12
5.3	Prelievo di sangue intero.....	13
6	SANGUE INTERO ED EMOCOMPONENTI	14
6.1	Preparazione, conservazione ed etichettatura del sangue intero	14
6.1.1	Preparazione e conservazione del sangue intero	14
6.1.2	Etichettatura del sangue intero	16
6.2	Preparazione, conservazione ed etichettatura degli emocomponenti	17
6.2.1	Preparazione e conservazione degli emocomponenti.....	17
6.2.2	Etichettatura emocomponenti	19
6.3	Trasporto del sangue e degli emocomponenti	20
7	TRASFUSIONE	20
7.1	Trasfusione	20
7.2	Scelta del prodotto trasfusionale	21
7.3	Somministrazione della trasfusione e monitoraggio	29
8	PRINCIPALI REAZIONI TRASFUSIONALI E TRATTAMENTO	33
8.1	Reazioni trasfusionali	33
8.2	Trattamento delle reazioni trasfusionali acute	37
	PARTE SPERIMENTALE.....	39
9	INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE.....	39
10	MATERIALI E METODI	39
10.1	Donatori e prodotti trasfusionali	39
10.2	Anemia e valori di ematocrito nei soggetti riceventi	41
10.3	Incremento di ematocrito nel ricevente in relazione all'ematocrito iniziale.....	42

10.4	Incremento di ematocrito dei riceventi in relazione alle caratteristiche del prodotto trasfuso	43
10.5	Incremento di ematocrito nel ricevente in relazione alla causa di anemia	43
10.6	Monitoraggio dei parametri vitali	44
10.7	Soggetti politrasfusi.....	44
10.8	Analisi statistica	44
10.9	Intervalli di riferimento	45
11	RISULTATI.....	46
11.1	Donatori e prodotti trasfusionali	46
11.2	Anemia e valori di ematocrito nei soggetti riceventi	47
11.3	Anemia e valori di ematocrito nei soggetti riceventi	48
11.4	Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione all’ematocrito iniziale.....	50
11.5	Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione alle caratteristiche del prodotto trasfuso	58
11.6	Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione alla causa di anemia	59
11.7	Monitoraggio dei parametri vitali	65
11.8	Soggetti politrasfusi.....	69
12	DISCUSSIONE.....	69
12.1	Donatori e prodotti trasfusionali	69
12.2	Anemia e valori di ematocrito nei soggetti riceventi	70
12.3	Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione all’ematocrito iniziale.....	70
12.4	Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione alle caratteristiche del prodotto trasfuso	72
12.5	Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione alla causa di anemia	72
12.6	Monitoraggio dei parametri vitali	73
12.7	Soggetti politrasfusi.....	74
13	CONCLUSIONI	75
14	BIBLIOGRAFIA.....	76

1 RIASSUNTO

Parole chiave: trasfusione, cane, ematocrito, ematocrito post-trasfusione, PRBC, SWB

Background: la medicina trasfusionale nel cane si è molto diffusa negli ultimi anni, come pratica terapeutica e salvavita. È stato eseguito uno studio retrospettivo (gennaio 2010- marzo 2016) presso l’Ospedale Didattico Veterinario “Mario Modenato”, Università di Pisa.

Animali: attraverso l’analisi delle cartelle cliniche di 108 soggetti trasfusi con concentrato di RBC o sangue intero conservato, sono state prese in considerazione le alterazioni cliniche e clinico-patologiche di 85 soggetti che presentavano anemia.

Obiettivi: determinare i principali motivi di trasfusione e dopo aver valutato e classificato le cause di anemia dei riceventi, analizzare l’incremento di ematocrito dopo la trasfusione in relazione alla gravità e decorso dell’anemia e alle caratteristiche del prodotto trasfuso; analizzare i parametri vitali in corso di trasfusione: frequenza cardiaca (FC), frequenza respiratoria (FR) e temperatura.

Materiali e metodi: l’anemia dei riceventi è stata classificata in base a Hct, MCV e MCHC; l’incremento di Hct nel ricevente a T1, T2, T3, T4 e T5 è stato correlato statisticamente all’Hct pre-trasfusione; i riceventi sono stati divisi in 3 gruppi in base alla gravità dell’anemia (gravissima, grave e moderata) e per ogni gruppo si è calcolato l’andamento temporale dell’ Hct e si sono confrontati gli incrementi di Hct tra i gruppi; l’incremento di Hct nei riceventi a T1, T2, T3 e T4 è stato correlato statisticamente al volume trasfuso (ml/kg) e all’età della sacca. È stato analizzato l’andamento temporale e l’incremento di Hct in base alla causa di anemia; sono stati analizzati i valori di FC, FR e temperatura durante la trasfusione a T0 (inizio trasfusione), T1(dopo 15 minuti), T2 (a metà trasfusione) e T3 (a $\frac{3}{4}$ della trasfusione).

Risultati e conclusioni: il principale motivo di trasfusione di RBC è stata una perdita eritrocitaria acuta (53%), causata soprattutto da emorragia (36%); l’anemia era nella maggior parte dei casi gravissima (55%) o grave (35%) e quasi sempre con rigenerazione lieve o assente (87,5%). I cani con anemia più grave hanno avuto un maggior incremento di Hct a T1 e T3; l’incremento di Hct a T3 e T4 era inversamente proporzionale all’età della sacca. I valori di FC e FR sono diminuiti durante la trasfusione; abbiamo trovato una differenza significativa tra i valori di FC a T0 e T1 e quelli a T3 e T4. Tra i soggetti trasfusi più di una volta, la maggior parte avevano anemia da perdita eritrocitaria acuta.

2 ABSTRACT

Transfusion in the dog: retrospective assessment of some clinico-pathological parameters

Keywords: transfusion, dog, hematocrit, post-transfusion hematocrit, PRBC, SWB

Background: Transfusion medicine in dogs has become very popular in recent years, as a therapeutic and life-saving practice. A retrospective study (January 2010- March 2016) has been done at the "Mario Modenato" Veterinary Teaching Hospital, Pisa University.

Animals: Through the analysis of medical records of 108 patients transfused with Packed RBC or Stored Whole Blood the clinical and clinico-pathological changes of 85 transfused subjects with anemia were considered.

Aims: to determine the main reasons for the transfusion and after having examined and classified the causes of the anemia of the recipients, to analyze the hematocrit increase after the transfusion in relation to the severity and time trend of the anemia and to the characteristics of the transfused product; to analyze the vital signs during the transfusion: heart rate, HR, respiratory rate, RR, and temperature.

Material and methods: the anemia of the recipients has been classified according to Hct, MCV and MCHC; the increase of Hct in the recipient at T1, T2, T3, T4 and T5 has been correlated statistically to Hct pre-transfusion; the recipients have been divided into 3 groups according to the severity of the anemia (very severe, severe and moderate) and the time course of Hct has been calculated in each group and the Hct increases among the groups have been compared; the increase of Hct in recipients at T1, T2, T3 and T4 has been statistically correlated to the transfused volume (ml/kg) and the age of the blood bag. The time course and the increase of Hct based on the cause of anemia have been analyzed. Measurements of HR, RR and the temperature during the transfusion at T0 (start of transfusion), T1 (after 15 minutes), T2 (in middle transfusion), T3 (¾ transfusion) have been analyzed.

Results and conclusions: the main reason of the transfusion was an acute RBC loss (53%), mainly caused by hemorrhage (36%); in most cases the anemia was very severe (55%) or severe (35%) and almost with mild or absent regeneration (87.5%). Dogs with more severe anemia have had a greater increase in hematocrit at T1 and T3; the increase in hematocrit in T3 and T4 was inversely proportional to the age of the blood bag. The values of HR and FR decreased during the transfusion; a significant difference between the HR values at T0 and T1 and those ones at T3 and T4 were found. Among the patients transfused more than once, most of them had anemia due to acute RBC loss.

PARTE GENERALE

3 INTRODUZIONE

La trasfusione è l'infusione di sangue o suoi componenti da un soggetto donatore ad un soggetto ricevente; l'autotrasfusione è il prelievo e la successiva re-immissione in circolo nello stesso soggetto. La medicina trasfusionale nel cane si è diffusa molto negli ultimi decenni, come pratica terapeutica e salva-vita; ciò ha favorito lo sviluppo di questa branca della medicina veterinaria e di strutture veterinarie trasfusionali e banche del sangue.

In Italia la trasfusione in ambito veterinario è regolamentata dalla "Linea guida relativa all'esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in ambito veterinario", redatta dal Ministero della Salute e pubblicata sulla Gazzetta Ufficiale n.25 del 1 febbraio 2016, che ha modificato la precedente Linea Guida, risalente al 2008. La Linea Guida si applica solamente al sangue intero, definito come "il sangue prelevato, per lo scopo trasfusionale, da animale donatore idoneo, con materiale sterile e in sacche autorizzate dal Ministero della Salute contenenti una soluzione anticoagulante-conservante" ¹. La Linea Guida è composta da 10 articoli e 7 allegati e disciplina vari aspetti, tra i quali: il prelievo, l'idoneità alla donazione e i criteri di esclusione, gli esami obbligatori ad ogni donazione, la tracciabilità e l'etichettatura del sangue ed i requisiti delle strutture veterinarie.

La linea guida differenzia la struttura veterinaria trasfusionale dalla banca veterinaria del sangue, definendo la prima come struttura che svolge attività trasfusionale in emergenza ed esclusivamente al suo interno; la banca veterinaria del sangue è, invece, una struttura dove può essere prelevato, conservato e commercializzato il sangue prelevato dal donatore idoneo ¹.

Sono esclusi dal campo di applicazione della Linea Guida gli emocomponenti e gli emoderivati, attualmente regolamentati dalla legislazione sul farmaco veterinario (D. Lgs. n.193/2006).

Per emocomponente si intende il prodotto derivato dalla frammentazione del sangue, mediante soli mezzi fisici o aferesi ¹; gli emocomponenti più frequentemente utilizzati in medicina veterinaria sono il concentrato di eritrociti (PRBC) ed il plasma.

L'emoderivato si ottiene, invece, tramite processazione industriale a partire dall'emocomponente; ne sono esempi l'albumina, le immunoglobuline, i fattori della coagulazione.

Gli emocomponenti sono legalmente equiparati agli emoderivati e la loro preparazione è possibile soltanto in alcuni centri appositamente autorizzati dal Ministero della Salute; l'utilizzo di emocomponenti nella pratica trasfusionale veterinaria ha notevoli vantaggi, tra i quali una riduzione degli effetti indesiderati e la possibilità da parte di più soggetti di usufruire di una donazione.

La trasfusione è una pratica terapeutica non esente da rischi e deve essere condotta nel rispetto della compatibilità tra donatore e ricevente, preliminarmente accertata tramite test come la tipizzazione del gruppo sanguigno ed il cross-match.

4 GRUPPI SANGUIGNI E TEST DI CROSS-MATCH

4.1 Gruppi sanguigni

I gruppi sanguigni sono determinati dalla presenza di antigeni (rappresentati da glicoproteine, glicolipidi o glucidi) sulla superficie dei globuli rossi ; questi antigeni sono specie specifici e trasmessi per via ereditaria, secondo le leggi di dominanza mendeliana ².

Nel cane, i gruppi sanguigni sono classificati secondo il sistema DEA (Dog Erythrocytes Antigen).

Sono stati descritti 7 gruppi sanguigni: DEA 1, DEA 3, DEA 4, DEA 5, DEA 6, DEA 7, DEA 8; di questi, in realtà, se ne conoscono solo 5; DEA 6 e DEA 8, infatti, non sono stati più riconosciuti.

Il sistema di gruppo DEA 1 è stato suddiviso nei sottotipi DEA 1.1, DEA 1.2, DEA 1.3 (quest' ultimo molto raro) , con diversa forza antigenica. Tra questi sottotipi DEA 1.1 ha la più alta incidenza e il più alto potere immunogeno e, per queste motivazioni, è routinariamente testato.

Recentemente, uno studio sull'espressione dell' antigene DEA 1, eseguito utilizzando la citometria a flusso quantitativa e una tecnica immunocromatografica con anticorpo monoclonale anti-DEA 1, suggerisce che gli alleli appartenenti al sistema di gruppo DEA 1 hanno un epitopo simile, riconosciuto dagli anticorpi monoclonali ³.

Ad oggi, quindi, si pensa che DEA 1.1, DEA 1.2 e DEA 1.3 siano espressioni progressive dello stesso antigene: si parla, perciò, di DEA 1.

Nel 2007, uno studio ha messo in evidenza la presenza di un nuovo antigene eritrocitario canino, chiamato DAL, non correlato con i gruppi sanguigni DEA. Il nuovo antigene è stato indentificato tramite la scoperta di specifici alloanticorpi (immunoglobuline di classe G) in un cane Dalmata , precedentemente sensibilizzati da una trasfusione di sangue ⁴. Tuttavia, però, non è evidente il significato clinico di questo gruppo sanguigno.

Recentemente, è stata messa in evidenza la presenza di nuovi antigeni eritrocitari, chiamati Kai 1 e Kai 2, tipizzati mediante eritrosedimentazione su colonna di gel, con anticorpo monoclonale. Molti cani risultano essere Kai 1 positivi e soltanto pochi Kai 2 positivi; il profilo antigenico più frequente risulta Kai 1+ e Kai 2- ⁵.

4.2 Studi di prevalenza dei gruppi sanguigni

Per quanto riguarda la diffusione dei gruppi sanguigni nel cane, può essere così sintetizzata:

DEA	PREVALENZA
1	40%
3	Frequente nelle razze orientali
4	98%
5	25%
7	50%

Tabella 1 – prevalenza dei gruppi sanguigni DEA nel cane.

Tuttavia, gli studi di prevalenza sono, a volte, contrastanti in quanto sono influenzati, oltre che dall'area geografica, dalla linea di sangue presa in considerazione.

-La prevalenza dell'antigene DEA 1.1 nella popolazione di cani Galgos (Spanish Greyhounds) è risultata essere del 51,7% , quella delle altre razze del 55,7% ⁶.

-Un altro studio del 2015 ha verificato la prevalenza degli antigeni eritrocitari DEA 1, 4 e 7 in 205 cani galgos. Il risultato è stato che il 54,6% dei cani era DEA 1 positivo; dei 150 campioni testati, il 100% era DEA 4 positivo e il 7% era anche DEA 7 positivo ⁷.

-Uno studio, condotto in Svizzera nel 2011, ha testato 304 cani per l'antigene DEA 1.1 tramite tecnica dell'agglutinazione su colonna di gel (ID-Gel Test Canine DEA 1.1, DiaMed): il 53% dei cani totali risultava DEA1.1 positivo; tra i cani meticci il 49% è risultato DEA1.1 positivo. ⁸.

-É stato evidenziato che la frequenza dell'antigene eritrocitario DEA 1.1 nei Greyhound era del 13,1%, significativamente più bassa rispetto a quella dei cani non-Greyhound (60,6%).⁹.

-In uno studio del 2002 in Sud Africa (Onderstepoort, Pretoria) sulla prevalenza del DEA 1.1 sulle razze canine è emerso che la prevalenza totale dell'antigene DEA 1.1 era del 47%; la prevalenza del DEA 1.1 sui cani di razza Boxer e Pastore Tedesco era <20%, mentre sui cani di razza Rottweilers, Alano, San Bernardo e Dalmata era >75% ¹⁰.

-In uno studio del 2011 su 274 cani Portoghesi, il 56,9% di questi è risultato DEA 1.1 positivo; tra questi cani, tutti i Boxer, i Pastori Tedeschi e i Doberman sono risultati DEA1.1 negativi; tutti i San Bernardo DEA 1.1 positivi, l'88,9% dei Golden Retrievers, l'88,2% dei Rottweiler, il 61,4% dei cani meticci sono risultati DEA 1,1 positivi ¹¹.

-Uno studio retrospettivo, condotto analizzando i dati di 4 banche del sangue universitarie in Italia (Perugia, Milano, Pisa e Bologna), su 3 razze canine spesso utilizzate come cani donatori per la loro taglia e la loro natura (Cane Corso, Bovaro del Bernese e Retriever) e su incroci, non ha smentito la letteratura. Si è, infatti, notata una prevalenza di DEA 1.1 negativi in cani corso e incroci e una prevalenza di DEA 1.1 positivi nei Retrievers e Bovaro del bernese. ¹².

-Una pubblicazione del 2015, ha analizzato la prevalenza dei gruppi sanguigni DEA 4 e DEA 7 in 84 cani donatori italiani, realizzato in tre centri trasfusionali delle università di Milano, Pisa e Perugia, tramite la tecnica di agglutinazione su gel. Di questi 84 cani, il 40,5% è risultato DEA 1 positivo (utilizzando il test di agglutinazione su cartina o test immunocromatografici). La prevalenza dei DEA 4 positivi e dei DEA 7 positivi, utilizzando la tecnica di agglutinazione su gel, è risultata essere rispettivamente del 100% e del 33,3% ¹³.

-Un altro lavoro, condotto su 890 cani, ha analizzato la frequenza dell'espressione dell'antigene DEA 1 in cani di razza e meticci, per stabilire l'eventuale associazione tra questa e la razza. Sulla popolazione totale, i cani DEA 1 positivi sono risultati il 62% (determinazione del gruppo sanguigno DEA 1 con kit commerciale basato su metodo immunocromatografico). Su 890 cani, la maggior parte (714 cani) è rappresentata da soggetti di razza ¹⁴. I risultati sono stati i seguenti:

- **DEA 1 POSITIVI:**

1. -Rottweiler (100%);
2. Bassotto (100%);
3. Segugio Maremmano (100%);
4. Gran Bleu de Guascogne (100%);
5. Briquet Griffon Vendéen (94%);

6. Bovaro del Bernese (93%);
7. Setter Inglese (86%);
8. Segugio della Giura (83%);
9. Golden Retriever (80%);
10. Labrador Retriever (75%);
11. Ariegeois (73%);
12. Pinscher (70%);

- **DEA 1 NEGATIVI:**

1. Dogo argentino (100%);
2. Dobermann (92%);
3. Pastore tedesco (90%);
4. Boxer (80%);
5. Cane Corso (72%);

4.3 Significato clinico dei gruppi sanguigni

Ogni gruppo sanguigno è, dunque, caratterizzato dalla presenza di uno specifico antigene sulla membrana dei globuli rossi, in grado di stimolare la produzione di anticorpi della classe IgG e IgM, con azione emolizzante ed emoagglutinante, responsabili delle principali reazioni trasfusionali.

Gli antigeni eritrocitari e gli anticorpi sono detti rispettivamente alloantigeni e alloanticorpi, in quanto presenti in alcuni individui, nell'ambito della stessa specie.

L' antigene del gruppo DEA 7 si pensa sia prodotto altrove nel corpo , poi secreto nel plasma e adsorbito sulla superficie eritrocitaria ².

Nel cane gli anticorpi sono quasi sempre stimolati; tuttavia, cani che non sono stati trasfusi possono avere alloanticorpi naturali verso gli antigeni eritrocitari, il cui significato clinico è limitato. La presenza di alloanticorpi naturali è stata dimostrata nei cani DEA 7 negativi (fino al 50% di casi) e nei gruppi DEA 3 e DEA 5, nei quali sono presenti, però, a basso titolo. Questi anticorpi non causano reazioni emolitiche, ma rimozione precoce dei globuli rossi trasfusi, senza importanti ripercussioni cliniche. In cani DEA 1 negativi non sono presenti anticorpi naturali.

Va tenuto in considerazione che cani DEA 1 negativi, trasfusi per la prima volta con sangue DEA 1 positivo, possono avere, entro 9 giorni, la produzione di anticorpi, che determina la riduzione dell' emivita dei globuli rossi trasfusi, causando una reazione trasfusionale ritardata ².

Anche se nella maggior parte dei casi non si osservano reazioni trasfusionali alla prima trasfusione, il rischio di una prima trasfusione "alla cieca" (non testando la compatibilità tra donatore e ricevente) è la sensibilizzazione. Trasfondendo sangue DEA 1 positivo ad un cane DEA 1 negativo, si stimola la produzione, in quest'ultimo, di anticorpi, che, ad una seconda trasfusione, provocheranno una reazione trasfusionale emolitica acuta; DEA 1 è il gruppo con più alto potere

immunogeno ma il fenomeno della sensibilizzazione e della reazione trasfusionale si verifica anche per gli altri gruppi sanguigni, ad eccezione del gruppo DEA 4, che ha una prevalenza elevatissima (98-100%). È stata descritta soltanto una reazione trasfusionale emolitica dovuta ad anticorpi anti-DEA 4¹⁵.

Un altro problema della sensibilizzazione è il fenomeno dell'isoeritrolisi neonatale. Una femmina DEA 1 negativa precedentemente sensibilizzata (ad esempio con una trasfusione con sangue DEA 1 positivo), produrrà anticorpi contro l'antigene DEA 1; nel caso di accoppiamento con un maschio DEA 1 positivo, i cuccioli saranno sia DEA 1 positivi che DEA 1 negativi; durante l'assunzione del colostro, i cuccioli assumeranno anche gli anticorpi materni contro il loro stesso gruppo sanguigno (se DEA 1 positivi), avendo una reazione emolitica, con ittero, emoglobinuria e morte.

La Tabella 2 riassume, per ogni gruppo sanguigno, la presenza di anticorpi naturali e le principali reazioni trasfusionali che si possono presentare in animali negativi per quel gruppo (precedentemente sensibilizzati con l'antigene), trasfusi con sangue contenente l'antigene eritrocitario.

GRUPPO SANGUIGNO	ANTICORPI NATURALI	REAZIONI TRASFUSIONALI (IN ANIMALI PRECEDENTEMENTE SENSIBILIZZATI CON L'ANTIGENE)
DEA 1	Non segnalati	Rimozione dei globuli rossi trasfusi entro 12-24 ore
DEA 3	Segnalati	Perdita dei globuli rossi trasfusi entro 5 giorni (un caso)
DEA 4	Non segnalati	C'è produzione di anticorpi ma non si verifica emolisi. È stata riportata una reazione emolitica dopo ripetute trasfusioni di sangue DEA 4 positivo in cane DEA 4 negativo
DEA 5	Segnalati	Sequestro dei globuli rossi e perdita entro 3 giorni (un caso)
DEA 6	Non documentati	Rapida rimozione dei globuli rossi trasfusi (un caso)
DEA 7	Segnalati	Sequestro e perdita dei globuli rossi entro 72 ore

Tabella 2 – Gruppo sanguigno, presenza di anticorpi naturali e principali reazioni trasfusionali (Carli, 2013)

Il gruppo DEA 7 dà reazioni di agglutinazione a 4°C, quindi teoricamente non dà reazioni a temperatura corporea.

4.4 Determinazione del gruppo sanguigno

La caratterizzazione del gruppo sanguigno si ottiene tramite l'uso di antisieri specifici², anticorpi noti che reagiscono con gli antigeni eritrocitari.

Nel cane, di routine, si determina solamente se è DEA 1 positivo o DEA 1 negativo, perché è il gruppo con più alto potere immunogeno e perché sono disponibili kit commerciali.

Per la determinazione del gruppo sanguigno si sfruttano reazioni di agglutinazione o reazioni di immunomigrazione.

- **Agglutinazione rapida su cartina** (RapidVet H® DEA 1.1 Cane, Agrolabo s.p.a.): il test prevede l'uso di una cartina con tre pozzetti, su due dei quali è adsorbito un anticorpo monoclonale liofilizzato; si basa sul rilievo dell'agglutinazione, presente quando globuli rossi contenenti l'antigene eritrocitario DEA 1 interagiscono con gli specifici anticorpi monoclonali specifico per DEA 1.1, del test. Per questo test, si utilizza sangue intero in EDTA (anticoagulante). Dopo aver disposto la soluzione diluente in tutti e tre i pozzetti, si pongono 50 microlitri di sangue del paziente nel pozzetto "autoagglutination saline screen" (il pozzetto non contenente l'anticorpo monoclonale liofilizzato) per verificare che non ci sia autoagglutinazione, prima di procedere. La

soluzione diluente è necessaria per risospendere gli anticorpi adsorbiti presenti nei due pozzetti. Il pozzetto “positive control” è utilizzato come riferimento di positività (agglutinazione). Bisogna aspirare 1 goccia (50 microlitri) di sangue del paziente da testare e metterlo nel pozzetto “patient test” e una goccia nel pozzetto “positive control”; oscillare delicatamente per miscelare i due componenti per circa due minuti, e leggere immediatamente il risultato. La lettura del risultato è visiva e si basa sul rilievo di agglutinazione nel pozzetto “patient test”, mettendolo a confronto con il campione positivo; se è avvenuta agglutinazione, il paziente è DEA 1 positivo¹⁶ (“Diagnostici per cani -RapidVet H DEA 1.1 Cane -Istruzioni per l’uso”). Questo test è rapido e di facile lettura; l’interpretazione, però, è visiva e, quindi, soggettiva; inoltre, in soggetti anemici, sono possibili falsi negativi. I risultati del test sono da leggere entro due minuti e non sono conservabili.

- **QuickVet®** è un analizzatore, dotato di software che valuta l’agglutinazione; la cartina contiene l’anticorpo monoclonale contro DEA 1.1 e un sistema di 3 canali capillari, uno dei quali contenente l’anticorpo monoclonale per DEA 1.1.

- **Eritrosedimentazione su colonna di gel:** sfrutta il principio dell’agglutinazione; è una tecnica molto valida ma non è più in commercio in Italia il kit (ID-Gel Test Canine DEA 1.1 Dia-Med-Vet). Si utilizza l’anticorpo monoclonale anti-DEA 1.1, che viene sospeso in una matrice di gel e posto in provette di plastica, con supporto in plastica detto “ID-Cards” (“schedina”). Per ogni campione (si utilizza una sospensione di globuli rossi al 5% in bromelina) ci sono due provette: quella denominata “DEA 1.1” che contiene l’anticorpo monoclonale, e quella denominata “ctl”, che contiene solo la matrice gelatinosa e funge da controllo negativo. Dopo centrifugazione della schedina (nell’ apposita centrifuga), si procede alla lettura dei risultati. Il test è attendibile se il controllo negativo dà un risultato negativo. I globuli rossi che non presentano l’ antigene sedimentano sul fondo del microtubo. I globuli rossi positivi per il gruppo sanguigno testato si legano al corrispondente anticorpo, dando la reazione di agglutinazione e vengono trattenuti dal gel, formando una banda rossa o disperdendosi in esso. È inoltre possibile quantificare la positività dando un punteggio da 1+ a 4+, avendo un risultato semiquantitativo che può essere conservato nel tempo.

Il metodo dell’agglutinazione su gel può essere utilizzato anche con reagenti policlonali, come dimostra uno studio del 2010 che compara l’agglutinazione su tubo con reagenti policlonali (per testare DEA 1.1, DEA 1.2, 3, 4, 7), il kit per l’agglutinazione su gel standard con reagenti monoclonali, e la tecnica con colonne multiple di gel (extended gel) con reagente policlonale.¹⁸

- **Test immunocromatografico** (Quick Test DEA 1®, Alvedia), che sfrutta il principio di immunocromatografia. Il risultato di positività sarà visibile come presenza di una stria rossa.

- **Citofluorimetria:** mettendo a paragone l’agglutinazione su gel, l’agglutinazione su cartina, e il test immunocromatografico su cartina come metodi di tipizzazione del gruppo sanguigno, il metodo di agglutinazione su gel è preferibile, in quanto ha un’accuratezza del 100%; l’agglutinazione su cartina e il test immunocromatografico su cartina hanno un’accuratezza del 89-91% e del 93%, rispettivamente. Nonostante ciò, vi possono essere errori nella tipizzazione di campioni derivanti da animali con patologie, in particolar modo in cani con anemia emolitica immunomediata, per la presenza di agglutinazione persistente; in questo caso, l’unico metodo efficace è il test immunocromatografico su cartina.¹⁹.

Comparando l'immunocromatografia con cartina con il test di agglutinazione su gel per la tipizzazione del gruppo DEA 1.1 in cani sani e in cani con anemia emolitica immunomediata, c'è una buona concordanza (98,8%) tra i due metodi, quando entrambi possono essere utilizzati; in caso di anemia emolitica immunomediata non è possibile usare il test su colonna di gel, per la persistente agglutinazione. In un caso (un cane con anemia emolitica immunomediata) i risultati dei due test erano contrastanti ²⁰.

4.5 Prove di cross-match

Oltre alla tipizzazione del gruppo sanguigno, è importante eseguire le prove di cross-match o prove crociate di compatibilità.

Le prove di cross-match sono indispensabili quando: è sconosciuta l'anamnesi trasfusionale del ricevente o quando è un soggetto che ha ricevuto già una o più trasfusioni. Nel gatto sono molto importanti per la presenza di anticorpi naturali ²¹.

La prova di compatibilità crociata rivela la presenza di anticorpi anti-eritrociti (anticorpi naturali o indotti da una precedente trasfusione) in grado di causare agglutinazione o emolisi ², ma non valuta le possibili reazioni da leucociti, proteine o piastrine ²¹.

La prova crociata maior rivela la presenza di anticorpi nel ricevente contro gli eritrociti del donatore ²²; si effettua mescolando il siero (o il plasma) del ricevente con gli eritrociti del donatore. Se la prova è positiva, bisognerebbe evitare la trasfusione ^{22 16}.

La prova crociata minor rivela la presenza di anticorpi nel donatore contro gli eritrociti del ricevente ²²; si effettua mescolando il siero/plasma del donatore con i globuli rossi del ricevente. Se la prova minor è positiva, la trasfusione è possibile se non si trasfonde il plasma del donatore ^{22 16}.

È possibile l'utilizzo del plasma o del siero. Nel cane il siero è da preferire perché la presenza di fibrinogeno e altre proteine nel plasma aumenta la formazione d'impilamento; nel gatto l'impilamento del siero e del plasma è equivalente ²².

Il test di compatibilità crociata può essere eseguito con diversi metodi, tra i quali:

-su vetrino (si valuta l'agglutinazione);

-in provetta;

-su cartina (Lab-test XM, Alvedia), che sfrutta l'immunocromatografia, con l'impiego di un reagente antiglobulinico specifico.

Le prove di compatibilità crociata rapide svelano gli anticorpi anti-eritrociti presenti in titolo così elevato da causare una reazione emolitica da moderata a grave. Sono eseguite a temperatura ambiente e possono essere effettuate in qualsiasi struttura veterinaria. ²²

Le prove crociate complete vengono eseguite a 37°C, a temperatura ambiente (25°C) e a 4°C e includono l'impiego di un reagente antiglobulinico (test di coombs indiretto); sono necessarie per svelare anticorpi anti-DEA 1 presenti a basso titolo e anticorpi anti-DEA 3, 5 e 7 e vengono eseguite, di solito, in laboratori di riferimento ²².

5 DONAZIONE DI SANGUE

5.1 Donatori di sangue

I donatori di sangue possono essere donatori abituali o occasionali e possono essere reclutati in vari modi dalla struttura veterinaria trasfusionale o dalla banca veterinaria del sangue.

La “Linea guida relativa all’esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario” disciplina le caratteristiche che deve possedere un donatore di sangue per essere considerato “idoneo”; la donazione di sangue non deve provocare, nel donatore, stress, sofferenze o danni duraturi. Occorre, inoltre, valutare le condizioni generali di salute dell’animale mediante anamnesi e visita clinica completa, con particolare attenzione agli stati di debilitazione, iponutrizione, edemi, anemia, ittero, cianosi, dispnea e lesioni cutanee ¹.

Il proprietario dell’animale, o il detentore dello stesso, che ne abbia facoltà giuridica deve sottoscrivere un modulo in cui dichiara lo stato di salute dell’animale per accettarne l’idoneità alla donazione ¹; tale modulo è presente nell’allegato 7 della Linea guida.

L’allegato 1 della Linea guida definisce i criteri di idoneità alla donazione di sangue.

Il donatore deve soddisfare i seguenti requisiti:

PESO CORPOREO	>25 Kg
ETA'	2-8 ANNI
VACCINAZIONI	CIMURRO, LEPTOSPIROSI, EPATITE, PARVOVIROSI, RABBIA
CARATTERE	DOCILE
QUANTITA' DA PRELEVARE	15-20% del volume ematico corporeo ogni 3 mesi non superando i 18 ml/kg
PROFILASSI	Filariosi cardio-polmonare
IDENTIFICAZIONE	Anagrafe di specie con microchip registrato su una banca dati

Tabella 3 – Principali requisiti del cane donatore. Tabella tratta da “Linea guida relativa all’esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario”.

Inoltre, nell’allegato 2 della Linea guida, sono indicati gli esami di laboratorio da eseguire ad ogni donazione di sangue; il pannello degli esami richiesti è differente in relazione all’utilizzo della sacca di sangue.

In entrambi i casi, è obbligatorio conservare, alla temperatura di -8°/-10°C, un’aliquota di 1ml di siero/plasma ed un’aliquota di sangue intero in EDTA per ciascuna unità di sangue prodotta, al fine di ripetere le analisi in caso di sospetta trasmissione di malattie infettive al soggetto ricevente ¹.

-Nel caso di sangue intero di pronto impiego o d’emergenza (preparato all’interno della struttura veterinaria e utilizzato all’interno della stessa, non cedibile ad altre strutture), il pannello degli esami da eseguire (per il cane) sono i seguenti ¹:

GRUPPO SANGUIGNO	DEA 1.1 (da eseguire solo alla prima donazione)
EMOCROMO	n° RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW, (morfologia RBC), n° WBC, formula leucocitaria, morfologia WBC, n° PLT, morfologia PLT, proteine plasmatiche totali ricerca microscopica per <i>Babesia spp.</i> nel buffy coat (in alternativa o unitamente all’indagine IFAT o PCR per <i>Babesia canis</i>)
SIEROLOGICO	<i>Leishmania infantum</i> , <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Babesia canis</i> , <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Dirofilaria immitis</i>

Tabella 4 – Esami richiesti per il cane donatore in caso di sangue intero di pronto impiego o d’emergenza. Tabella tratta da “Linea guida relativa all’esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario”.

-Nel caso di sangue intero reperibile in commercio, gli esami da eseguire nel cane sono i seguenti:

GRUPPO SANGUIGNO	DEA 1.1 (da eseguire solo alla prima donazione)
EMOCROMO	n° RBC, Hgb, Hct, MCV, MCH, MCHC, RDW, (morfologia RBC) n° WBC, formula leucocitaria, morfologia WBC n° PLT, morfologia PLT proteine plasmatiche totali ricerca microscopica per <i>emoparassiti</i> nel buffy coat (in alternativa o unitamente all'indagine IFAT o PCR per <i>Babesia canis</i>)
BIOCHIMICO	Proteine plasmatiche totali, albumina, urea, creatinina, ALT, ALP
PROFILO COAGULATIVO	PT, aPTT, Fibrinogeno
SIEROLOGICO	<i>Leishmania infantum, Ehrlichia canis, Babesia canis, Anaplasma phagocytophilum, Dirofilaria immitis</i>
URINE	Esame chimico, fisico e del sedimento
MALATTIE PARASSITARIE	Esame coprologico, ricerca microfilaria nel sangue periferico

Tabella 5 – Esami richiesti per il cane donatore in caso di sangue intero reperibile in commercio. Tabella tratta da “Linea guida relativa all’esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario”

Il pannello degli esami standard può essere ampliato in relazione alla situazione epidemiologica. Gli esami di laboratorio vanno eseguiti unitamente ad una visita clinica completa per accertare lo stato di salute del donatore ¹.

Nel caso di sangue intero reperibile in commercio, è possibile (ma non obbligatorio) testare il cane donatore anche per *Borrelia burgdorferi* (anche tramite test rapido di tipo ambulatoriale, come alternativa ai test IFAT o PCR) e per *Brucella canis* (tramite immunodiffusione in gel di agar) ¹.

Tutte le informazioni sullo stato di salute dell’animale, compresi i risultati degli esami di laboratorio, devono essere riportate nella cartella clinica dell’animale, che deve essere conservata fin quando lo stesso viene impiegato come donatore. Le indagini sierologiche volte a identificare gli agenti infettivi trasmissibili per via ematica possono essere sostituite o affiancate da indagini di biologia molecolare (PCR: Polymeras Chain Reaction) ¹.

Per quanto riguarda la ricerca di *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Dirofilaria immitis* è possibile impiegare test rapidi di tipo ambulatoriale, in alternativa all’indagine IFAT (immunofluorescenza indiretta) o PCR ¹.

L’esame per la ricerca di *Dirofilaria immitis* può non essere eseguito se l’animale è sotto regolare trattamento profilattico (dichiarato dal proprietario/detentore dell’animale in autocertificazione) ¹.

Per quanto riguarda il gruppo sanguigno, il donatore ideale dovrebbe essere DEA 1 negativo, DEA 7 negativo e DEA 4 positivo (la quasi totalità della popolazione canina è DEA 4 positiva); nella pratica, si testa solamente la presenza dell’antigene DEA 1, per il suo alto potere immunogeno.

I cani utilizzati come donatori devono essere DEA 1 negativi; tuttavia, un cane DEA 1 positivo può donare ad un ricevente DEA 1 positivo.

L’emotrasfusione è una pratica non esente da rischi e, per questo motivo, è importante la selezione e l’esecuzione di test di screening nei cani donatori.

Nel cane le malattie potenzialmente trasmissibili con la trasfusione sono: leishmaniosi, ehrlichiosi, babesiosi, anaplasmosi, rickettsiosi, borreliosi (o malattia di Lyme), dirofilariosi e bartonellosi; sono tutte malattie trasmesse da vettori (o CVBDs: canine vector-borne diseases). Un’altra malattia potenzialmente trasmissibile con la trasfusione è la brucellosi, che non è una malattia trasmessa da vettori.

Tra queste, la trasmissione della bartonellosi, della borreliosi e della brucellosi via trasfusione non è documentata. La rickettsiosi non è tra le malattie incluse negli esami di screening dei donatori perché l'infezione si presenta sempre nella forma acuta e nei cani sani non è possibile un'infezione subclinica.²³.

Per quanto riguarda la dirofilariosi è una malattia causata da *Dirofilaria immitis* trasmessa da vettore; è possibile, tramite la trasfusione, la trasmissione di microfilarie, che, tuttavia, non sono sufficienti a causare la malattia nel ricevente²³, in quanto è necessario che il parassita completi il suo ciclo biologico nel vettore. Tuttavia è importante una corretta profilassi a garanzia della salute del donatore.

Un consensus statement dell'ACVIM (American College of Veterinary Internal Medicine) definisce i test raccomandati per i cani donatori per i patogeni trasmessi da vettori e per quelli non trasmessi da vettori, e le interpretazioni delle analisi in relazione alla possibilità di trasmissione della malattia via emotrasfusione (Tabella 6).

AGENTE	STANDARD MINIMO	CONSIDERAZIONI
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	PCR negativa	In aree endemiche per <i>Ixodes</i> è difficile che i soggetti siano sieronegativi. Quindi soggetti sieropositivi ma con PCR negativa possono essere utilizzati come donatori
<i>Babesia spp.</i>	PCR negativa	Soprattutto i cani a rischio (i Greyhound e i cani potenzialmente a contatto con <i>Rhipicephalus</i>) dovrebbero essere anche sierologicamente negativi
<i>Ehrlichia canis</i>	PCR negativa e sierologicamente negativi	I cani sieropositivi sono esclusi dalla donazione in quanto la PCR non è in grado di svelare la presenza di infezione, se questa è cronica.

Tabella 6 – test di screening dei cani donatori per *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia spp.*, *Ehrlichia canis* e requisiti minimi dei cani idonei secondo l'ACVIM. Tabella tratta da (K.J. Wardrop et al., 2016).

La Leishmaniosi è una malattia causata dal protozoo *Leishmania infantum*, trasmesso dalla puntura di flebotomo; è stata documentata la trasmissione per via trasfusionale.

La “Linea guida relativa all’esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario” definisce, inoltre, i criteri di esclusione permanente o temporanea dell’animale donatore ai fini della protezione della sua salute o di quella del ricevente¹.

5.2 Criteri di esclusione permanente e temporanea dalla donazione

1. Animale affetto o precedentemente affetto da: malattie autoimmuni o immunomediate, malattie cardiovascolari, malattie del sistema nervoso centrale e periferico, neoplasie maligne, crisi convulsive, tendenza anomala all'emorragia, endocrinopatie, epilessia, glomerulonefrite cronica e pielonefrite, policitemia vera → **ESCLUSIONE PERMANENTE**¹;
2. Per *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis*, *Babesia canis* → animale con titoli anticorpali >1:80 e/o indagini PCR positive e/o presenza di sintomatologia clinica → **ESCLUSIONE PERMANENTE** (G.U. n.25,2016);
3. Se l'animale è affetto o è stato affetto in modo grave/ cronico da malattia gastrointestinale, renale, ematologica o respiratoria → il medico veterinario può avvalersi di una visita specialistica prima di esprimere l'**eventuale idoneità temporanea o permanente**¹;
4. Anaplasmosi, borreliosi, brucellosi → **ESCLUSIONE TEMPORANEA** fino a guarigione clinica in presenza di titoli sierologici negativi e PCR negativa¹;
5. Gravidanza in atto → **ESCLUSIONE TEMPORANEA** (G.U.n.25,2016);

6. Altri motivi (ai fini della protezione della salute del donatore) → **ESCLUSIONE TEMPORANEA** (la durata del periodo di rinvio è stabilita dal medico veterinario) ¹;
7. Trasfusione di sangue o trattamento con farmaci emoderivati, allergia ai farmaci → **ESCLUSIONE TEMPORANEA (rinvio di 6 mesi)** (G.U.n.25,2016);
8. Somministrazione di sieri di origine animale → **ESCLUSIONE TEMPORANEA (rinvio di 3 mesi)** (G.U.n.25,2016);
9. Somministrazione di vaccini costituiti da virus o batteri vivi attenuati → **ESCLUSIONE TEMPORANEA (rinvio di 3 settimane)** ¹;
10. Somministrazione di vaccini costituiti da virus o batteri uccisi o inattivati o da tossoidi; assunzione di farmaci → **ESCLUSIONE TEMPORANEA (rinvio per 48 ore)** ¹;
11. Altri motivi (ai fini della protezione della salute del ricevente) → **ESCLUSIONE TEMPORANEA** (la durata del periodo di rinvio è stabilita dal medico veterinario) ¹;

5.3 Prelievo di sangue intero

Il prelievo deve essere effettuato in una banca veterinaria del sangue o in una struttura veterinaria trasfusionale, che, come specificato nella Linea Guida, devono essere in possesso delle seguenti attrezzature:

- pinza multifunzione e anellini di alluminio o pinza saldatrice;
- emofrigoteca a temperatura costante di 4-6°C con registratore di temperatura;
- agitatore meccanico per la raccolta del sangue intero;
- bilancia ¹.

Il prelievo di sangue ai fini della donazione viene effettuato su animali idonei alla donazione, a digiuno da circa 8-12 ore (in quanto la lipemia interferisce con la conservazione del sangue), previa visita clinica ed esami di laboratorio obbligatori ad ogni donazione.

Prima del prelievo, è necessario ispezionare le sacche per accertarsi dell'assenza di difetti, della scadenza, e della quantità di anticoagulante, in relazione al sangue prelevato ¹.

Il prelievo può essere eseguito dall'animale in stazione o in decubito laterale o sternale.

In genere, viene utilizzata la vena giugulare, con previa tricotomia e disinfezione della parte; in alternativa, può essere usata anche la vena cefalica.

Il volume di sangue massimo che può essere donato in tutta sicurezza è pari al 15-20% del volume ematico stimato utilizzando la seguente formula:

Volume ematico stimato (L)= 0,08-0,09 x peso corporeo (in kg)

Il volume massimo per la donazione è 16-18 ml/kg. ².

La raccolta deve avvenire per gravità e devono essere impiegate sacche autorizzate dal Ministero della Sanità. ¹.

La sacca deve essere tenuta costantemente in agitazione, manualmente o tramite l'utilizzo di bilance basculanti (che contemporaneamente pesano la sacca, fino al raggiungimento del peso desiderato), in maniera tale da miscelare il sangue e l'anticoagulante ed evitare la formazione di coaguli.

Le sacche per il prelievo disponibili in commercio possono essere da 250ml, da 350ml o da 450 ml. La scelta della sacca da utilizzare dipende dal peso del cane e dal prodotto trasfusionale che si vuole ottenere ².

Le sacche sono in un tipo di plastica morbida PVC (polivinilcloruro addizionato con uno stabilizzante plastico) che permette lo scambio gassoso (rilascio di anidride carbonica e incremento dell'ossigenazione). Questo materiale riduce i traumi meccanici e minimizza l'attivazione dei fattori di coagulazione e delle piastrine ¹⁶.

Le sacche da prelievo sono costituite da un ago da 16 G, un deflussore e una sacca di materiale plastico, contenente la soluzione anticoagulante-conservante ².

Per la raccolta di sangue per la preparazione di emocomponenti, esistono particolari sacche, in cui sono presenti anche una o più "sacche satelliti", collegate alla "sacca madre" tramite tubi deflussori ². Questo sistema viene definito "chiuso", in quanto non è presente contatto tra il sangue e l'ambiente esterno, minimizzando il rischio di contaminazioni ².

La soluzione all'interno della sacca contiene una soluzione anticoagulante-conservante costituita, generalmente, da citrato (anticoagulante), destrosio, fosfato e adenina. Il destrosio preserva il metabolismo glicolitico degli eritrociti ².

La soluzione anticoagulante presente nelle sacche da raccolta più usata è il CPDA1, costituito da acido citrico, citrato di sodio, fosfato, destrosio, adenina; altre soluzioni spesso usate sono il CPD (acido citrico, citrato e destrosio), CPD2 e ACD (acido citrico, citrato, destrosio) ^{2 24}.

-ACD: si utilizza nel rapporto 15ml/100ml di sangue. La conservazione del sangue intero (ad una temperatura di 4-10°C) è di 3 settimane ¹⁶.

-CPD: rispetto all'ACD, mantiene più elevato il PH e la concentrazione di 2,3-DPG. La conservazione del sangue intero (ad una temperatura di 4-10°C) è di 4 settimane ¹⁶.

-CPDA-1: è l'anticoagulante presente nelle sacche da prelievo singole e doppie. L'adenina fornisce agli eritrociti il substrato per sintetizzare ATP e ne migliora la conservabilità. La conservazione è di circa 4 settimane ¹⁶.

Il rapporto anticoagulante: sangue nella sacca deve essere di 1:7 (con variazione di riempimento di +/-il 10%).

Esistono, inoltre, sacche contenenti, oltre la soluzione anticoagulante-conservante anche delle sostanze nutritive additive (come, per esempio, SAG-mannitolo o Adsol [®]) nella sacca satellite destinata agli eritrociti, che prolungano la sopravvivenza degli stessi ^{2 16}.

Una volta terminata la raccolta di sangue, il sangue rimasto nel deflussore viene convogliato verso la sacca, e il deflussore viene sigillato in più punti mediante anellini sigillanti in alluminio, nodi o saldature a caldo ².

Dopo il prelievo, è necessario controllare le sacche, per accertarsi dell'assenza di difetti ¹.

Il sangue può, dunque, essere utilizzato tal quale o può essere scomposto nelle sue componenti ².

6 SANGUE INTERO ED EMOCOMPONENTI

6.1 PREPARAZIONE, CONSERVAZIONE ED ETICHETTATURA DEL SANGUE INTERO

6.1.1 Preparazione e conservazione del sangue intero

Il sangue intero è conservato in frigoemoteca ad una temperatura di 4°C (+/-2°C) per un periodo di tempo adeguato al tipo di anticoagulante-conservante impiegato, definito sulla base della sopravvivenza post-trasfusionale delle emazie uguale o superiore al 75% a 24 ore ¹.

Questi frigoriferi assicurano una temperatura uniforme al loro interno e sono dotati di registratore di temperatura ¹.

La data di scadenza del sangue è indicata in etichetta; l'impiego del sangue è consentito entro 35 giorni dal prelievo ¹.

Quando nella struttura dove si conserva il sangue, non è presente una frigoemoteca con registratore di temperatura, la conservabilità del sangue è ridotta al 50% ¹⁶.

Durante lo stoccaggio del sangue, avvengono modificazioni nella sacca di sangue, più documentate in medicina umana piuttosto che in medicina veterinaria. Una delle modificazioni più precoci è l'abbassamento del pH che esita in accumulo di acido lattico e piruvico e in una riduzione fino al 54% dei livelli di 2,3 DPG (2,3 difosfoglicerato) entro le prime 24 ore. La riduzione di 2,3 DPG esita in una maggiore affinità dell'emoglobina per l'ossigeno, con conseguente minor rilascio dello stesso a livello tissutale e, quindi, una riduzione dell'efficacia della trasfusione in caso di anemia ²⁴.

Nel sangue conservato, diminuiscono anche i livelli di ATP, che ha il compito di preservare la membrana eritrocitaria; con il decrescere dei livelli di ATP, diminuisce di conseguenza la deformabilità degli eritrociti ²⁴.

Il sangue intero si distingue in:

- **sangue intero fresco:** sangue prelevato da 6-8 ore ¹. Mantiene inalterate le componenti eritrocitaria, leucocitaria, piastrinica e dei fattori della coagulazione ¹⁶;

- **sangue intero conservato:** sangue conservato oltre 6-8 ore dal prelievo ¹. La componente eritrocitaria rimane inalterata, ma c'è una ridotta funzionalità delle componenti leucocitaria e piastrinica; inoltre, c'è un decadimento dei fattori della coagulazione e dopo 24 ore sono presenti solamente i fattori stabili (II,VII,IX,X). La sacca va posta in posizione orizzontale con la parte con l'etichetta posta in alto, e la parte priva di etichetta sopra un piano grigliato, in maniera tale da consentire gli scambi gassosi. La sacca va agitata e il suo contenuto va miscelato almeno tre volte a settimana, per risospingere gli eritrociti nel plasma e per migliorare l'ossigenazione ¹⁶. La sacca deve essere somministrata al ricevente, con il previo riscaldamento a 37°C a bagnomaria o a temperatura ambiente ¹⁶.

- **sangue intero in pre-deposito per autotrasfusioni:** un'unità di sangue intero prelevata al paziente cui è destinata per corrispondere a proprie esigenze terapeutiche ¹.

Il preparato è per uso autologo quindi non è soggetto agli obblighi per l'accertamento di idoneità del donatore di sangue. Le modalità di conservazione, di trasporto e la scadenza sono analoghe a quelle del sangue intero ¹⁶.

- **sangue leucodepleto:** si ottiene facendo passare il sangue della sacca attraverso un filtro integrale, verso una sacca accessoria; consente di eliminare il 99,9% dei leucociti e le piastrine ²⁵ ²⁴. Lo scopo della leucoriduzione è di ridurre il rischio di reazioni post-trasfusionali ²⁵; i leucociti, infatti, sono metabolicamente attivi e producono citochine che, durante lo stoccaggio, si accumulano a livello extracellulare ²⁴. È stato inoltre dimostrato che molte alterazioni dovute allo stoccaggio diminuiscono in prodotti leucoridotti: l'aggregazione eritrocitaria e alle cellule endoteliali è diminuita, così come l'emolisi; la quantità di 2,3DPG risulta, invece, più alta ²⁴. Inoltre, durante lo stoccaggio, i leucociti possono degenerare rilasciando sostanze vasoattive come istamina, il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF), mieloperossidasi e l'inibitore

dell'attivatore del plasminogeno; questi composti possono contribuire alle lesioni delle emazie durante lo stoccaggio ed alle reazioni post-trasfusionali ²⁴.

Il sangue intero dev'essere trasportato in contenitori termoisolanti, dotati di sistemi di controllo della temperatura interna. I contenitori per il trasporto di unità di sangue devono essere pre-raffreddati a 4°C. Il sangue è trasportato ad una temperatura compresa tra 1°C a 10°C.¹

É consentita la somministrazione di sangue intero solo a riceventi della stessa specie degli animali donatori, con il previo accertamento della compatibilità tra i suddetti ¹.

Presso le strutture veterinarie trasfusionali, è adottato, per ciascuna unità di sangue, un sistema di riconoscimento dell'animale ricevente, cui la stessa è stata assegnata ¹.

6.1.2 Etichettatura del sangue intero

Su ciascuna sacca di sangue intero è apposta un'etichetta che riporta:

- nome ed indirizzo della struttura di prelievo;
- numero identificativo della donazione;
- tipo di preparato (con le diciture: "sangue intero fresco" o "sangue intero conservato");
- peso lordo del preparato;
- data di prelievo e preparazione;
- data di scadenza del prodotto;
- composizione e volume della soluzione anticoagulante-conservante e delle eventuali soluzioni aggiunte;
- gruppo sanguigno dell'animale donatore;
- modalità e temperatura di conservazione;
- indicazione della specie animale;

Nei sottoelencati prodotti trasfusionali sono inoltre incluse le seguenti diciture:

1. Nel "sangue intero fresco" e nel "sangue intero conservato":

- "esclusivamente per uso veterinario-specie di destinazione"*;
- "non utilizzabile a scopo trasfusionale se presenta emolisi o altre anomalie evidenti"*;
- "per la trasfusione utilizzare un adatto dispositivo munito di appropriato filtro"*;

2. Nel sangue intero da predeposito per autotrasfusioni → l'etichetta, di colore diverso dalle omologhe, deve indicare: -la dicitura "AUTODONAZIONE-STRETTAMENTE RISERVATA A":

- generalità del tutore dell'animale;
- firma del medico responsabile del salasso;
- tipo di preparato;
- "non utilizzabile a scopo trasfusionale se presenta emolisi o altre anomalie evidenti"*;
- "per la trasfusione utilizzare un adatto dispositivo munito di appropriato filtro"*;

-“Esclusivamente per uso autologo-prove di compatibilità ed esami pre-trasfusionali NON ESEGUITI”¹.

6.2 Preparazione, conservazione ed etichettatura degli emocomponenti

6.2.1 Preparazione e conservazione degli emocomponenti

Il sangue intero può essere separato nei suoi componenti mediante centrifugazione o, alternativamente, i singoli componenti possono essere raccolti mediante aferesi²⁶.

Gli emocomponenti sono i costituenti terapeutici del sangue, che possono essere preparati usando solo mezzi fisici, per la loro separazione¹⁶.

Gli emocomponenti sono attualmente regolamentati dal D. Lgs n.193/2006 (testo unico sui medicinali veterinari), così come gli emoderivati; la Linea Guida, infatti, si applica soltanto al sangue intero. Per questo motivo, attualmente in Italia, per la preparazione degli emocomponenti sono necessarie specifiche autorizzazioni.

La separazione standard di sangue intero in concentrato di eritrociti e plasma è ottenuta mediante centrifugazione della sacca a 5000 G per 5 minuti²⁶ oppure a 3000G per 20 minuti¹⁶, utilizzando apposite centrifughe refrigerate (temperatura di circa 4°C).

Per la separazione dei due componenti, si trasferisce la sacca centrifugata in un estrattore di plasma, che comprime delicatamente la sacca, permettendo al plasma di defluire nella sacca satellite²⁶; la parte cellulare residua nella sacca madre, dopo estrazione di circa l'80% del plasma, è il concentrato di eritrociti¹⁶. L'anticoagulante rimane nella frazione plasmatica²⁵.

Se il **concentrato di eritrociti (PRBC= packed red blood cells)** viene conservato in CPDA1 senza alcuna soluzione additiva, durante l'estrazione del plasma si deve aver cura a lasciare almeno 50 ml di plasma nel concentrato di eritrociti (circa 2 cm di interfaccia plasmatica/ buffy coat)²⁶; se, invece il concentrato eritrocitario viene conservato in CPD o CPD2, con l'aggiunta di soluzioni additive, il plasma può essere totalmente rimosso, in quanto la soluzione additiva è sufficiente per la richiesta eritrocitaria di fluidi e nutrienti²⁶.

Al concentrato di eritrociti, dopo rimozione del plasma, si può aggiungere una soluzione additiva, come Adsol®, Nutricel®, Optisol®, AS-1™, AS-3™, AS-5™. Le soluzioni additive prolungano la vita degli eritrociti e la loro conservabilità, fino a 40 giorni, in quanto incrementano il metabolismo attraverso una maggiore concentrazione di destrosio e adenina¹⁶.

La sacca contenente il concentrato di eritrociti va conservata ad una temperatura di 1-6°C in posizione orizzontale, con la parte con l'etichetta rivolta verso l'alto, e la parte senza etichetta posta su un ripiano a griglia, in modo da permettere gli scambi gassosi¹⁶.

La sacca va agitata almeno tre volte la settimana per risospendere gli eritrociti nel plasma residuo e migliorare ossigenazione e conservabilità¹⁶.

Il concentrato di eritrociti senza soluzioni additive può essere utilizzato fino a 25 giorni dal prelievo¹⁶. La sacca deve essere somministrata al ricevente, con il previo riscaldamento a 37°C a bagnomaria o a temperatura ambiente¹⁶.

Un'ulteriore processo che si può attuare è la **leucoriduzione**: come già descritto per il sangue intero, il concentrato di eritrociti leucodepleto si ottiene facendo passare il sangue della sacca attraverso un filtro integrale, verso una sacca accessoria, eliminando, in tal modo, il 99,9% dei

leucociti e le piastrine (Hohenhaus, 2014)²⁴. Lo scopo della leucoriduzione è di ridurre il rischio di reazioni post-trasfusionali, soprattutto se effettuata pre-stoccaggio. Inoltre si è visto che in cani sani trasfusi con concentrati di eritrociti non sottoposti a leucoriduzione, si registrava un aumento significativo dei valori di neutrofili segmentati, fibrinogeno e proteina C reattiva, rispetto a cani trasfusi con concentrati di eritrociti sottoposti a leucoriduzione pre-stoccaggio, nei quali non c'era l'aumento di questi parametri infiammatori²⁴.

Il **crio-eritro-concentrato** è ottenuto mediante congelamento rapido del concentrato eritrocitario (con azoto liquido ad una temperatura di -196°C, con idoneo crioprotettore). Viene conservato a -80°C per dieci anni¹⁶.

Il plasma ottenuto mediante centrifugazione del sangue intero può essere utilizzato immediatamente come **plasma fresco**, contenente albumina, globulina e la massima quantità dei fattori della coagulazione o può essere congelato, come più comunemente avviene²⁶.

Il **plasma fresco congelato (FFP= fresh frozen plasma)** è il plasma preparato entro 6 ore dal prelievo e immediatamente congelato a -20°C. Esso può essere conservato per circa un anno e mantiene inalterati tutti i fattori della coagulazione, anche se nel tempo si osserva un progressivo decadimento dell'attività dei fattori labili della coagulazione¹⁶.

Per l'impiego nel ricevente, dev'essere preventivamente scongelato a bagnomaria a 37°C e utilizzato nel più breve tempo possibile, non oltre le 24 ore se conservato a 2-4°C¹⁶

Il **plasma congelato (FP= frozen plasma)** è il plasma preparato dopo 6 ore dal prelievo, o il plasma fresco congelato conservato per più di un anno, o il plasma fresco congelato non utilizzato entro 8 ore dallo scongelamento¹⁶. Presenta un'attività residua di alcuni fattori della coagulazione (ad esempio il fattore IX) ma viene principalmente usato come fonte di albumina. Si conserva come il plasma fresco congelato. Il tempo di conservazione è di circa 5 anni¹⁶.

Recenti studi hanno messo in evidenza che tempi lunghi (maggiori di 8 ore) tra il prelievo di sangue e la preparazione di plasma (entro 24 ore dal prelievo) non influisce negativamente sui livelli finali di fattori della coagulazione e proteine emostatiche nel plasma congelato²⁷; inoltre, è stato valutato, tramite tromboelastografia, il plasma congelato conservato per più di 5 anni, che (nonostante presenti una diminuita attività dei fattori VIII e X) è risultato emostaticamente attivo²⁸. Sulla base di questi recenti studi, si possono sovrapporre le caratteristiche di FFP e di FP. Dal plasma congelato si possono ottenere due ulteriori prodotti: il crioprecipitato ed il criosurnatante (o plasma privo del crioprecipitato).

Se c'è la preventiva intenzione di ottenere questi due prodotti, durante la separazione del plasma dopo centrifugazione del sangue intero, si può trasferire il plasma in una sacca satellite, collegata, mediante tubo, ad un'altra sacca vuota; si ostruisce temporaneamente il tubo connettore e si congelano le due sacche nello stesso box²⁶.

Per ottenere il **crioprecipitato** il plasma fresco congelato viene sottoposto ad un lungo scongelamento in circa 24 ore alla temperatura di 1-6°C; quando il 90% del plasma diviene liquido, viene sottoposto a centrifugazione a 1000G per 15 minuti¹⁶ o 5000 g per 7 minuti²⁶, e trasferimento del surnatante in una sacca satellite. Il crioprecipitato così ottenuto contiene elevate quantità di Fattore VIII, di fattore di von Willebrand, di fibrinogeno, di fattore XIII e di fibronectina. Viene immediatamente ricongelato a -20°C e si conserva circa un anno¹⁶.

Il **plasma privo del crioprecipitato o criosurnatante** è il surnatante ottenuto dalla preparazione del crioprecipitato; contiene tutti i fattori della coagulazione, esclusi quelli sopracitati e viene utilizzato principalmente come fonte di albumina. Si conserva a -20°C per 5 anni ¹⁶.

Il **plasma ricco di piastrine** viene preparato mediante centrifugazione del sangue intero fresco, con forza centrifuga ridotta rispetto a quella utilizzata per separare il plasma dal concentrato di eritrociti; in questo modo, si concentrano le piastrine nel plasma, che viene trasferito in una sacca satellite, asportandolo fino a che l'interfaccia plasma-eritrociti si riduce a 1 cm ²². Generalmente viene centrifugato a 1000 G per 4-6 minuti oppure a 2000-2500 g per 2,5-3 minuti ²².

Il **concentrato di piastrine** viene preparato per aferesi o per centrifugazione del plasma ricco di piastrine, che comporta la sedimentazione di quasi tutte le piastrine ²².

Le **piastrine crioconservate** sono prelevate mediante aferesi e congelate con dimetilsolfossido (DMSO), un crioprotettore ²⁵.

6.2.2 Etichettatura emocomponenti

Su ciascun prodotto trasfusionale deve essere indicato, tramite apposita etichetta:

1. Nome ed indirizzo della struttura di prelievo o di preparazione del prodotto trasfusionale;
2. Numero identificativo della donazione;
3. Tipo di preparato, indicato come:
 - a. concentrato di eritrociti;
 - b. crio-eritro-concentrato;
 - c. plasma congelato;
 - d. crioprecipitato;
 - e. plasma privo del crioprecipitato;
 - f. concentrato di piastrine o plasma ricco di piastrine);
4. Peso netto del preparato;
5. Data di prelievo e preparazione;
6. Data di scadenza del prodotto (tenendo conto della disponibilità di frigoemoteca o di congelatore con registratore di temperatura);
7. Composizione e volume della soluzione anticoagulante-conservante e delle eventuali soluzioni aggiunte;
8. Gruppo sanguigno dell'animale donatore;
9. Modalità e temperatura di conservazione;
10. Indicazione della specie animale;

Inoltre, per il crio-eritro-concentrato → la data di congelamento e di scadenza;

Nei sottoelencati prodotti trasfusionali sono inoltre incluse le seguenti diciture:

1. In concentrato di eritrociti, plasma fresco congelato, plasma congelato, concentrato piastrinico o plasma ricco in piastrine, crioprecipitato e criosurnatante:
 - a. *“non utilizzabile a scopo trasfusionale se presenta emolisi o altre anomalie evidenti”*
 - b. *“per la trasfusione utilizzare un adatto dispositivo munito di un appropriato filtro”*
2. Inoltre, per il crio-eritro-concentrato → *“dopo scongelamento, eventuale lavaggio o risospensione, trasfondere quanto prima e comunque entro ventiquattro ore se conservato a 4°C (+o-) 2°C”*
3. Per gli emocomponenti da predeposito per autotrasfusione → come per il sangue intero da predeposito per autotrasfusione, l’etichetta, di colore diverso dalle omologhe, deve indicare:
 - a. la dicitura *“AUTODONAZIONE-STRETTAMENTE RISERVATA A:”*;
 - b. generalità del tutore dell’animale;
 - c. firma del medico responsabile del salasso;
 - d. tipo di preparato;
 - e. *“non utilizzabile a scopo trasfusionale se presenta emolisi o altre anomalie evidenti”*;
 - f. *“per la trasfusione utilizzare un adatto dispositivo munito di appropriato filtro”*;
 - g. *“Esclusivamente per uso autologo-prove di compatibilità ed esami pre-trasfusionali NON ESEGUITI”*¹⁶.

6.3 Trasporto del sangue e degli emocomponenti

Il sangue intero e gli emocomponenti devono essere trasportati in contenitori termoisolanti, dotati di sistemi di controllo della temperatura interna; i contenitori per il trasporto di unità di sangue devono essere pre-raffreddati a 4°C. Il sangue intero fresco o conservato e gli emocomponenti allo stato liquido devono essere trasportati ad una temperatura compresa tra 1°C e 10°C; per gli emocomponenti congelati, il trasporto deve avvenire ad una temperatura quanto più vicino possibile a quella di conservazione¹⁶.

7 TRASFUSIONE

7.1 Trasfusione

La trasfusione è una pratica terapeutica volta a: reintegrare i costituenti ematici, ripristinare l’apporto di ossigeno ai tessuti e ripristinare la volemia.

La trasfusione viene somministrata all'animale ricevente, con il previo consenso informato al proprietario o tutore dello stesso, che viene informato che tale procedura non è esente da rischio¹⁶.

La trasfusione deve avvenire nell'ambito della stessa specie animale e rispettando la compatibilità immunoematologica.

Prima della trasfusione di qualsiasi prodotto, viene accertata la compatibilità tra donatore e ricevente, attraverso le prove pre-trasfusionali: la determinazione del gruppo sanguigno e le prove di compatibilità crociata¹⁶.

Nella pratica clinica, si determina se l'animale è DEA 1 positivo o negativo; questo test si effettua sia nell'animale donatore che nell'animale ricevente. Di solito, si utilizzano sacche di sangue provenienti da animali donatori DEA 1 negativi (donatori "universali").

Le prove di compatibilità crociata dovrebbero essere eseguite, insieme alla determinazione del gruppo sanguigno, prima di ogni trasfusione, ma sono particolarmente importanti in caso di: soggetti politrasfusi, soggetti con anamnesi trasfusionale sconosciuta o con reazioni avverse alle precedenti trasfusioni, femmine gravide o pluripare.

In ogni struttura in cui si pratica la trasfusione, per ciascuna sacca di sangue o emocomponente, deve essere adottato un sistema di riconoscimento dell'animale ricevente al quale è stata somministrata la stessa; la rintracciabilità della sacca e della cartella clinica dell'animale donatore è importante, in caso di reazione avversa alla trasfusione¹⁶.

La trasfusione con emocomponenti costituisce un'innovazione, in quanto permette una terapia trasfusionale specifica per ogni disordine, evitando sprechi e diminuendo il rischio di reazioni avverse alla trasfusione²⁵.

7.2 Scelta del prodotto trasfusionale

Per scegliere il prodotto trasfusionale adatto, si deve conoscere lo scopo della trasfusione; in linea generale i prodotti eritrocitari (comprendenti sangue intero e concentrato di eritrociti) sono utilizzati per l'anemia e i prodotti plasmatici per correggere disordini della coagulazione²⁵.

L'unica indicazione per una trasfusione con i **prodotti eritrocitari** è un'anemia²⁵.

I segni clinici dell'anemia che portano a considerare una terapia trasfusionale con prodotti eritrocitari sono: tachicardia, debolezza, tachipnea e collasso, che, tuttavia, sono sintomi aspecifici²⁵.

Quando diminuisce la capacità del sangue di ossigenazione tissutale, la trasfusione diventa necessaria²⁹.

Non è stato stabilito un valore soglia dell'ematocrito sotto il quale la trasfusione è necessaria.

In linea generale, si può dire che con valori di ematocrito inferiori al 20%, gli animali possono essere considerati candidati alla trasfusione, e la decisione viene presa valutando gli aspetti clinici e la velocità di insorgenza dell'anemia; se l'ematocrito è uguale o inferiore al 12%, sicuramente avranno necessità della trasfusione³⁰. In caso di ipovolemia acuta/iperacuta si può considerare la necessità di trasfusione anche con valori di ematocrito superiori al 20%.

Nella decisione se procedere o meno alla trasfusione, si deve tener conto anche della capacità compensatoria dell'organismo al deficit eritrocitario²⁵. Quando l'emoglobina è inferiore a 3 g/dl o

l'ematocrito è inferiore al 12%, i principali sistemi organici hanno raggiunto il limite di compensazione del deficit eritrocitario, e la trasfusione diventa una necessità urgente²⁵.

Di solito, gli animali tollerano una perdita di più del 20% del volume ematico circolante (come dimostrano i donatori)²⁹.

La necessità della trasfusione dipende dal grado e dal tipo di anemia, dalla sua velocità d'insorgenza e dal suo decorso²⁹.

I meccanismi di compensazione dell'anemia si instaurano entro diversi giorni²⁵. Animali con anemia a insorgenza rapida e progressiva (come l'anemia secondaria ad emorragia traumatica) richiedono una trasfusione quando l'ematocrito è all'incirca 20-25% ; animali con anemia cronica o ad insorgenza lenta richiedono una trasfusione a valori di ematocrito minori, per i meccanismi compensatori che si sono instaurati^{29 25}.

Va notato che animali che hanno subito una perdita di sangue iperacuta non mostreranno un calo dell'ematocrito se non diverse ore dopo l'emorragia, quando si avrà una redistribuzione dei fluidi verso il compartimento vascolare o dopo una fluidoterapia²⁹; per questo motivo dopo un'emorragia acuta con perdita di più del 20% del volume totale di sangue, oltre all'iniziale terapia antishock, è necessaria la trasfusione²⁹.

Gli animali con pneumopatie o cardiopatie avranno necessità di trasfusione a livelli di ematocrito più alti rispetto ad animali sani, perché la compromissione del sistema respiratorio riduce l'ossigenazione dell'emoglobina²⁵; allo stesso modo, una cardiopatia può limitare la risposta compensatoria del cuore (l'aumento della gittata cardiaca) all'anemia²⁵.

Gli animali che verranno sottoposti ad anestesia e a chirurgia, dovranno avere livelli di ematocrito superiori al 20%, per garantire un'adeguata ossigenazione tissutale durante l'anestesia²⁹.

Oltre l'ematocrito, altri parametri vengono considerati per stabilire la necessità di una trasfusione, come colore delle mucose, tempo di riempimento capillare, frequenza cardiaca, pressione sanguigna, e, possibilmente, i livelli ematici di lattato²⁹.

Il **sangue intero** fresco conservato da meno di 8 ore contiene tutti i componenti del sangue, ed è utilizzato quando vi è una deficienza eritrocitaria e di componenti del plasma, con necessità di piastrine²⁹.

La principale differenza tra sangue fresco e sangue conservato è nelle proprietà emostatiche; infatti, il tempo di circolazione post-trasfusionale delle piastrine declina già dopo 6-8 ore di refrigerazione¹⁶. Per questo motivo, si utilizza il sangue fresco, refrigerato da meno di 24 ore quando non vi è una necessità di piastrine²⁹.

Nel **sangue intero conservato**, oltre alla diminuzione dell'emivita post-trasfusionale delle piastrine, assistiamo ad un declino dell'attività dei fattori labili della coagulazione (tra i quali il fattore V, il fattore VIII ed il fattore di von Willebrand), a causa della loro degradazione proteolitica¹⁶. Si ricorda che il fattore V è potenzialmente utile nel trattamento della coagulazione vasale disseminata, il fattore VIII è indispensabile nel trattamento dell'emofilia A ed il fattore di von Willebrand è importante per la terapia della malattia di von Willebrand¹⁶. Il fattore VIII canino è più stabile del corrispettivo umano; infatti dopo 24 ore di refrigerazione mantiene l'85% della sua attività¹⁶.

Per la scarsa attività emostatica, l'uso del **sangue intero conservato** è limitato ai casi di contemporanea anemia e ipoproteinemia²⁹.

In linea generale, la principale indicazione per una trasfusione di sangue intero è un'emorragia acuta, durante la quale si instaura un'anemia ipovolemica e occorre reintegrare la componente eritrocitaria, i colloidi plasmatici e ripristinare la volemia¹⁶; tuttavia, la somministrazione di concentrati di eritrociti e di soluzioni cristalloidi o colloidi ha lo stesso effetto²⁵ ed evita sprechi di plasma. Come regola, è indicata la trasfusione se l'ematocrito è inferiore al 20% e la proteinemia totale è inferiore a 25g/dl. Se l'emorragia è dovuta a disordini dell'emostasi, si preferisce l'utilizzo di sangue intero fresco¹⁶, anche se anche in questo caso l'utilizzo di altri emocomponenti può avere lo stesso effetto.

L'uso più appropriato per il sangue intero è la trasfusione pediatrica, nella quale sono necessari solamente 10-20 ml di sangue intero o nelle trasfusioni di sostituzione, nelle quali il sangue del paziente è allontanato e sostituito²⁵. In tutti gli altri casi, la trasfusione con emocomponenti è da preferire, perché più animali possono beneficiare di un'unità di sangue donato, e perché in questo modo si riducono le reazioni avverse alla trasfusione²⁵.

Il sangue intero non andrebbe utilizzato nell'anemia normovolemica, in quanto c'è un alto rischio di sovraccarico circolatorio di fluidi²⁵.

Il volume iniziale di sangue intero da trasfondere è di circa 10-20 ml/kg²⁵; di solito il volume massimo consentito da trasfondere è 22ml/kg/giorno, anche se vari autori utilizzano volumi superiori senza gravi conseguenze².

Il volume di sangue intero da trasfondere è basato sul calcolo delle perdite ematiche e può essere ricavato tramite la seguente formula:

VOLUME DI SANGUE DA TRASFONDERE (ml) = peso del ricevente (kg) x 85 x [(PCV desiderato-PCV del ricevente)/PCV del sangue da trasfondere]¹⁶

In questa formula 85 rappresenta gli ml/kg di volume ematico medio nel cane¹⁶.

Il PCV (packed cell volume o ematocrito) desiderato dipende dalla causa sottostante; nei pazienti ipovolemici, di solito il PCV desiderato è circa 25-30%; nei pazienti con anemia immuno-mediata il valore è più basso (circa 20-25%), in modo tale da ottenere la stabilizzazione del sistema cardiocircolatorio, senza portare alla soppressione della produzione eritrocitaria da parte del midollo².

Un metodo più rapido per calcolare il volume da somministrare consiste nel tenere conto che 2ml/kg di sangue intero trasfuso aumentano di circa 1% l'ematocrito del ricevente¹⁶.

Il **concentrato di eritrociti (PRBC)** è costituito da emazie (l'ematocrito è di circa l'80%) e da una piccola quantità di plasma rimasta dopo centrifugazione e allontanamento dello stesso²⁵.

Il suo utilizzo è indicato in caso di anemia ed è preferito rispetto all'utilizzo di sangue intero, in quanto il rischio di sovraccarico circolatorio è ridotto, soprattutto in caso di anemia normovolemica ed in pazienti con elevato rischio di sovraccarico volemico^{16 25}.

Anche in caso di anemia da emorragia acuta, è possibile l'utilizzo di concentrato di eritrociti per correggere l'anemia, in concomitanza ad una fluidoterapia, volta a ristabilire la volemia e la perfusione tissutale²⁹.

Per quanto riguarda pazienti con anemia emolitica immuno-mediata (IMHA), la trasfusione di emazie può essere una pratica salva vita; non c'è, infatti, evidenza che la trasfusione di eritrociti eterologhi aumenti la distruzione degli eritrociti del paziente; in particolare in questa patologia, sono da preferire concentrati eritrocitari conservati da meno di 7 giorni²⁹. Alcuni autori ritengono

che gli animali con IMHA che necessitano una trasfusione, oltre che dall'utilizzo di prodotti eritrocitari freschi, possano trarre beneficio da una preventiva immunosoppressione, per limitare l'emolisi e per aumentare la vita degli eritrociti trasfusi.

Per calcolare il volume da somministrare, si utilizza la formula precedentemente riportata per il sangue intero; si considera che 2ml/kg di concentrato di eritrociti trasfuso aumenta di circa il 2% l'ematocrito del ricevente¹⁶.

La dose iniziale per il concentrato di eritrociti è 6-10ml/kg²⁵.

VOLUME DI PRBC DA TRASFONDERE (ml)= peso del ricevente (kg) x 85-90 x[(PCV desiderato-PCV del ricevente)/PCV del PRBC da trasfondere]³¹

I prodotti eritrocitari possono essere sottoposti a leucoriduzione, sia al momento del prelievo di sangue dal donatore (pre-stoccaggio) sia immediatamente prima della trasfusione²⁵.

La leucoriduzione è un processo addizionale che consente di eliminare il 99,9% dei leucociti e le piastrine e si ottiene facendo passare il sangue della sacca attraverso un filtro integrale^{25 24}; i filtri non intaccano la vitalità, l'ematocrito o le caratteristiche biochimiche delle emazie²⁵. Il principale scopo dell'eliminazione dei leucociti è quello di ridurre le reazioni trasfusionali, soprattutto la febbre non emolitica, le infezioni trasmissibile e l'immunosoppressione²⁵; i leucociti, infatti sono metabolicamente attivi e producono citochine²⁴. La principale reazione trasfusionale è la reazione emolitica acuta²⁵.

La dose iniziale per i **concentrati eritrocitari privi di leucociti** è di 15ml/kg²⁵.

La trasfusione con le **componenti plasmatiche** è indicata principalmente nei disordini dell'emostasi. Le componenti plasmatiche possono essere anche fonte di proteine plasmatiche, quali l'albumina (necessaria per il mantenimento della pressione oncotica del sangue) e le immunoglobuline. In caso di patologie proteino-disperdenti, come nefropatie o enteropatie nelle quali c'è una perdita ingente di albumina, la trasfusione con componenti plasmatiche risulta poco efficace, in quanto è necessaria una elevata quantità di plasma per innalzare il livello di albumina plasmatica; in questi casi si può ricorrere ai plasma expander²⁹.

Inoltre, se l'ipoalbuminemia è dovuta a vasculite, si avrà uno spostamento dell'albumina trasfusa verso l'interstizio; per questo motivo, la trasfusione di plasma è indicata solo quando la ridotta pressione oncotica può essere un pericolo per la vita, come nel caso di gravi versamenti pleurici o edema polmonare¹⁶.

Anche in questo caso, sarebbe opportuno, per ogni patologia, scegliere il componente più adatto, in funzione delle caratteristiche dello stesso³².

Le alterazioni dell'emostasi possono essere ereditarie o acquisite.

Tra le **alterazioni ereditarie dell'emostasi (riguardanti i fattori della coagulazione)**:

-Emofilia A: è una patologia causata da un deficit o da un difetto funzionale del fattore VIII, una glicoproteina associata al fattore di von Willebrand, facente parte del sistema intrinseco della coagulazione¹⁶. È una patologia segnalata in molte razze di cani e l'eredità è recessiva e legata al sesso; è, quindi più frequente riscontrare i segni clinici nei maschi^{16 32}.

L'emofilia A si può presentare in tre forme cliniche: lieve, moderata e grave. I sintomi variano in base alla gravità della malattia; quelli più frequenti comprendono ematomi sottocutanei o intramuscolari e zoppia, dovuta ad emorragia articolare¹⁶.

-Malattia di von Willebrand: è causata da un deficit parziale o totale del fattore di von Willebrand (FvW), una glicoproteina strettamente correlato al fattore VIII; il FvW svolge la sua azione sia nell'emostasi primaria (mediando l'adesione delle piastrine all'endotelio e la loro aggregazione), sia in quella secondaria¹⁶. Si distinguono tre tipi di forme cliniche della malattia: tipo 1 (deficit quantitativo del FvW), tipo 2 (alterazione qualitativa) e tipo 3 (assenza del FvW); queste ultime due sono più gravi^{16 32}. Questa patologia presenta un'ampia variabilità di quadri clinici¹⁶.

-Ipofibrinogenemia o disfibrinogenemia: causata da deficit o disfunzione del fibrinogeno (fattore I); l'ipofibrinogenemia è stata segnalata nel cane San Bernardo¹⁶.

-Emofilia B: causata da carenza del fattore IX (fattore di Christmas), attivo nel sistema intrinseco della coagulazione. L'eredità è recessiva e legata al sesso; i sintomi clinici sono analoghi all'Emofilia A¹⁶.

-Ipoprotrombinemia: causata dal deficit di protrombina (fattore II). Nei cuccioli si ha diatesi emorragica ed epistassi; negli adulti è in forma clinica più lieve¹⁶.

-Ipoproconvertinemia: deficit di proconvertina (fattore VII).

-Deficit del fattore X

-Deficit del fattore XI

-Deficit del fattore XII

Tra le **alterazioni acquisite dell'emostasi:**

-Deficienza di vitamina K o antagonisti della vitamina K: la vitamina K è essenziale per la sintesi dei fattori II, VII, IX, X (detti anche vitamina K-dipendenti). Le cause più comuni di deficit di vitamina K sono il mancato assorbimento intestinale e l'assunzione di rodenticidi¹⁶.

-Malattie epatiche: il fegato sintetizza molti fattori della coagulazione e inibitori (fattori I, II, V, VII, IX, X, XI)¹⁶.

-Coagulazione intravasale disseminata (CID): è un disturbo caratterizzato da trombosi e da conseguente coagulopatia da consumo. Un ruolo importante viene svolto dall'antitrombina III (AT III); se questa diminuisce, infatti, aumenta la trombosi nei pazienti con CID¹⁶.

-Massiva perdita di sangue, trattata con grossi volumi di fluidi³².

Tra i disordini non emorragici che possono trarre beneficio dalla trasfusione di prodotti plasmatici, ricordiamo l'**ipoproteinemia**, che può essere causata da vasculiti, insufficienza epatica, malattie proteino-disperdenti e peritoniti; come già detto, sono necessari grossi volumi di prodotti plasmatici per innalzare il livello di albumina nel sangue³².

Ogni **componente plasmatica** ha determinate caratteristiche :

-Plasma fresco congelato (FFP): è il plasma ottenuto entro 6 ore dal prelievo e congelato a -20°C; i fattori della coagulazione mantengono inalterata la loro attività per circa 1 anno²⁵. È fonte di tutti i fattori della coagulazione, oltre che di albumina e immunoglobuline.

-Plasma congelato (FP): presenta livelli ridotti di attività dei fattori labili della coagulazione, ma recenti studi hanno dimostrato che la sua attività emostatica è mantenuta e ritenuta terapeuticamente efficace²⁸.

Per questi motivi, le indicazioni terapeutiche per il plasma fresco congelato e per il plasma congelato sono sovrapponibili; si parlerà, quindi, di plasma congelato.

È fonte di tutti i fattori della coagulazione, oltre che di albumina e immunoglobuline; può, quindi, essere usato come valida alternativa (ma non come prima scelta) in tutte le coagulopatie²⁵. È

utilizzato nei cuccioli e nei gattini in caso di mancato trasferimento dell'immunità passiva^{25 32}. Nei pazienti con CID, l'uso di FFP è ristretto a quelli con segni di emorragia causata da deplezione severa di fibrinogeno e altri fattori³²; inoltre, recenti studi hanno dimostrato che la trasfusione di plasma non incrementa i livelli di antitrombina³³. Il plasma congelato può essere utile anche in caso di insufficienza epatica, ma il sovraccarico di volume circolatorio ne limita i benefici³². Il plasma non è indicato in caso di ipoalbuminemia perché la sua concentrazione di albumina è inferiore ad altre soluzioni di albumina disponibili e l'effetto del plasma sulla pressione colloidale osmotica è inferiore a quello dei colloidi sintetici (come destrani, idrossietil-amido ecc.)³³.

Per gli avvelenamenti da rodenticidi, il plasma non è il trattamento di elezione, in quanto la somministrazione di vitamina K ripristina in breve i tempi di coagulazione.

La trasfusione di plasma risulta inefficace anche nel trattamento dell'infezione da Parvovirus canino³⁴.

L'utilizzo del plasma congelato è altresì sconsigliato in caso di pancreatite; l'aumento di $\alpha 2$ macroglobulina (che si verifica nell'uomo sottoposto a trasfusioni di plasma) e la sua correlazione con la gravità della patologia non sono state dimostrate; inoltre, in pazienti trasfusi con plasma, la mortalità è più elevata rispetto ai soggetti non trasfusi^{35 33}. Il dosaggio iniziale di plasma congelato è di 6-10 ml/kg 1-3 volte al giorno. Il dosaggio dipende dalla condizione da trattare.

-Crioprecipitato: contiene elevate concentrazioni di fattore di von Willebrand, di fattore VIII e di fibrinogeno²⁵; contiene anche il fattore XIII, la fibronectina e l' $\alpha 2$ macroglobulina¹⁶. Il crioprecipitato è il prodotto di elezione per trattare la malattia di von Willebrand, l'emofilia A e l'ipofibrinogenemia^{25 32}; il principale vantaggio nell'uso del crioprecipitato rispetto all'uso di FP o di sangue fresco intero è la possibilità di fare ripetute trasfusioni, senza il rischio di sovraccarico circolatorio¹⁶.

La dose iniziale di crioprecipitato è di una unità/ 10 kg di peso corporeo; un'unità è la quantità prodotta a partire da una unità di plasma fresco congelato²⁵. La dose può essere ripetuta ogni 4-12 ore, secondo necessità¹⁶. Durante la produzione di crioprecipitato, circa il 50% del fattore VIII e del fattore di von Willebrand, presenti nel plasma congelato di partenza, viene crioprecipitata; tuttavia, a parità di quantità dei fattori, l'attività di questi ultimi nel ricevente sarà maggiore dopo trasfusione di crioprecipitato, rispetto alla trasfusione di plasma congelato¹⁶.

Data l'indisponibilità di crioprecipitato per molti veterinari, in caso di emofilia A o malattia di von Willebrand, la trasfusione di plasma congelato (da ripetere ogni 12 ore) o di sangue intero (da ripetere ogni 24 ore) può essere una valida alternativa; l'utilizzo di sangue intero può inoltre essere utile per compensare la perdita eritrocitaria dovuta alla diatesi emorragica¹⁶.

Per il trattamento della malattia di von Willebrand, è utile trattare il donatore con una soluzione di desmopressina (DDAVP) per via intranasale, prima della donazione; questa procedura incrementa i livelli del vWF nel donatore, e quindi nella sacca di sangue¹⁶.

-Criosurnatante: contiene i fattori della coagulazione vitamina K dipendenti (II, VII, IX, X), l'albumina, l'ATIII; può, quindi, essere utile nel trattamento degli avvelenamenti da antagonisti della vitamina K (come gli anticoagulanti cumarinici, usati come rodenticidi), della deficienza di vitamina K, dell'emofilia B e dell'ipoalbuminemia¹⁶. Come il plasma congelato, il criosurnatante può essere utilizzato per reintegrare immunoglobuline nei neonati, in caso di mancato trasferimento dell'immunità passiva³².

Il criosurnatante può inoltre essere utile nel trattamento dell'ipoalbuminemia da sindrome nefrosica, per il concomitante rischio di trombosi dovuto al ridotto livello di AT III e all'aumento dei valori di fibrinogeno e fattore VIII ¹⁶.

In caso di coagulazione intravasale disseminata, l'utilizzo di criosurnatante può essere preferito all'utilizzo di plasma fresco congelato, in quanto il fibrinogeno presente in quest'ultimo può aumentare il rischio di trombosi e di produzione dei prodotti di degradazione di fibrina e fibrinogeno ¹⁶.

La dose iniziale è di 1 unità / 10 kg di peso corporeo ²⁵.

-Plasma ricco di piastrine e concentrato di piastrine: per la modalità di preparazione (tramite centrifugazione lenta) contiene più piastrine rispetto al plasma; si deve trasfondere entro poche ore dal prelievo e non deve essere refrigerato in quanto si inattiverebbe la funzione piastrinica ²⁵. Sono utilizzati nel trattamento delle emorragie dovute a trombocitopenia o a trombocitopenia ¹⁶.

La trasfusione di piastrine è più indicata nelle trombocitopenie da diminuita produzione piastrinica (es. leucemia, anemia aplastica) ^{16 25}, piuttosto che in quelle da aumentato consumo (coagulazione intravasale disseminata), da sequestro (splenomegalia) o da aumentata distruzione (es. trombocitopenia immunomediata) ¹⁶. Nei casi di aumentata distruzione piastrinica (causa più frequente di trombocitopenia nel cane), la trasfusione di piastrine eterologhe è poco indicata, nonché quasi inutile, per l'emivita post-trasfusionale brevissima delle stesse ^{25 29}.

Il dosaggio è di 1 unità / 10 kg di peso corporeo ²⁵.

Una unità media contiene circa 60 miliardi di piastrine; se non è presente un'accelerata distruzione piastrinica, un consumo o un sequestro, dopo un'ora dalla trasfusione la conta piastrinica del ricevente dovrebbe incrementare di circa 35 miliardi/l e il conteggio dovrebbe diminuire del 33% ogni giorno ¹⁶.

Per mantenere il livello piastrinico al di sopra di 10-15 miliardi/l possono essere necessarie trasfusioni ripetute ¹⁶.

Se non sono disponibili i prodotti piastrinici, si può ricorrere alla trasfusione di sangue intero fresco o di plasma congelato, contenente microparticelle piastriniche funzionali ¹⁶. Si ricorda che la trasfusione ripetuta di sangue intero per alcuni giorni può causare policitemia, così come la trasfusione ripetuta di prodotti plasmatici può causare iperproteinemia; entrambe queste condizioni esitano in un pericoloso aumento della viscosità ematica nel paziente ¹⁶. Le trasfusioni multiple di piastrine possono risultare in alloimmunizzazione e trombocitopenia refrattaria ²⁵.

-Piastrine crioconservate: sono ottenute mediante aferesi e conservate con dimetilsolfossido (DMSO); vengono utilizzate in caso di trombocitopenia immunomediata, ma non ci sono dati sufficienti circa la loro efficacia ²⁵. Data la presenza di DMSO, vanno infuse lentamente o potrebbe manifestarsi bradicardia ²⁵.

Nella seguente tabella (Tabella 7) vengono indicati i principali disordini che richiedono una trasfusione, e gli emocomponenti suggeriti per la terapia degli stessi:

PATOLOGIA	EMOCOMPONENTE OTTIMALE	EMOCOMPONENTE ALTERNATIVO
Anemia ipovolemica	PRBC e soluzioni di cristalloidi o colloidi	Sangue intero
Anemia normovolemica	PRBC	
Malattia di von Willebrand	Crioprecipitato	Plasma fresco congelato/ sangue intero fresco
Emofilia A (deficit del fattore VIII)	Crioprecipitato	Plasma fresco congelato/ sangue intero fresco
Ipo-/dis-fibrinogenemia	Crioprecipitato	
Avvelenamento da rodenticidi	Criosurnatante	Plasma fresco congelato
Emofilia B (deficit del fattore IX)	Criosurnatante	Plasma fresco congelato
Coagulazione intravasale disseminata	Criosurnatante	Plasma fresco congelato
Mancato trasferimento dell'immunità passiva	Plasma fresco congelato/criosurnatante/plasma congelato	
Trombocitopenia da ridotta produzione	Plasma ricco di piastrine	Sangue intero fresco/ plasma fresco congelato

Tabella 7 -Tabella tratta da “Trasfusioni ematiche, terapia con emocomponenti e soluzioni di trasportatori d’ossigeno” (Hohenhaus, 2014).

La Tabella 8 indica, in maniera riassuntiva, per ogni prodotto trasfusionale: il contenuto, il dosaggio iniziale, gli usi per i quali sono raccomandati e le principali reazioni avverse:

PRODOTTO EMATICO	CONTENUTO	DOSAGGIO	INDICAZIONI TERAPEUTICHE
Sangue intero	Emazie, plasma, anticoagulante	10-20 ml/kg	Trasfusioni pediatriche; trasfusioni di sostituzione; Anemia ipovolemica; se c'è necessità di piastrine utilizzare il sangue intero fresco (conservato da <8h)
Concentrato di eritrociti (PRBC)	Emazie	6-10 ml/kg	Anemia
Plasma fresco congelato (FFP)	Plasma e anticoagulante; tutti i fattori della coagulazione, albumina, immunoglobuline	6-10 ml/kg	Tutte le coagulopatie(come alternativa); mancato trasferimento dell'immunità passiva
Plasma congelato (FP)	Plasma e anticoagulante; albumina, immunoglobuline, bassi livelli di fattori della coagulazione	6-10 ml/kg	Mancato trasferimento dell'immunità passiva
Crioprecipitato	FVIII, FvW, fibrinogeno,FXI II, fibronectina, α_2 macroglobulina	1 unità/ 10kg peso corporeo	Malattia di von Willebrand; Emofilia A; ipofibrinogenemia
Criosurnatante	FII, FIV, FIX, FX, ATIII, albumina	1 unità/ 10kg peso corporeo	Avvelenamento da rodenticidi; Emofilia B; ipoalbuminemia; CID; Mancato trasferimento dell'immunità passiva
Plasma ricco di piastrine		1 unità/ 10kg peso corporeo	Trombocitopenia da ridotta produzione

Tabella 8 – Tabella tratta da “Trasfusioni ematiche, terapia con emocomponenti e soluzioni di trasportatori d'ossigeno”(Hohenhaus, 2014).

7.3 Somministrazione della trasfusione e monitoraggio

I prodotti refrigerati possono essere gradualmente portati a temperatura ambiente prima della trasfusione; è sconsigliato l'eccessivo riscaldamento perché causa diminuzione della vitalità dei globuli rossi e aumento della crescita microbica^{16 22}. I prodotti ematici vanno lasciati a riposo a temperatura ambiente per circa 30-60 minuti prima della trasfusione^{16 22}.

Soprattutto per i pazienti a rischio ipotermia o in caso di trasfusioni di elevate quantità di fluidi, i prodotti refrigerati vanno portati a temperatura ambiente o a temperatura corporea prima della trasfusione, per evitare l'ipotermia anche perché la rapida infusione di fluidi freddi può causare aritmie¹⁶.

I prodotti ematici possono essere riscaldati mettendo il deflussore a bagnomaria a circa 37°C (mai a temperature superiori a 37°C perché c'è il rischio di lisi delle cellule ematiche e di denaturazione delle proteine plasmatiche)^{16 2}. Si può anche immergere tutta la sacca a bagnomaria, ricordando che la sacca è in materiale plastico poroso e quindi va sigillata in una sacca in plastica. È sconsigliato l'uso del forno a microonde (che causa emolisi) anche per il plasma congelato¹⁶.

I prodotti plasmatici congelati devono essere scongelati a bagnomaria a 37°C in circa mezz'ora; la sacca deve essere, possibilmente, lasciata all'interno della scatola durante questa operazione, per evitare contaminazioni¹⁶. È sconsigliato lo scongelamento in frigorifero, per la formazione di crioprecipitati¹⁶.

Prima della trasfusione, il sangue intero va agitato dolcemente (capovolgendolo per almeno 60 volte)¹⁶.

Il concentrato di eritrociti (avente ematocrito di circa 80%) è molto viscoso e, per aumentarne la fluidità, si può miscelare con soluzione fisiologica (NaCl 0,9%)^{2 25}; la soluzione fisiologica è l'unica soluzione che si può miscelare a tutti i prodotti ematici²⁵.

Per la diluizione dei prodotti trasfusionali, non sono consigliati altri fluidi, in quanto possono essere soluzioni ipotoniche o ipertoniche² o contenere calcio (come il Ringer lattato), che può innescare la coagulazione e causare microagglutinazione^{16 2}; il destrosio, per esempio, porta ad aggregazione dei globuli rossi, rigonfiamento e lisi². È da evitare anche il mescolamento di suddetti fluidi nello stesso deflussore utilizzato per la trasfusione².

La via di somministrazione da preferire per la trasfusione è quella endovenosa²; può essere utilizzata qualsiasi vena¹⁶. È preferibile utilizzare un catetere di grosse dimensioni per evitare occlusioni e favorire il flusso sanguigno²; di solito si utilizza un'agocannula di 16-19 G per la vena giugulare o da 18-20 G per una vena periferica; è preferibile utilizzare un'agocannula di calibro più grosso per trasfondere i concentrati eritrocitari¹⁶. In caso non sia possibile l'accesso venoso (come nei pazienti in shock cardiocircolatorio), la migliore via alternativa è quella intraossea (endomidollare) con un ago da 18-20 G o con un'agocannula da biopsia midollare^{16 2}. La trasfusione intraossea può essere effettuata nella cresta iliaca, nel tubercolo maggiore dell'omero e, nei neonati (con un ago da 22 G), nella cresta tibiale; la trasfusione sarà rapidamente immessa (in circa 5 minuti) nel torrente circolatorio^{16 2}. Un'altra via di somministrazione alternativa è la via intraperitoneale ma richiede più tempo per passare al torrente circolatorio (24-72 ore) e l'emivita dei globuli rossi è inferiore^{2 16}.

Per la trasfusione, si utilizzano si utilizzano deflussori appositi, dotati di particolari filtri, che evitano la somministrazione di coaguli che si possono essere formati². La trasfusione, in genere, è somministrata per gravità ma possono essere utilizzate anche le pompe ad infusione, sebbene molti autori ne sconsiglino l'uso per il rischio di lisi dei globuli rossi, soprattutto se non vengono impiegate le pompe specifiche per emotrasfusione^{2 16}.

La velocità d'infusione iniziale dovrebbe essere di circa 0,25 ml/kg/h per i primi 15-30 minuti ed il paziente dovrebbe essere monitorato frequentemente per il rilievo precoce di reazioni trasfusionali; in caso di emergenza, questa fase può essere evitata^{2 16}. In seguito, la velocità può essere aumentata (soprattutto in caso di paziente ipovolemico) fino ad un massimo di 22ml/kg/h (velocità massima, di solito usata in urgenza)^{2 16}. Il paziente dovrà essere monitorato attentamente, con l'ausilio dell'elettrocardiogramma per rivelare aritmie cardiache, soprattutto in

caso di trasfusioni ad elevate velocità e con elevate quantità ¹⁶ ². La velocità di trasfusione dovrebbe essere rallentata se c'è rischio di sovraccarico circolatorio ¹⁶. Nel caso in cui si verificano tremori o contrazioni muscolari, soprattutto se sono stati trasfusi rapidamente elevate quantità di sangue, può esserci ipocalcemia; in questo caso, bisogna misurare il calcio sierico e somministrare calcio gluconato (utilizzando una via venosa alternativa), monitorando la frequenza cardiaca ².

Prima della trasfusione, dovrebbero essere monitorati i valori iniziali di temperatura, frequenza respiratoria, frequenza cardiaca, colore delle mucose e tempo di riempimento capillare; questi valori andrebbero controllati inizialmente ogni 15 minuti, e poi ogni 30 minuti, durante la trasfusione ².

La trasfusione può essere continuata ad una velocità di 5-10ml/kg/h, tranne nei casi di rischio di sovraccarico circolatorio (per esempio in pazienti con patologie renali o cardiopatie scompensate), nei quali è consigliabile una velocità massima di 4ml/kg/h, con frequente monitoraggio ². Durante la trasfusione, è necessario monitorare attentamente il paziente e, se non ci sono reazioni avverse (es. dispnea), si può aumentare lentamente la velocità di infusione ².

Il plasma può essere somministrato a 5-10 ml/kg due-tre volte al giorno ².

La trasfusione dovrebbe essere completata entro 4 ore, per limitare il rischio di proliferazione microbica nei prodotti da trasfondere; nel caso ciò non fosse possibile, vi deve essere un'attenzione particolare nell'evitare la contaminazione o, in alternativa, si può dividere il prodotto da trasfondere in più subunità, che verranno refrigerate fino al momento della trasfusione ¹⁶.

In ogni caso, è importante controllare i parametri vitali ed ematici nei pazienti prima, durante e dopo la trasfusione. Bisogna monitorare lo stato del sensorio, la temperatura corporea, la frequenza respiratoria e cardiaca, il colore delle mucose, il tempo di riempimento capillare e gli altri parametri misurabili, al fine di svelare precocemente possibili reazioni trasfusionali, che possono avere esiti gravi, e comunque ridurre o annullare i benefici della trasfusione (con la riduzione, per esempio, dell'emivita dei globuli rossi trasfusi).

A tal fine può essere utile una scheda di monitoraggio (vedi Figura 1)

Record per TRASFUSIONI di emocomponenti:

- Emazie concentrate
- Sangue intero
- Plasma

Data:	Iniziali del medico:
N° cartella	Specie
Nome del ricevente	Razza
Proprietario	Sesso
	Età

Motivo della trasfusione:
 Gruppo sanguigno del ricevente:
 Nome/gruppo sanguigno soggetto donatore:
 E' stato eseguito il crossmatch?
 Sono state eseguite precedenti trasfusioni nel paziente ricevente?

Dettagli sacca trasfusa
Codice:
Data di scadenza:
Tipo di prodotto trasfuso:
Gruppo sanguigno:

Volume da trasfondere: $K \times \text{peso corporeo} \times \frac{(\text{Hct atteso} - \text{Hct ricevente})}{\text{Hct donatore}}$

(K=90 per il cane, 60 per il gatto)

I globuli rossi devono essere risospesi in una soluzione composta da 100 ml di soluzione fisiologica.

La trasfusione deve durare massimo 3 ore

Somministrare Desashock ® prima di effettuare la trasfusione al dosaggio di 0,2 mg/kg EV

Si raccomanda di utilizzare l'infusione a goccia attraverso l'applicazione della formula :

$$20 \times \text{velocità infusione} \times \text{PC} = \text{gocce/minuto}$$

60

Ora	Velocità d'infusione (ml/kg/hr)	FC (bpm)	RR (atm)	Temp. (° C)	Altro

Velocità d'infusione:
 Iniziare a 2 ml/kg/hr e monitorare ogni 15 minuti per 30 minuti
 Aumentare 5-10ml/kg/hr in pazienti normovolemici (se non sono presenti reazioni)
 Massima velocità di trasfusione per sangue intero: Pazienti normovolemici 22 ml/kg/24hr
 Pazienti ipovolemici 22ml/kg/hr
 Segni di reazione trasfusionale:
 Orticaria/eritemi/vomito/piressia/dispnea/tachipnea/tosse/tachycardia/ipotensione

Figura 1 – Scheda di monitoraggio utilizzata presso l'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato" di Pisa.

8 PRINCIPALI REAZIONI TRASFUSIONALI E TRATTAMENTO

8.1 Reazioni trasfusionali

Le reazioni trasfusionali possono essere causate da antigeni eritrocitari, proteine plasmatiche, leucociti e piastrine. Sono classificate come immunologiche e non immunologiche e possono essere acute o ritardate.

REAZIONI ACUTE IMMUNOMEDIATE:

-Emolisi immunomediata: Tra le principali reazioni trasfusionali, l'incompatibilità del gruppo sanguigno in una trasfusione può dar luogo alla produzione di alloanticorpi (IgG e IgM) antieritrocitari nel ricevente e, quindi, ad una reazione immunologica che dà luogo ad emolisi. La gravità della reazione emolitica dipende dal titolo anticorpale e dalla classe di immunoglobuline maggiormente coinvolta (le IgM tendono a fissarsi maggiormente al complemento e determinano reazioni più gravi). La reazione emolitica può avvenire sotto forma di crisi intravascolare acuta (se mediata da IgM o da alte concentrazioni di IgG) o come emolisi extravascolare ritardata (mediata da IgG). Sia la trasfusione di globuli rossi in un soggetto con anticorpi anti-eritrociti, sia la trasfusione di plasma contenente anticorpi contro i globuli rossi del ricevente possono causare una reazione emolitica.

Il gruppo sanguigno DEA 1 è il gruppo con più alto potere immunogeno, e quindi con la più alta probabilità di sviluppare reazioni post-trasfusionali. Anche se la maggior parte delle reazioni si verifica in soggetti precedentemente sensibilizzati, alla prima trasfusione è possibile un'emolisi ritardata dopo 7-10 giorni, dovuta agli anticorpi formatasi¹⁶

I segni clinici di un'emolisi acuta immunomediata sono:

- Febbre (reperto comune)
- Debolezza e abbattimento
- Tachicardia, dispnea, ipotensione, shock
- Nausea, vomito e diarrea
- Emoglobinemia ed emoglobinuria
- Leucopenia e trombocitopenia

La reazione può esitare in insufficienza renale acuta, coagulazione intravasale disseminata e morte.

-Reazione alle proteine plasmatiche: sono di tipo allergico e si manifestano più frequentemente entro 1-15 minuti dalla trasfusione, ma possono manifestarsi in qualsiasi momento della trasfusione. I sintomi sono di natura allergica: angioedema e orticaria sono frequenti; altri sintomi possibili sono scialorrea, vomito, diarrea, prurito e broncocostrizione con dispnea. La febbre non è un sintomo tipico. Raramente può esserci anafilassi, con ipotensione e, quindi, polso debole, mucose pallide e debolezza¹⁶.

Come conseguenza della reazione allergica, vi è perdita di fluidi e di albumina dal compartimento vascolare, con perdita dei benefici della trasfusione e, se grave, anche edema polmonare, versamento pleurico e ascite. Il rischio di queste reazioni aumenta con l'aumentare della velocità di trasfusione e con le trasfusioni multiple; in quest'ultimo caso, dovrebbe essere considerato l'impiego di un donatore diverso.

In caso di trasfusioni in emergenza a rapida velocità, soprattutto se c'è anamnesi di precedenti reazioni allergiche, può essere necessario un pre-trattamento del ricevente con antistaminici, con o senza corticosteroidi, che tuttavia non assicura che la reazione non si verifichi.¹⁶

In caso di anamnesi di precedenti reazioni allergiche in un soggetto che necessita trasfusione di eritrociti, si può procedere alla centrifugazione e al lavaggio con successiva centrifugazione e allontanamento del surnatante (ripetuto tre volte) dei globuli rossi; in questo modo si allontaneranno le proteine plasmatiche.

-Reazione ai leucociti e alle piastrine: sono reazioni febbrili non emolitiche dovute a incompatibilità con gli antigeni del complesso maggiore di istocompatibilità. In presenza di febbre, bisogna escludere l'emolisi e le reazioni febbrili non emolitiche dovute alle sostanze bioattive che si accumulano nel sangue conservato. Il rialzo termico è variabile (fino a 41°C) e può persistere fino a 12 ore; oltre che con la febbre, queste reazioni si manifestano con tremori e vomito, sintomi che si possono presentare durante la trasfusione o entro diverse ore da questa. Si presume siano dovute ad una reazione immunologica del ricevente agli antigeni leucocitari del donatore.¹⁶. L'impiego di donatori diversi, il pre-trattamento con desametasone o l'impiego di farmaci antiinfiammatori non steroidei circa un'ora prima della trasfusione, possono ridurre la comparsa di febbre.

La risposta anticorpale del ricevente alle piastrine trasfuse può causare una trombocitopenia immunomediata, che, nel cane, si può manifestare entro 1-2 settimane o fino a due mesi dopo la trasfusione.¹⁶

-Danno polmonare acuto correlato a trasfusione (TRALI): insorgenza di un'insufficienza respiratoria dopo trasfusione; è raro in medicina veterinaria. Si manifesta entro 24 ore dalla trasfusione con distress respiratorio e grave edema non cardiogeno indotto da reazione anticorpale; il rischio aumenta nei pazienti che hanno ricevuto trasfusioni multiple di plasma. In medicina umana, questa reazione è più frequente e l'aumento del rischio è stato correlato all'impiego di plasma da donatori di sesso femminile, specialmente se partorienti; nel cane, non si sa se c'è una correlazione.³⁶. Ha di solito un esordio acuto (entro 6 ore dalla trasfusione), ma può anche essere ad esordio ritardato; è indistinguibile da un danno polmonare acuto dovuto ad altre cause³⁷. Sebbene il meccanismo patogenetico non è del tutto chiaro, si verifica un'aderenza dei neutrofili alle cellule endoteliali dei capillari polmonari, con successivo rilascio di citochine e chemiochine e stimolo flogogeno e attivazione della coagulazione. Il conseguente aumento di permeabilità dei vasi polmonari causa edema polmonare, con dispnea, ipossiemia e tachipnea; tuttavia, è probabile il verificarsi di altri segni clinici (dovuti alla risposta anticorpale) quali ipertermia, ipotermia, tachicardia, ipotensione. Bisogna distinguere il TRALI da altre reazioni trasfusionali aventi gli stessi sintomi, come una reazione trasfusionale settica (in questo caso, bisogna escludere la sepsi), o reazioni trasfusionali anafilattiche (che però non presentano edema polmonare; in questo caso, una radiografia toracica può essere utile) o reazione da sovraccarico di volume e conseguente scompenso cardiaco³⁷. È probabile che TRALI sia sottostimato in medicina veterinaria, a causa del sovrapporsi dei segni clinici della malattia primaria dei pazienti sottoposti a trasfusione: un esordio acuto di dispnea può essere attribuito ad altre probabili cause³⁸.

REAZIONI ACUTE NON IMMUNOMEDIATE:

-Sepsi: dovuta a contaminazione microbica del prodotto trasfusionale. Il rischio è maggiore quando c'è proliferazione batterica. Il sangue contaminato può apparire più scuro, o contenere coaguli o bolle.¹⁶

I sintomi iperacuti sono generalmente dovuti all'endotossitemia e sono caratteristici dello shock: febbre, ipotensione, coagulazione vasale disseminata e danno renale. Se si sospetta contaminazione, si dovrebbe sospendere la trasfusione ed è consigliato effettuare un'emocoltura²¹.

-Sovraccarico circolatorio: insorge per le grandi quantità di fluidi somministrati durante la trasfusione. Si manifesta più frequentemente nei gatti, nei cani di taglia piccola, e in animali con concomitante insufficienza cardiaca, polmonare o renale. Si manifesta con tosse, cianosi e dispnea dovuta ad edema polmonare²¹.

Per la presenza di dispnea e, occasionalmente, di ascite può essere confusa con una reazione anafilattica ma in questo caso la frequenza cardiaca risulta normale o diminuita (salvo concomitanti patologie cardiache) e la pressione venosa centrale si innalza¹⁶.

In caso di reazione da sovraccarico circolatorio bisogna interrompere la trasfusione e somministrare diuretici e ossigeno²¹.

-Intossicazione da citrato (ipocalcemia): si verifica durante la somministrazione rapida di prodotti ematici ; l'eccesso di citrato (così come la quantità insufficiente di sangue rispetto all'anticoagulante) determina la chelazione del calcio del ricevente e i sintomi dell'ipocalcemia: vomito, tremori, contrazioni tetaniche e aritmie cardiache. Per confermare lo stato di ipocalcemia, è utile ricorrere alla misurazione del calcio ionizzato. In questo caso, bisogna interrompere la trasfusione e, se la reazione è grave, somministrare calcio gluconato^{16 21}

-Emolisi non immunomediata: può verificarsi se gli eritrociti sono sottoposti a temperature inadeguate (congelamento o temperature troppo elevate) durante la conservazione o la manipolazione del prodotto trasfusionale, o in caso di contemporanea somministrazione di soluzioni non isotoniche. Causa emoglobinemia ed emoglobinuria e va differenziata dall'emolisi immunomediata²¹.

-Ipotermia: la somministrazione di prodotti trasfusionali freddi può causare ipotermia nel paziente; il rischio aumenta se si somministrano elevate quantità di prodotti ematici velocemente, in pazienti pediatrici, di piccola taglia o durante l'anestesia¹⁶.

REAZIONI TRASFUSIONALI RITARDATE:

-Emolisi immuno-mediata ritardata: non vi sono reazioni acute , ma in 3-5 giorni dopo la trasfusione, l'ematocrito del paziente diminuisce rapidamente; fisiologicamente, l'emivita dei globuli rossi dovrebbe essere pari a 21 giorni nel cane¹⁶

Il test dell'antiglobulina diretto risulta positivo; non è possibile rivelare la reazione con i test di cross-matching²¹.

-Trasmissione di malattie infettive: reazione non immunomediata. Ogni donatore dovrebbe essere sottoposto a test di screening per rivelare la presenza di malattie infettive, trasmissibili mediante trasfusione.²¹

-Altre reazioni immunologiche: (raro) la “graft versus host disease” associata a trasfusione è dovuta ad un attacco immunologico da parte dei linfociti trasfusi verso il midollo osseo del ricevente, con conseguente pancitopenia ¹⁶.

MODIFICAZIONI BIOCHIMICHE DEL SANGUE CONSERVATO:

-Iperammoniemia: durante la conservazione degli eritrociti, si forma ammoniaca; per questo motivo, a pazienti con insufficienza epatica dovrebbero essere somministrati prodotti trasfusionali conservati da meno di due settimane ¹⁶.

-Ipopofatemia: i livelli di fosfati diminuiscono progressivamente durante la conservazione; l’ipofosfatemia aumenta la fragilità eritrocitaria. Anche in questo caso, in pazienti ipofosfatemici, soprattutto se in presenza di un’anemia emolitica secondaria a ipofosfatemia, è consigliabile somministrare prodotti trasfusionali conservati da meno di due settimane ¹⁶.

-Iperkaliemia: durante il periodo di conservazione, i globuli rossi rilasciano potassio. Questo, a differenza che nell’uomo, non costituisce un rischio in cane e gatto, che presentano bassi livelli di potassio nei globuli rossi; una eccezione è rappresentata dai cani di razza Akita o incroci con questa, nei quali il livello di potassio intraeritrocitario è alto ¹⁶.

-Acidosi: rara. Il pH diminuisce progressivamente nei prodotti trasfusionali conservati, ma citrato e lattato vengono metabolizzati in bicarbonato ¹⁶.

La suddivisione didattica delle reazioni trasfusionali in immunomEDIATE e non immunomEDIATE non è clinicamente utile; sarebbe più pratico suddividerle in base al tempo di insorgenza ed alla gravità delle stesse ³⁸. Sebbene le reazioni trasfusionali non siano molto frequenti, è molto probabile che siano sottostimate, data la criticità delle condizioni cliniche dei pazienti sottoposti a trasfusione. Per esempio, è nota una reazione infiammatoria alla trasfusione, soprattutto con l’utilizzo di emocomponenti conservati a lungo (per il rilascio di immunomodulatori da parte dei leucociti), che può portare ad una SIRS (sindrome da risposta infiammatoria sistemica), che può passare inosservata, data la frequenza dello stato infiammatorio nei pazienti riceventi (McMichael, 2015). Le reazioni trasfusionali dipendono anche dallo stato clinico del paziente e dal prodotto ematico utilizzato.

PRODOTTO EMATICO	REAZIONI AVVERSE
Sangue intero	Sovraccarico circolatorio ed emolisi acuta
Concentrato di eritrociti (PRBC)	Emolisi acuta
Plasma fresco congelato (FFP)	Sovraccarico circolatorio, reazioni allergiche e febbre
Plasma congelato (FP)	Sovraccarico circolatorio, reazioni allergiche e febbre
Crioprecipitato	Reazioni allergiche e febbre
Criosurnatante	Reazioni allergiche e febbre
Plasma ricco di piastrine	Reazioni allergiche e febbre

Tabella 9 – Prodotto ematico e principali reazioni avverse. Tabella tratta da “Trasfusioni ematiche, terapia con emocomponenti e soluzioni di trasportatori d’ossigeno”.(Hohenhaus, 2014).

L’uso di sangue intero, infatti, non è sempre indicato; trasfondendo l’emocomponente necessario per quel particolare disordine, si diminuisce il rischio di reazioni indesiderate.

Qualsiasi emocomponente che contenga emazie può provocare una reazione emolitica acuta immunomediata e il segno clinico più frequente è la febbre, probabilmente causata da citochine contenute nel sangue trasfuso o provenienti da anticorpi ²⁵. Le principali reazioni indesiderate alla trasfusione di tutte le componenti plasmatiche sono le reazioni allergiche e la febbre ²⁵.

Come per ogni trasfusione, c'è il rischio di sovraccarico di volume e di reazioni di ipersensibilità di tipo I, che si manifesta con edema facciale, reazioni allergiche, vomito e febbre ²⁵.

Con l'utilizzo del sangue intero aumenta il rischio di sovraccarico di volume, rispetto all'utilizzo del solo concentrato eritrocitario, soprattutto in presenza di anemia normovolemica ²⁵.

L'utilizzo del concentrato eritrocitario privato di leucociti (mediante la leucodeplezione) può causare una reazione emolitica acuta immunomediata; la leucodeplezione diminuisce il rischio di febbre non emolitica, di infezioni trasmesse mediante trasfusione, e di immunosoppressione ²⁵.

La trasfusione di qualsiasi componente plasmatico può causare reazioni allergiche e febbre. L'utilizzo di plasma (sotto forma di plasma fresco congelato o plasma congelato) può causare anche sovraccarico circolatorio ²⁵.

Le piastrine crioconservate (emocomponente prodotto tramite aferesi) sono conservate in dimetilsolfossido e per questo motivo, possono causare bradicardia se sono infuse non lentamente ²⁵.

Ci sono poche evidenze del beneficio della somministrazione preventiva di antistaminici per prevenire eventuali reazioni trasfusionali, ma dati i loro scarsi effetti collaterali, possono essere utilizzati senza gravi conseguenze. L'utilizzo di glucocorticoidi per prevenire le reazioni trasfusionali acute è dibattuto, ma è utile nella prevenzione nelle reazioni immunomEDIATE ritardate (non frequenti); dati gli effetti collaterali dei glucocorticoidi, il loro utilizzo deve essere preceduto da un'attenta analisi del rapporto beneficio/rischio ³⁸.

8.2 Trattamento delle reazioni trasfusionali acute

In caso di reazioni trasfusionali, la prima cosa da fare è interrompere la trasfusione; subito dopo, si devono monitorare i parametri vitali (temperatura, frequenza cardiaca, frequenza respiratoria, polso, mucose, pressione, eventuale presenza di ittero) e, possibilmente, eseguire ulteriori indagini, volte a caratterizzare l'eziopatogenesi della reazione (esami emato-biochimici, radiografie ecc.).

In caso di orticaria, angioedema e prurito si deve verificare se sia presente anche emolisi e sintomi di shock. Il trattamento consiste nel somministrare un antistaminico e un corticosteroide (fosfato sodico di desametasone) facendo attenzione a non somministrarli rapidamente in un unico bolo, poiché causano ipotensione ¹⁶.

In caso di shock anafilattico/anafilattoide la terapia prevede:

1. Assicurare la pervietà delle vie aeree e somministrare ossigeno
2. Somministrare adrenalina:
 - a. in caso di shock iperacuto → 0,1ml/kg EV (diluita 1:10000)
 - b. in caso di shock acuto → 0,1ml/kg EV (diluita 1:100000)
 - c. in caso di shock lieve-moderato → 0,05ml/kg SC o IM (diluita 1:100000)
 - d. In caso di necessità l'adrenalina può essere somministrata ogni 2-30 minuti.
3. Somministrare soluzione fisiologica, evitando di peggiorare l'edema polmonare
4. Antistaminico
5. Anti H2 (cimetidina o ranitidina)
6. Quando l'ipotensione è sotto controllo, somministrare corticosteroidi (succinato sodico di prednisolone o fosfato sodico di desametasone) nel corso di 20 minuti
7. Se l'ipotensione persiste, somministrare adrenalina o dopamina in infusione costante
8. Se ci sono segni di aumentata permeabilità vasale, somministrare plasma expander (ad esempio, etamido o pentamido)
9. Se è presente dispnea, somministrare aminofillina (non utilizzare insieme alla cimetidina) alla dose di 5mg/kg EV nel corso di 20 minuti.¹⁶

In caso di reazione emolitica nel cane, iniziare la fluidoterapia con soluzioni cristalloidi; nei casi moderati-gravi si può somministrare la furosemide (2-4mg/kg EV). In caso di grave emolisi, trattare l'acidosi se presente e considerare la somministrazione di eparina (70-200 UI/kg SC).¹⁶

-Se vi sono sintomi compatibili con una sepsi, testare il sangue della sacca e trattare il paziente con antibiotici ad ampio spettro (ad esempio, enrofloxacin associata a cefazolina) ¹⁶.

-In caso di sovraccarico circolatorio con dispnea, trattare con ossigenoterapia e furosemide; può essere utile l'aminofillina ¹⁶.

-Se il paziente presenta febbre, bisognerebbe escludere l'emolisi e la contaminazione batterica. Se la temperatura risulta superiore a 41°C, dev'essere considerata la somministrazione di farmaci antipiretici ¹⁶.

PARTE SPERIMENTALE

9 INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE

Per la parte sperimentale di questa tesi, è stata condotta un'indagine retrospettiva sui cani trasfusi con concentrato di eritrociti (PRBC) e sangue intero conservato (SWB) nell'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato" dell'Università di Pisa nel periodo di tempo che va da gennaio 2010 a marzo 2016.

Gli obiettivi di questa tesi sono stati:

- determinare i principali motivi di utilizzo dei suddetti prodotti trasfusionali e le principali cause di anemia;
- classificare l'anemia dei soggetti riceventi;
- analizzare l'incremento di ematocrito a seguito della trasfusione in relazione alla gravità dell'anemia, al suo decorso (acuto/cronico) e alle caratteristiche del prodotto trasfuso;
- analizzare i parametri vitali (frequenza cardiaca, frequenza respiratoria e temperatura) monitorati durante la trasfusione;
- analizzare le cause di ulteriori trasfusioni successive.

10 MATERIALI E METODI

10.1 Donatori e prodotti trasfusionali

È stato preso in esame il periodo di tempo che va da gennaio 2010 a marzo 2016.

I prodotti trasfusionali utilizzati sono stati ottenuti dal sangue donato presso il Centro Trasfusionale Veterinario del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa.

Il protocollo per la donazione prevede, alla prima donazione, l'esecuzione di una visita clinica completa, la tipizzazione del gruppo sanguigno, un esame emocromocitometrico completo, il profilo biochimico, il profilo coagulativo, l'esame sierologico per *Anaplasma phagocitophilum*, *Leishmania infantum* ed *Ehrlichia canis*, come previsto dalla Linea Guida "Linea guida relativa all'esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in ambito veterinario" del 1 febbraio 2016¹.

Alle donazioni successive, vengono eseguiti la visita clinica e l'esame emocromocitometrico. Il cane è contenuto manualmente, in decubito laterale e il sangue prelevato dalla vena giugulare viene raccolto, per gravità, in sacche poste su una bilancia basculante che contengono l'anticoagulante CPDA-1 in rapporto 1:7. La sacca è sigillata mediante anelli metallici, lasciando due aliquote nel deflussore, che serviranno per eventuali test di cross-match. Il sangue prelevato può essere conservato tal quale o venire separato in emocomponenti, attraverso centrifugazione, grazie ad un separatore di plasma. Il plasma viene così trasferito in una sacca priva di anticoagulante. Si ottengono, in tal modo, concentrato di eritrociti (PRBC), che sarà conservato in frigoemoteca a 4-6°C per circa 35 giorni, e plasma (FFP), che sarà congelato a -20°C. Prima della conservazione, le sacche vengono etichettate specificando: codice della sacca, tipo di prodotto trasfusionale, gruppo sanguigno, data di prelievo e data di scadenza.

I dati del cane donatore, del proprietario e la data di donazione sono registrati nel database elettronico (denominato "Ociroe") della piattaforma FileMaker Pro®. Ad ogni cane donatore corrisponde un numero di cartella clinica, cosicché si possa risalire alle cartelle cliniche e agli esami di laboratorio di ogni soggetto. Attraverso il database del Centro Trasfusionale, risulta che nel suddetto periodo sono state effettuate 313 donazioni, dalle quali si sono ottenuti i prodotti trasfusionali specificati in (Tabella 10)

SWB	FFP	PRBC
24	279*	289**

Tabella 10-prodotti trasfusionali (numero di sacche) ottenuti da 313 donazioni

*il numero di sacche di FFP risulta inferiore perché da 10 donazioni è stato ricavato solo PRBC; **di queste, 10 sacche sono state eliminate perché erano scadute

Nel presente studio sono stati presi in considerazione i soggetti che hanno ricevuto trasfusioni di PRBC e di SWB. Attraverso il portale del centro trasfusionale e attraverso l'amministrazione, è stato possibile risalire a 162 soggetti. Di questi soggetti abbiamo analizzato le cartelle cliniche, quando presenti, ed è stato possibile selezionare 108 soggetti con trasfusione documentata, in 2 soggetti su 108 non è stato possibile risalire alla data della trasfusione e sono stati considerati solo nell'analisi del segnalamento; uno dei due è stato considerato anche nell'analisi dei motivi della trasfusione. Ai restanti 106 soggetti corrispondono 147 trasfusioni perché alcuni soggetti sono stati trasfusi più di una volta; 78 soggetti del campione da 106 hanno ricevuto una sola trasfusione (Tabella 11) la maggior parte dei quali con anamnesi trasfusionale muta, alcuni avevano già ricevuto una precedente trasfusione (6 soggetti), altri non erano stati mai trasfusi (4 soggetti).

N° soggetti (tot 78)	Prodotto eritrocitario trasfuso
74	PRBC (1 sacca)
2	PRBC (2 sacche)
1	PRBC+SWB
1	SWB

Tabella 11 – Numero di soggetti e prodotto trasfuso

Risultano politrasfusi 28/106 soggetti, con gli emocomponenti specificati in Tabella 12.

N° soggetti	Prodotti trasfusi	
	PRBC	SWB
10	2	
9	1	
2	2	
2	3	
1	1	
1	3	
1		2
1	1	1*
1	4**	

Tabella 12 – prodotti somministrati nei soggetti politrasfusi;

* – nelle analisi è stata presa in considerazione la sacca di SWB

** – è stata presa in considerazione la seconda sacca, in quanto trasfusa 31 giorni dopo la prima (l'emivita dei globuli rossi trasfusi è di circa 3 settimane)

Tranne che nei casi specificati in Tabella 12, per ogni soggetto politrasfuso, è stata presa in esame la prima trasfusione con PRBC.

Considerando tutte le trasfusioni (147), attraverso la banca dati elettronica del Centro Trasfusionale o attraverso la scheda di monitoraggio contenuta nella cartella clinica dei soggetti riceventi, in 81 casi è stato possibile risalire al codice della sacca trasfusa (vedi Tabella 13).

N° sacche	Prodotto corrispondente
74	PRBC
6	FP
1	SWB

Tabella 13 – sacche rintracciabili e prodotto trasfusionale corrispondente

Quando presente, la data di donazione ha permesso di risalire all'età della sacca al momento della trasfusione; la data di donazione e i dati del donatore hanno permesso di risalire all'ematocrito (Hct) di quest'ultimo precedente alla trasfusione.

Tra le 106 trasfusioni sottoposte ad analisi, in 59 casi è stato possibile risalire alla sacca, e quindi all'ematocrito del donatore (tranne in 3 casi) ed alla data di trasfusione (tranne in un caso).

Gli ematocriti dei donatori sono stati sottoposti ad analisi per calcolarne la mediana e la deviazione standard o l'intervallo secondo i percentili.

10.2 Anemia e valori di ematocrito nei soggetti riceventi

E' stato analizzato il segnalamento dei soggetti trasfusi e, quando specificato, il motivo della trasfusione; su 107 soggetti, in 98 casi si è potuto risalire al motivo della trasfusione.

Al fine di classificare l'anemia, nei 106 soggetti sottoposti ad analisi, abbiamo analizzato i risultati dell'esame emocromocitometrico pre-trasfusione.

Dei 106 soggetti, è stato possibile risalire all'ematocrito pre-trasfusione in 86 soggetti: in 72 casi tramite esame emocromocitometrico strumentale, in 24 tramite microematocrito, in 10 casi erano presenti entrambi, e si è scelto il microematocrito, in quanto considerato "gold standard" nella misura dell'ematocrito³⁹.

Tra i soggetti con misurazione dell'ematocrito pre-trasfusione, 85 presentavano un'anemia: un soggetto aveva l'ematocrito nel range (47,4%), in quanto misurato prima della perdita di sangue, avvenuta durante una surrenalectomia (questo soggetto è escluso dalle analisi dei soggetti anemici).

L'anemia è stata classificata sulla base dei valori dell'ematocrito e degli indici corpuscolari¹⁶; in base all'ematocrito, viene definita:

-gravissima: Hct<13%

-grave: Hct compreso tra 13 e 20

-moderata: Hct compreso tra 20 e 29

-lieve: Hct compreso tra 30 e 37

L'anemia è stata ulteriormente suddivisa in base a MCV (volume corpuscolare medio, espresso in femtolitri) e MCHC (concentrazione cellulare media di emoglobina, espressa in grammi/decilitro), considerando il range di riferimento del laboratorio (vedi Intervalli di riferimento), in:

-microcitica, macrocitica o normocitica se il valore di MCV è rispettivamente inferiore, superiore o all'interno del range;

-ipocromica, ipercromica o normocromica se il valore di MCHC è rispettivamente inferiore, superiore o all'interno del range.

In base al numero assoluto dei reticolociti misurato dall'analizzatore, la rigenerazione dell'anemia è definita ¹⁶:

-assente: se il numero di reticolociti < 60 miliardi/litro

-lieve: se è compreso tra 61 e 150 miliardi/litro

-moderata: se tra 150 e 300 miliardi/litro

-marcata: se >300 miliardi/litro

Nove casi sono stati valutati tramite IR (indice reticolocitario), perché non era presente la conta reticolocitaria assoluta strumentale, suddividendo il grado di rigenerazione in: assente se $IR < 1$, rigenerativa se $IR > 2$, dubbio se IR compreso tra 1 e 2 ¹⁶.

Quindi, eliminando i casi dubbi, e valutando contestualmente i risultati delle due misurazioni, le anemie sono state suddivise in due classi rigenerative (assente-leggera e moderata-marcata).

Per ogni soggetto, sono stati riportati, ove presenti, i valori di ematocrito post trasfusione, suddividendoli in 4 intervalli di tempo:

-T1: da subito dopo la trasfusione fino a tre ore dopo

-T2: da 4 a 16 ore post-trasfusione

-T3: da 16 a 34 ore post-trasfusione

-T4: da 35 a 50 ore post-trasfusione

-T5: oltre le 50 ore post-trasfusione.

Gli intervalli di tempo sono stati convenzionalmente stabiliti in base alle misurazioni presenti. I valori di ematocrito post-trasfusione erano stati misurati in tempi variabili in ogni soggetto; purtroppo, ad ogni soggetto non corrispondono tutti gli intervalli di tempo.

Mediante sottrazione dell'ematocrito di partenza, si è ottenuto l'incremento dell'ematocrito nelle cinque fasce di tempo.

10.3 Incremento di ematocrito nel ricevente in relazione all'ematocrito iniziale

Si è voluto verificare se esiste una relazione tra l'aumento di ematocrito nelle varie fasce di tempo e l'ematocrito di partenza del ricevente.

Le popolazioni sono state analizzate tramite il "Shapiro-Wilk test" per verificare la distribuzione dei dati.

Quindi, si è proceduto a calcolare l'indice di correlazione tra ematocrito pre-trasfusione e incremento dello stesso a T1; allo stesso modo, si è correlato l'ematocrito pre-trasfusione agli incrementi nelle altre fasce di tempo.

Nel calcolare la correlazione tra l'ematocrito pre-trasfusione e l'incremento di ematocrito alla fascia di tempo corrispondente si è valutato l'indice di correlazione per ranghi di Spearman (ρ). Si è poi suddivisa la popolazione dei soggetti in tre sottogruppi, in base al valore dell'ematocrito pre-trasfusione:

-anemia gravissima

-anemia grave

-anemia moderata

Per ogni sottogruppo, si è analizzato statisticamente l'ematocrito pre-trasfusione e i valori di ematocrito a T1, T2, T3, T4 e T5, calcolandone la mediana e tracciando graficamente la tendenza dell'ematocrito. Per tracciare graficamente l'andamento dell'ematocrito nel tempo, ad ogni intervallo di tempo si è fatto corrispondere il valore medio ponendo:

- T0= -3h
- T1= 2h
- T2= 10h
- T3= 25h
- T4= 42h
- T5= 55h

Di ogni sottogruppo, sono stati analizzati i valori degli incrementi nelle varie fasce di tempo, per verificare se la distribuzione della popolazione è normale, calcolandone i valori di media e mediana.

Gli incrementi in una fascia di tempo dei tre sottogruppi sono stati comparati con il Friedman test per stabilire se ci sono differenze significative.

10.4 Incremento di ematocrito dei riceventi in relazione alle caratteristiche del prodotto trasfuso

Per analizzare la correlazione tra l'aumento di ematocrito e il volume di prodotto eritrocitario trasfuso, in ml/kg (quantità di PRBC/SWB trasfuso in rapporto al peso dell'animale ricevente); soltanto in 32 casi è stato possibile risalire al volume di PRBC/SWB effettivamente somministrato; di questi soltanto in 16/32 casi si può risalire all'ematocrito del donatore.

Per analizzare la correlazione tra l'incremento dell'ematocrito nelle fasce di tempo T1, T2, T3, T4 (non è stato possibile analizzare l'incremento a T5 in relazione ai ml/kg trasfusi in quanto questa registrazione era presente solo in un soggetto), e il volume trasfuso (ml/kg), indipendentemente dall'ematocrito del donatore, si è proceduto utilizzando il test di Spearman, ponendo il volume trasfuso come variabile indipendente e l'incremento di ematocrito come variabile dipendente.

Quando presente, si è messa in relazione l'età della sacca trasfusa con il conseguente incremento di ematocrito nelle varie fasce di tempo (indipendentemente dal motivo della trasfusione) mediante indice di Spearman.

10.5 Incremento di ematocrito nel ricevente in relazione alla causa di anemia

I soggetti trasfusi sono stati suddivisi in relazione alle cause dell'anemia in due gruppi:

-anemia da perdita acuta (emorragia ed emolisi);

-anemia cronica (insufficienza renale, aplasia midollare, parassitosi o altre cause).

Sono state riportate le mediane dei valori di ematocrito pre-trasfusione e nelle varie fasce di tempo (ad eccezione di T5, in quanto presenti solo poche misurazioni), tracciandone graficamente l'andamento.

L'ematocrito pre-trasfusione dei due gruppi è stato comparato con il Mann-Whitney test.

Il gruppo dei soggetti con anemia da perdita acuta è stato ulteriormente diviso nei sottogruppi: soggetti con emorragia e soggetti con emolisi. Sono state riportate le mediane dei valori

dell'ematocrito pre-trasfusione, a T1, T2, T3, T4, utilizzandole per tracciare l'andamento dell'ematocrito in un grafico, come precedentemente spiegato per tracciare graficamente l'andamento di Hct nelle anemie gravissime, gravi e moderate. L'ematocrito pre-trasfusione dei due sottogruppi è stato comparato con il Mann-Whitney test.

Sono state riportate le mediane dei valori di incremento dell'ematocrito nelle varie fasce di tempo dei soggetti con emorragia e di quelli con emolisi e sono stati comparati (Mann-Whitney test) gli incrementi di Hct ad ogni fascia di tempo.

10.6 Monitoraggio dei parametri vitali

Si è analizzato, dove presente, il monitoraggio dei parametri vitali durante la trasfusione; sulla scheda di monitoraggio (record per trasfusioni) c'è una tabella da compilare con i valori delle misurazioni di: frequenza cardiaca (FC), frequenza respiratoria (FR), temperatura (T°), e altri parametri rilevati (come per esempio il colore delle mucose, la pressione sistemica); se non presente, sono stati presi in considerazione i parametri rilevati sulla cartella clinica.

È stato possibile risalire a 50 soggetti aventi monitoraggio dei parametri vitali, per 24 soggetti c'erano informazioni incomplete; quindi, è stato possibile analizzare i parametri vitali di 26 soggetti, nei quali è stata riportata la temperatura, la FC e la FR a inizio trasfusione (T0), dopo 15 minuti (T1) a metà trasfusione (T2) e a circa $\frac{3}{4}$ della trasfusione (T3).

Si è proceduto ad analizzare l'andamento dei parametri fisici monitorati durante la trasfusione (frequenza cardiaca, frequenza respiratoria e temperatura): per ogni parametro, sono stati analizzati statisticamente i valori misurati a T0, T1, T2 e T3, mediante confronto con il Friedman test; calcolando la mediana dei valori nelle fasce di tempo, si è tracciando graficamente l'andamento di quel parametro nel tempo, ponendo T2= 75 minuti e T3= 120 minuti.

10.7 Soggetti politrasfusi

Come già detto, in 28 soggetti è stata somministrata almeno un'altra trasfusione, oltre la prima: in 15 casi di PRBC/SWB, in 10 casi di FP, in 3 casi sia di PRBC che di FP.

Dei soggetti politrasfusi con componenti eritrocitarie (18 soggetti), in 16 casi è stato possibile risalire all'ematocrito pre-trasfusione, classificando l'anemia in base alla gravità.

Sono stati riportati (quando presenti):

- motivo della trasfusione;
- tempo intercorso tra 1° e 2° trasfusione;
- Hct prima della 2° trasfusione;
- Hct successivo alla 2°trasfusione;

10.8 Analisi statistica

I dati raccolti sono stati elaborati con il software statistico MedCalc® versione 15.11. Per questa tesi si sono utilizzati i seguenti test statistici:

-“Shapiro-Wilk test”: per verificare la distribuzione dei dati, assumendo che per valori di $P > 0,05$ la distribuzione è normale. Conoscere la distribuzione dei dati è fondamentale nella scelta nel test da utilizzare.

Questo test è stato utilizzato per verificare la distribuzione dei dati nei seguenti casi:

1. ematocrito dei cani donatori;
2. incremento di Hct nelle varie fasce di tempo e corrispettivi Hct pre-trasfusione;
3. valori di Hct a T0, T1, T2, T3, T4 e T5 nei soggetti con anemia gravissima, grave e moderata
4. incrementi di Hct a T0, T1, T2, T3, T4 e corrispettivi ml/kg trasfusi
5. valori di Hct a T0, T1, T2, T3, T4 in soggetti con anemia acuta e in soggetti con anemia cronica
6. valori di Hct a T0, T1, T2, T3, T4 in soggetti con emorragia e in quelli con emolisi
7. incremento di Hct a T0, T1, T2, T3, T4 in soggetti con emorragia e in quelli con emolisi

-Test di correlazione mediante indice di correlazione per ranghi di Spearman (ρ); l'indice ρ assume valori da -1 a 1 indicando il tipo di correlazione e la forza:

- $\rho=0$: nessuna correlazione

- ρ negativo: correlazione inversamente proporzionale

- ρ positivo: correlazione direttamente proporzionale

Tanto più il valore di ρ si avvicina ai due estremi +1 o -1, tanto più la correlazione è forte, in senso positivo o negativo, rispettivamente.

Se il valore assoluto di ρ è compreso tra 0 e 0,3 si ha una correlazione debole; se compreso tra 0,3 e 0,7 la correlazione è moderata; se è maggiore di 0,7 la correlazione è forte.

Per ogni test, per valori di $P < 0,05$, il risultato è statisticamente significativo.

Questo test è stato usato nei seguenti casi:

1. correlazione tra l'incremento di Hct nei vari intervalli di tempo (variabile dipendente) e Hct di partenza del paziente trasfuso (variabile indipendente)
2. correlazione tra incremento di Hct a T0, T1, T2, T3, T4 e ml/kg trasfusi
3. correlazione tra incremento di Hct a T0, T1, T2, T3, T4 (variabile dipendente) ed età della sacca corrispondente (variabile indipendente)

-Il Friedman test è stato utilizzato per stabilire se ci sono differenze significative ($P < 0,05$) tra più variabili; è stato usato per la comparazione degli incrementi di Hct nelle anemie gravissime, gravi e moderate ad ogni intervallo di tempo; è stato anche utilizzato per comparare i valori di ogni parametro vitale misurato (FC, FR e temperatura) a T0, T1, T2 e T3.

-Il Mann-Whitney test è stato utilizzato per confrontare due serie di campioni (dat): se il valore di P è $< 0,05$ i due campioni saranno statisticamente differenti. In questo studio è stato utilizzato per comparare:

1. Hct pre-trasfusione dei soggetti con anemia acuta e di quelli con anemia cronica
2. Hct pre-trasfusione dei soggetti con emorragia e di quelli con emolisi
3. Incremento di Hct dei soggetti con emorragia e di quelli con emolisi in ogni intervallo di tempo

10.9 Intervalli di riferimento

I valori di riferimento utilizzati per questo studio sono i seguenti:

-MCV: 61,6-73,5 femtolitri (fL)

-MCHC: 32-37,9 g/dl

I range fisiologici di normalità dei parametri vitali nel cane⁴⁰ sono i seguenti:

-FC: 60-90 bpm (battiti per minuto)

-FR: 16-18 atti/minuto

11 RISULTATI

11.1 Donatori e prodotti trasfusionali

È stato possibile, in 55 casi, risalire all'ematocrito dei soggetti donatori. Nella Tabella 14 è riportato il numero di soggetti analizzati, distribuzione, media, mediana e deviazione standard relativa dell'**ematocrito dei soggetti donatori**.

N° soggetti	Distribuzione	Media	Mediana	Deviazione standard relativa
55	Normale	45,5	45,7	10,7%

Tabella 14 analisi dell'ematocrito dei donatori

Il seguente box plot è la rappresentazione grafica della distribuzione dell'ematocrito dei soggetti donatori.

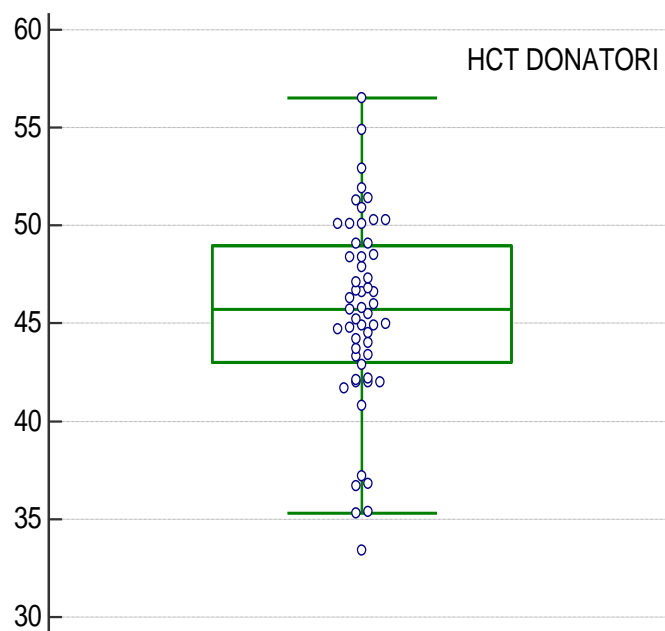


Grafico 1 -distribuzione dell'ematocrito dei soggetti donatori (Box and Whiskers plot)

11.2 Anemia e valori di ematocrito nei soggetti riceventi

La popolazione dei soggetti trasfusi (108 soggetti) risultava così suddivisa (vedi Tabella 15)

SESSO	N°soggetti	% su totale
Femmine intere	32	29,5
Femmine sterilizzate	27	25
Maschi interi	41	38
Maschi castrati	8	7,5

Tabella 15 –segnalamento dei soggetti trasfusi

L'età dei soggetti trasfusi va dai 2 mesi ai 16 anni, con una media di 7,8 anni.

I motivi per i quali è stata somministrata la trasfusione sono stati individuati in 98 soggetti e specificati in Tabella 16, con le relative cause (quando erano registrate):

N° soggetti	Motivo della trasfusione	Cause	N.
35	Emorragia	intraoperatorie	9
		traumatica	1
		piastrinopenia	7
		splenectomia (per neoplasia)	7
		shock settico	1
		causa non specificata	8
		avvelenamento da rodenticidi	2
17	Emolisi	anemie emolitiche immunomediate (IMHA)	14
		sindrome di evans	1
		morso di vipera	2
5	Anemia cronica	Ehrlichiosi	1
		parassitosi intestinale	1
		1 da pulci	1
9	Ipoproduzione	causa non specificata	2
		aplasia midollare	1
32	Anemia	insufficienza renale	8
		Cause non specificate	

Tabella 16 – motivi di trasfusione e cause

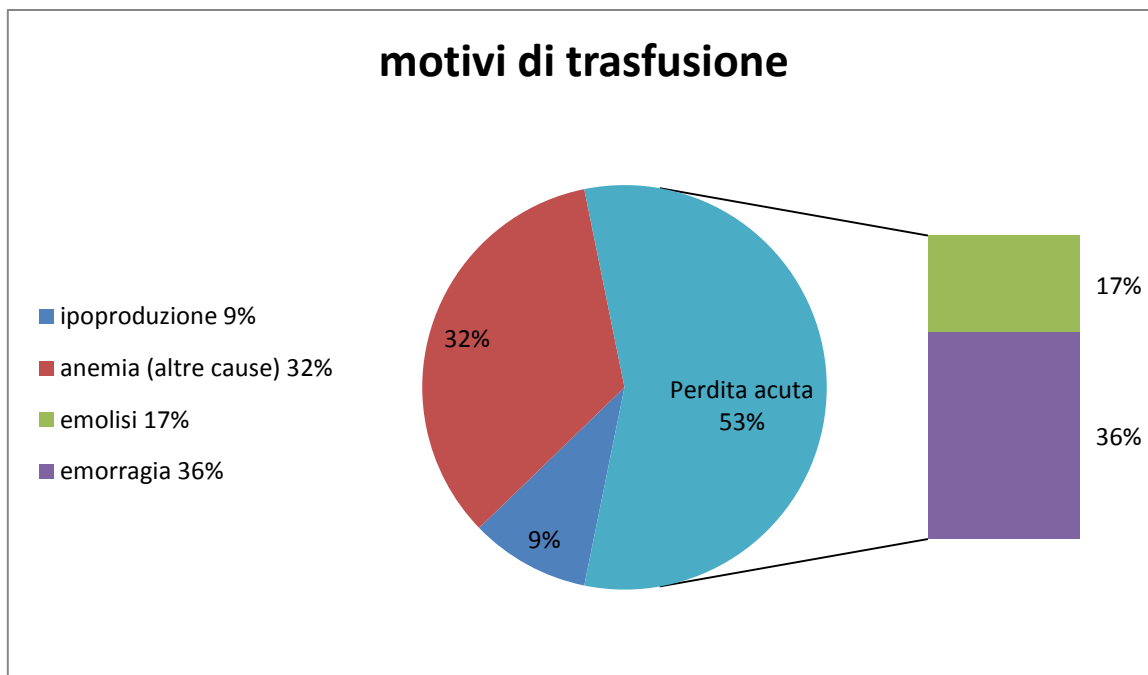


Grafico 2 – motivi di trasfusione

11.3 Anemia e valori di ematocrito nei soggetti riceventi

La tabella 8 riassume la classificazione della gravità dell'anemia in base all'ematocrito dei soggetti inclusi in questo studio (85 soggetti):

GRAVITA' ANEMIA (Hct)	N°	% su totale	Mediana	Min-Max
GRAVISSIMA (>13)	47	55,3	10,00	3,9-12,9
GRAVE (13-20)	30	35,3	15,15	13-20
MODERATA (20-29)	8	9,4	23,05	20,7-27,5
LIEVE (30-37)	0	0		

Tabella 17 – gravità dell'anemia nei soggetti sottoposti a trasfusione

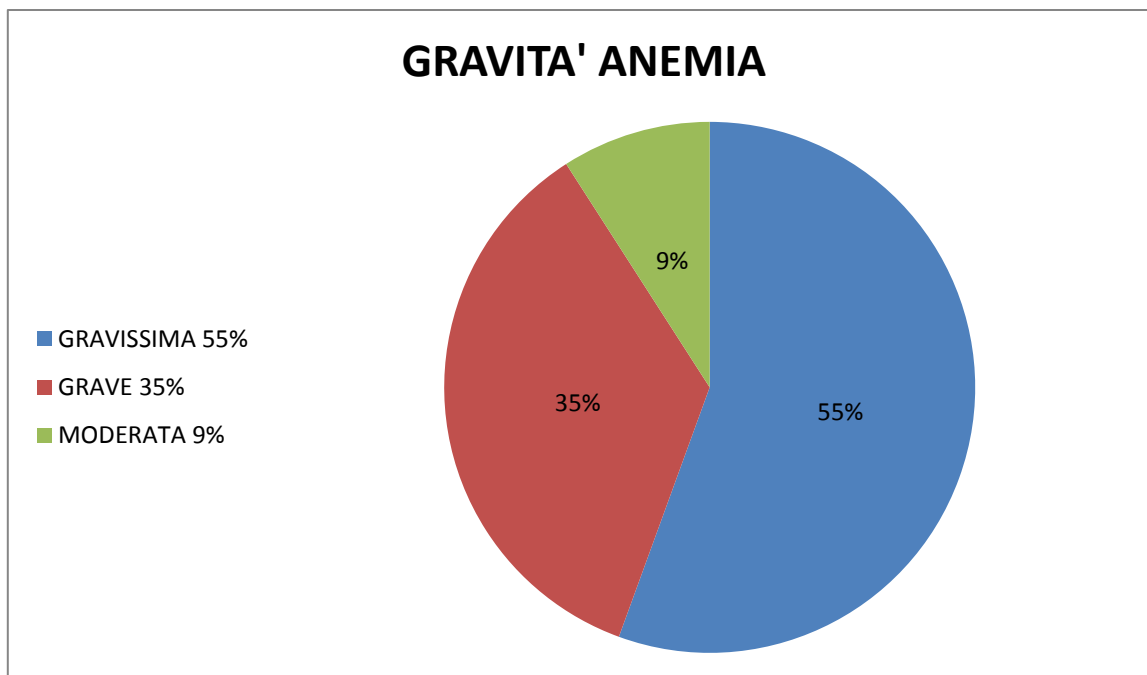


Grafico 3 – gravità dell’anemia nei soggetti trasfusi

In Tabella 18, è riportata la classificazione dell’anemia in base a MCV e MCHC nei soggetti con anemia gravissima (47 soggetti):

Anemia	N° soggetti	% su totale
Normocitica normocromica	8	17
Microcitica normocromica	7	15
Macrocitica ipocromica	6	12,8
Microcitica ipocromica	3	6
Macrocitica normocromica	3	6
Normocitica ipocromica	2	4
Normocitica ipercromica	2	4
Microcitica ipercromica	1	2
Macrocitica*	1	2
Microcitica*	1	2
Non classificabile**	12	25

Tabella 18 – classificazione delle anemie gravissime in base a MCV e MCHC

*valore di MCHC non presente; **valore di MCV e di MCHC non presenti

La classificazione delle anemie gravi (30 soggetti) in base a MCV e MCHC è riportata in Tabella 19.

Anemia	N° soggetti	% su totale
Normocitica normocromica	15	50
Microcitica normocromica	5	16
Macrocitica ipocromica	3	10
Macrocitica normocromica	2	6
Microcitica ipocromica	1	3
Microcitica ipercromica	1	3
Normocitica ipocromica	1	3
Non classificate*	2	6

Tabella 19 – classificazione delle anemie gravi in base a MCV e MCHC

*valore di MCV e di MCHC non presenti

Classificazione delle anemie moderate (8 soggetti) in base a MCV e MCHC (Tabella 20):

Anemia	N° soggetti	% su totale
Normocitica normocromica	2	25
Microcitica normocromica	2	25
Macrocitica normocromica	1	12,5
Microcitica*	1	12,5
Non classificate**	2	25

Tabella 20 – classificazione delle anemie moderate in base a MCV e MCHC

*valore di MCHC non presente; **valore di MCV e di MCHC non presenti

Classificazione della rigenerazione delle anemie (64 casi), in base al numero assoluto di reticolociti, e all'IR (vedi Tabella 21):

Rigenerazione	N° soggetti	%
Assente-lieve	56	87,5
Moderata-marcata	8	12,5

Tabella 21 – classificazione delle anemie in base alla rigenerazione

11.4 Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione all'ematocrito iniziale

Gli incrementi di ematocrito nelle varie fasce di tempo e i corrispettivi ematocriti pre-trasfusione sono riportati nella seguente tabella.

N° soggetti	25		29		26		21		4	
	T0*	T1	T0	T2	T0*	T3	T0	T4*	T0	T5
mediana	12	8,2	13	6,5	12,75	7,6	13,2	2,4	11	12,25
min	5,2	-3,5	5,2	-3,8	3,9	-5,4	6,8	-7,2	10	0,1
max	24,3	25	25,4	22,1	27,5	24,9	25,4	34	14	19,2

Tabella 22 – incrementi di ematocrito e rispettivi ematocriti pre-trasfusione

*distribuzione non normale

I risultati dei test di correlazione (test di Spearman) tra gli incrementi di ematocrito negli intervalli di tempo e i corrispettivi ematocriti pre-trasfusione sono riportati nella Tabella 23:

TEMPO	Valore P *	Indice rho	correlazione
T1	0,0005 (s)	-0,643	Inversamente proporzionale, moderata
T2	0,2080 (ns)	-0,241	
T3	0,0291 (s)	-0,428	Inversamente proporzionale, moderata
T4	0,2066 (ns)	-0,287	
T5	0,2621 (ns)	0,738	

Tabella 23 – correlazione tra incremento di Hct negli intervalli di tempo e i corrispettivi Hct pre-trasfusione

*s= significativo; ns= non significativo

Di seguito, i risultati rappresentati mediante grafici (scatter diagram) (Grafico 4, Grafico 5, Grafico 6, Grafico 7, Grafico 8).

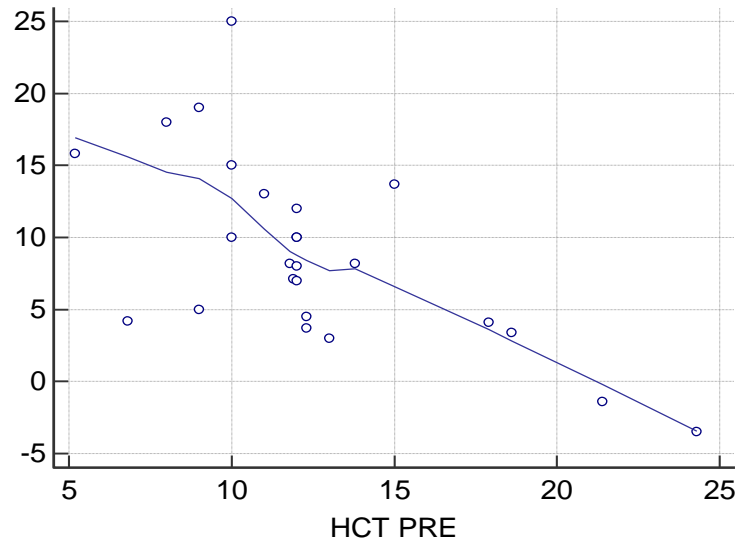


Grafico 4 –rappresentazione grafica (scatter diagram) della correlazione tra incremento di Hct a T1 e Hct pre-trasfusione

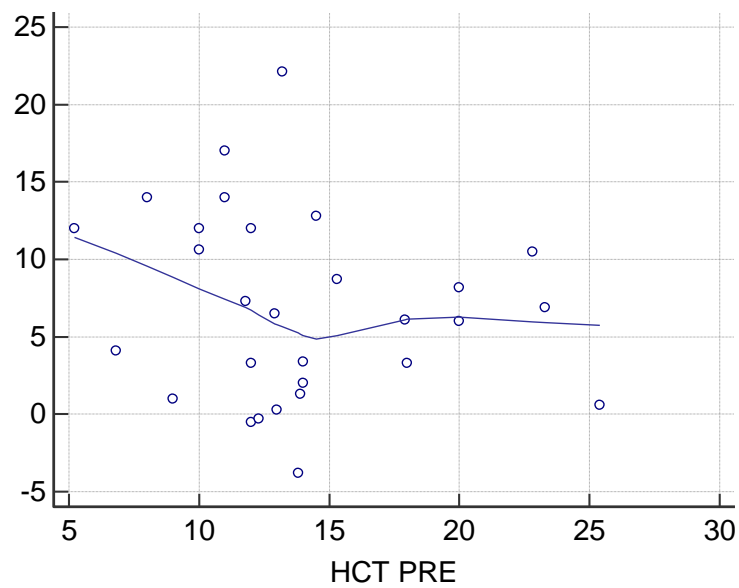


Grafico 5 – rappresentazione grafica (scatter diagram) della correlazione tra incremento di Hct a T2 e Hct pre-trasfusione

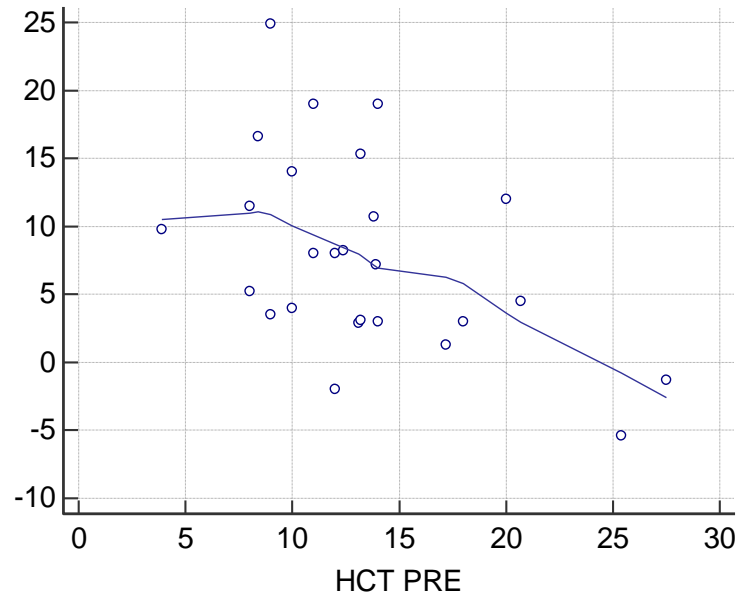


Grafico 6 – rappresentazione grafica (scatter diagram) della correlazione tra incremento di Hct a T3 e Hct pre-trasfusione

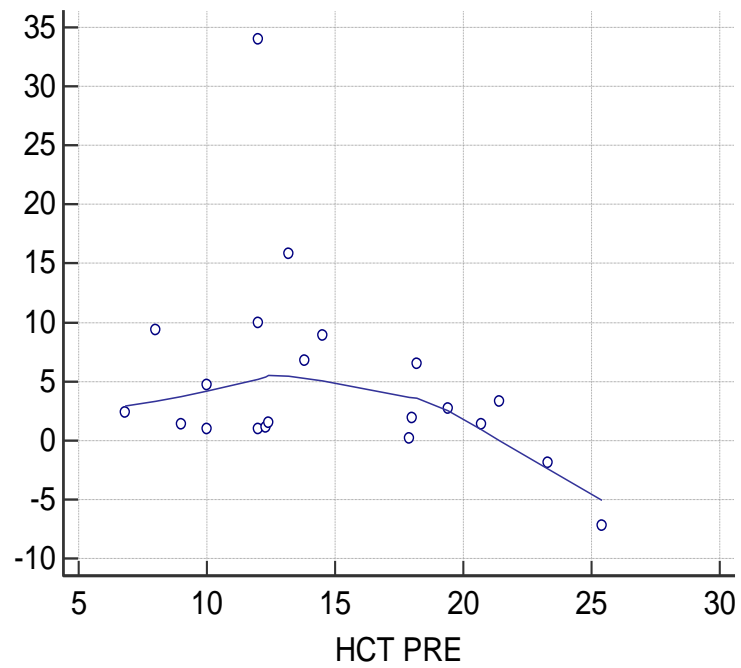


Grafico 7 – rappresentazione grafica (scatter diagram) della correlazione tra incremento di Hct a T4 e Hct pre-trasfusione

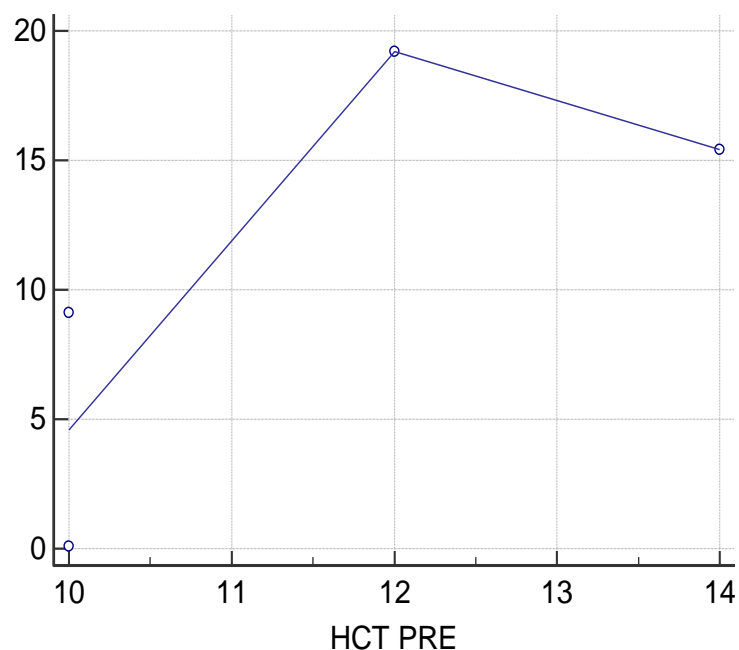


Grafico 8 – rappresentazione grafica (scatter diagram) della correlazione tra incremento di Hct a T5 e Hct pre-trasfusione

Nella Tabella 24 sono state riportate le mediane dei valori di ematocrito a T0 (pre-trasfusione) a T1, T2, T3, T4 e T5 dei soggetti con anemia gravissima, grave e moderata; le stesse sono state utilizzate per tracciare l'andamento grafico dell'ematocrito nei suddetti soggetti (Grafico 9, Grafico 10, Grafico 11).

Anemia	Hct T0	Hct T1	Hct T2	Hct T3	Hct T4	Hct T5
Gravissima	11,4	20,5	19,25	19,5	13,65	19,1
Grave	15,15	22	22,65	21,05	22,1	*
Moderata	23,05	20,4	30,2	25,2	21,75	**

Tabella 24 – mediane dei valori di Hct a T0, T1, T2, T3, T4 e T5
*campione troppo piccolo; **misurazioni non presenti

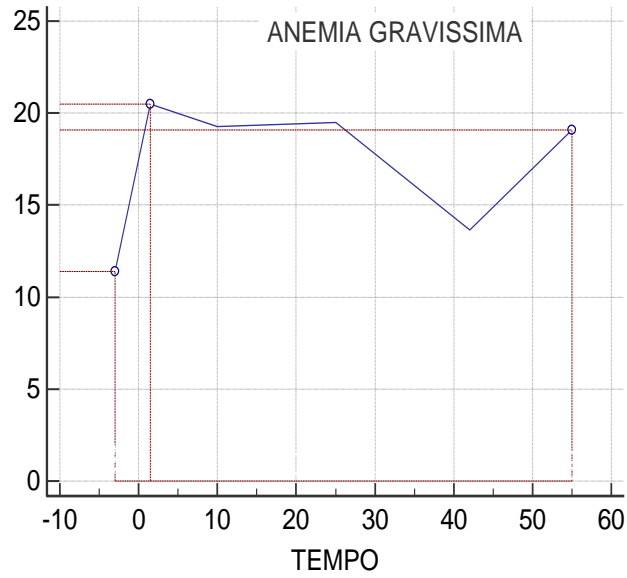


Grafico 9-andamento dell'ematocrito in soggetti trasfusi con anemia gravissima

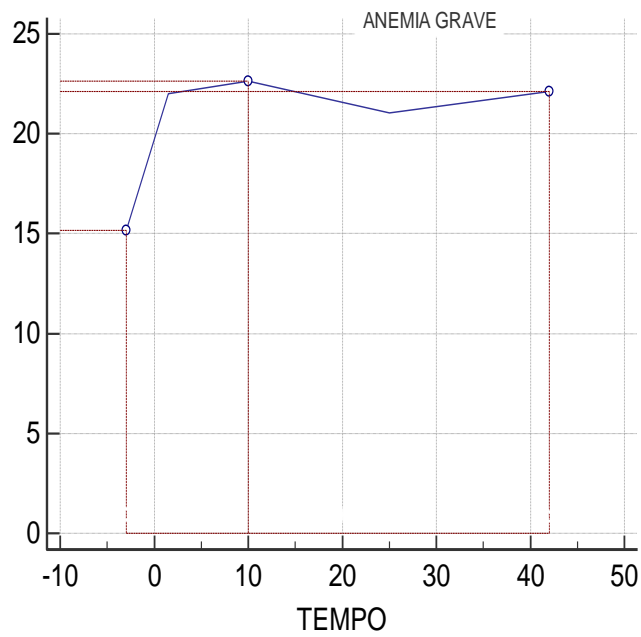


Grafico 10-andamento dell'ematocrito in soggetti trasfusi con anemia grave

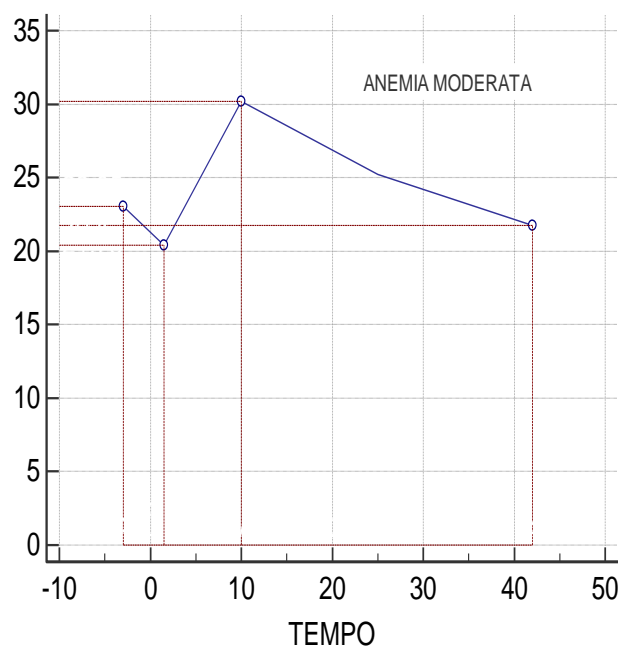


Grafico 11-andamento dell'ematocrito in soggetti trasfusi con anemia moderata

Nella Tabella 25 sono riportate le mediane degli incrementi di ematocrito dei soggetti riceventi con anemia gravissima, grave e moderata per ogni fascia di tempo e i risultati del test di comparazione.

T	Anemia	N°	Mediana	Valore P
T1	Gravissima	18	10	0,13 (ns)
	Grave	5	4,1	
	Moderata*	2	-2,45	
T2	Gravissima	14	8,95	0,79 (ns)
	Grave	12	4,7	
	Moderata	3	6,9	
T3	Gravissima	13	8,2	0,79 (ns)
	Grave	10	5,15	
	Moderata	3	-1,3	
T4	Gravissima*	10	1,95	0,82 (ns)
	Grave	7	6,5	
	Moderata	4	-0,25	
T5	Gravissima	3	9,1	
	Grave*	1	**	
	Moderata	0		

Tabella 25 – mediane degli incrementi di Hct e comparazione degli stessi nelle varie popolazioni allo stesso intervallo di tempo

Di seguito, le rappresentazioni grafiche (Box and Whiskers plot) della comparazione degli incrementi di ematocrito tra le sottopopolazioni (Grafico 12, Grafico 13, Grafico 14, Grafico 15)

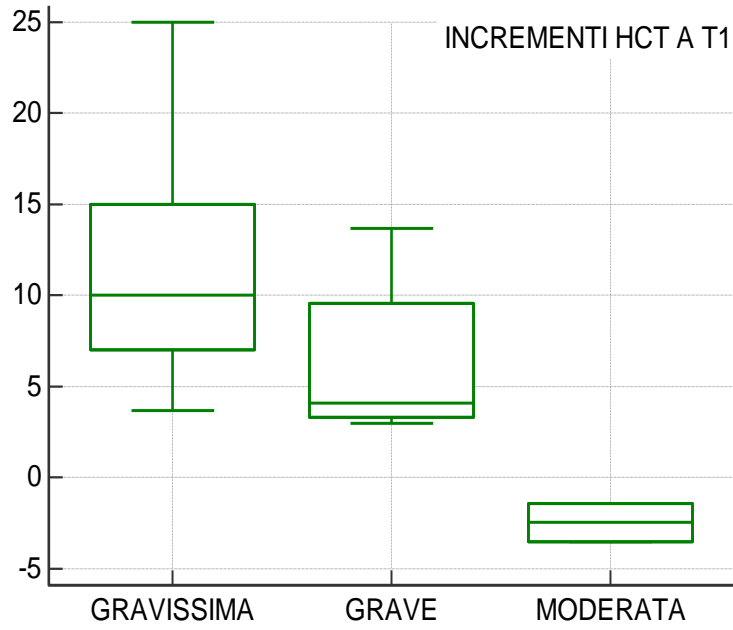


Grafico 12 – rappresentazione grafica (Box and Whiskers plot) degli incrementi di Hct a T1 nei soggetti con anemia gravissima, grave e moderata

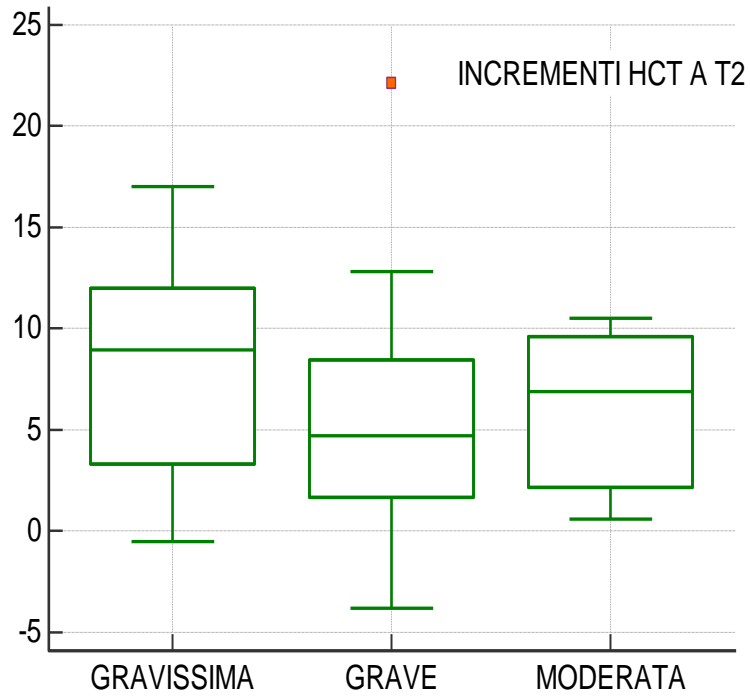


Grafico 13 – rappresentazione grafica (Box and Whiskers plot) degli incrementi di Hct a T2 nei soggetti con anemia gravissima, grave e moderata

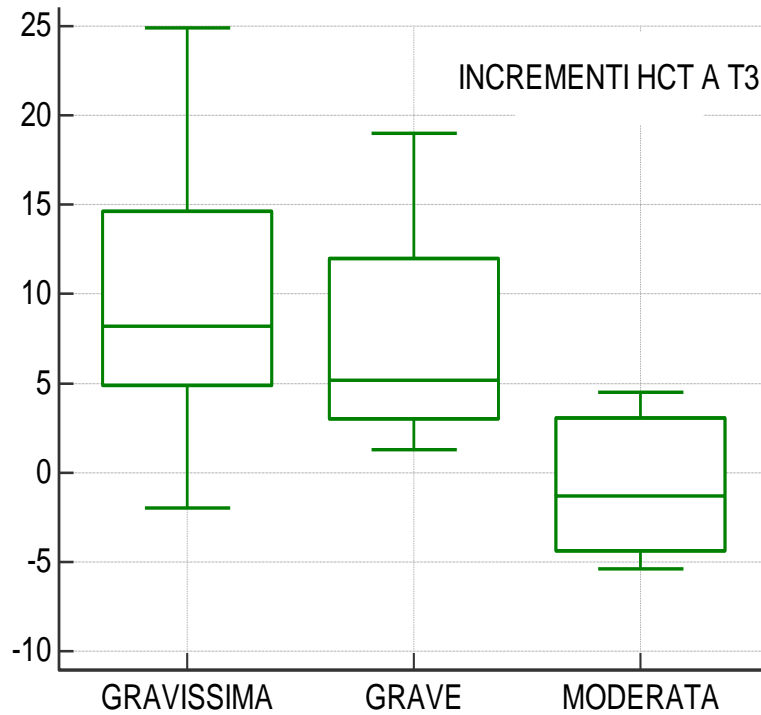


Grafico 14 – rappresentazione grafica (Box and Whiskers plot) degli incrementi di Hct a T3 nei soggetti con anemia gravissima, grave e moderata

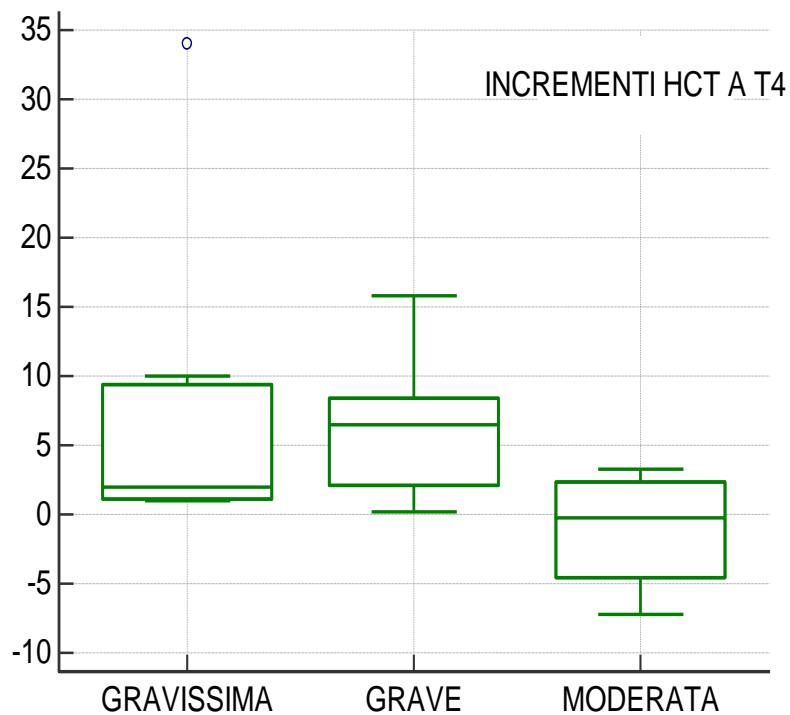


Grafico 15 – rappresentazione grafica (Box and Whiskers plot) degli incrementi di Hct a T4 nei soggetti con anemia gravissima, grave e moderata

11.5 Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione alle caratteristiche del prodotto trasfuso

La correlazione tra l'incremento di ematocrito e il volume di prodotto trasfuso (ml/kg) mediante test di Spearman ha prodotto i seguenti risultati (vedi Tabella 26).

T	N°		P	rho	Correlazione
T1	6	Incremento Hct	0,91 (ns)	0,05	Direttamente proporzionale; correlazione molto debole
		ml/kg*			
T2	9	Incremento Hct	0,46 (ns)	-0,28	Inversamente proporzionale; correlazione debole
		ml/kg*			
T3	8	Incremento Hct	0,79 (ns)	0,18	Direttamente proporzionale; correlazione debole
		ml/kg*			
T4	6	Incremento Hct*	0,49 (ns)	0,49	Inversamente proporzionale; correlazione moderata
		ml/kg			

Tabella 26 – correlazione tra incremento di Hct e volume di prodotto trasfuso (ml/kg) mediante test di Spearman

La correlazione tra incremento di ematocrito nelle varie fasce di tempo e l'età della sacca corrispondente con test di Spearman ha prodotto i seguenti risultati (Tabella 27):

T	N°	P	rho	correlazione
T1	14	0,50 (ns)	0,193	
T2	17	0,22 (ns)	0,312	
T3	15	0,03 (s)	-0,547	Inversamente proporzionale; correlazione moderata
T4	13	0,005 (s)	-0,721	Inversamente proporzionale; correlazione forte

Tabella 27 – correlazione tra incremento di Hct e età della sacca mediante test di Spearman

Di seguito (Grafico 16, Grafico 17), le rappresentazioni grafiche delle correlazioni statisticamente significative (a T3 e a T4).

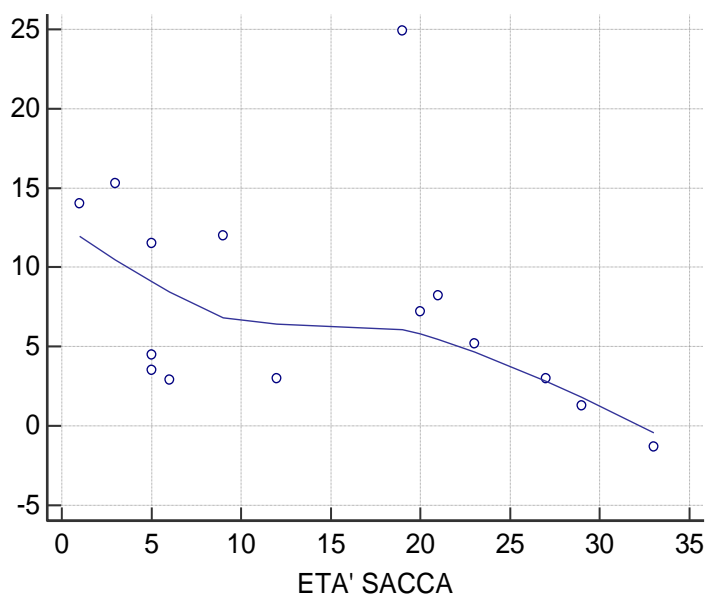


Grafico 16 – correlazione tra incremento di Hct ed età della sacca a T3 (scatter diagram)

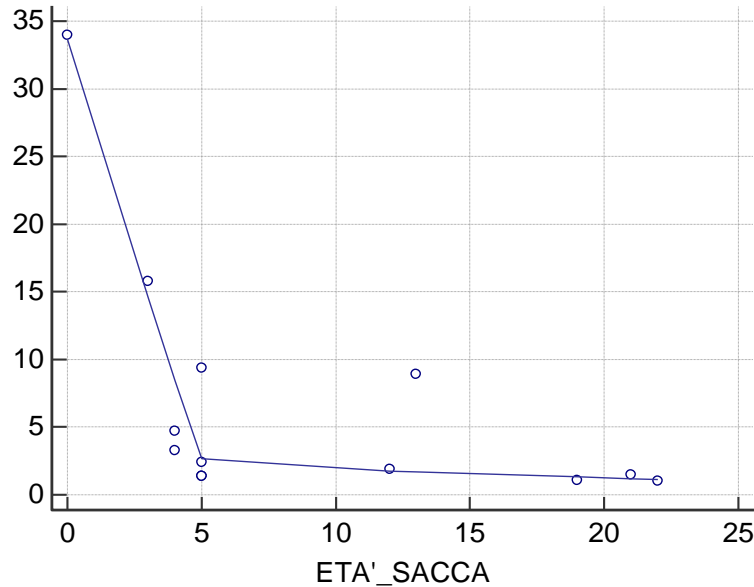


Grafico 17 – correlazione tra incremento di Hct ed età della sacca a T4 (scatter diagram)

11.6 Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione alla causa di anemia

La Tabella 28 riporta l'analisi dei valori di ematocrito a T0, T1, T2, T3, T4 in soggetti con anemia acuta (55 cani) e con anemia cronica (14 cani)

T	ANEMIA	N°	Mediana (Min-Max)
T0	acuta	43	13,1 (4,2-27,5)
	cronica	9	13,8 (3,9-20,7)
T1	acuta	15	20 (14-28)
	cronica	1**	**
T2	acuta	14	21,65 (10-35,3)
	cronica	2**	**
T3	acuta	15	21 (12,5-33,9)
	cronica	5	24,5 (10-30)
T4	acuta	13*	17,4 (10,4-46)
	cronica	2**	**

Tabella 28 – valori di Hct in soggetti con anemia acuta e in soggetti con anemia cronica
*distribuzione non normale; **campione troppo piccolo

La comparazione (mediante il Mann-Whitney test) tra ematocrito pre-trasfusione dei riceventi con anemia da perdita acuta e quelli dei soggetti con anemia cronica è risultata non statisticamente significativa (P=0,618). Di seguito, la rappresentazione grafica (Grafico 18) mediante box-plot:

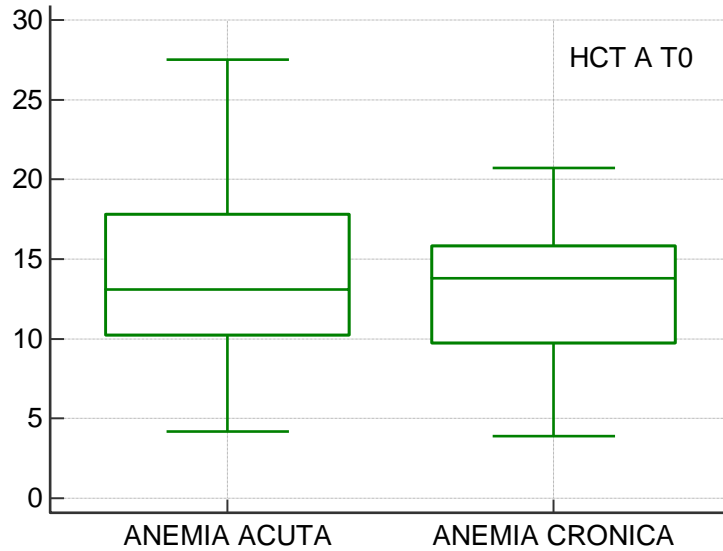


Grafico 18 – comparazione (Box and Whiskers plot) tra Hct pre-trasfusione tra soggetti con anemia acuta e cronica

I valori di ematocrito a T0, T1, T2, T3, T4 nei soggetti con anemia da emorragia e da emolisi sono riportati in Tabella 29.

T	CAUSA	N°	Mediana (Min-Max)
T0	emorragia	28	14,6 (8,4-27,5)
	emolisi	15	10 (4,2-17,2)
T1	emorragia	9	20 (16-28)
	emolisi	6	22 (14-26)
T2	emorragia	9	26 (12-35,3)
	emolisi	5	15,3 (10-25)
T3	emorragia	8	27,35 (16-33,9)
	emolisi	7	19 (12,5-21,1)
T4	emorragia	8	22,75 (13,4-46)
	emolisi	5	13 (10,4-17,4)

Tabella 29 – valori di Hct in soggetti con emorragia e in soggetti con emolisi

La comparazione mediante il test di Mann-Whitney tra ematocrito pre-trasfusione dei soggetti con emorragia e di quelli con emolisi è risultata statisticamente significativa ($P=0,0006$). Di seguito, il relativo box-plot (Grafico 19).

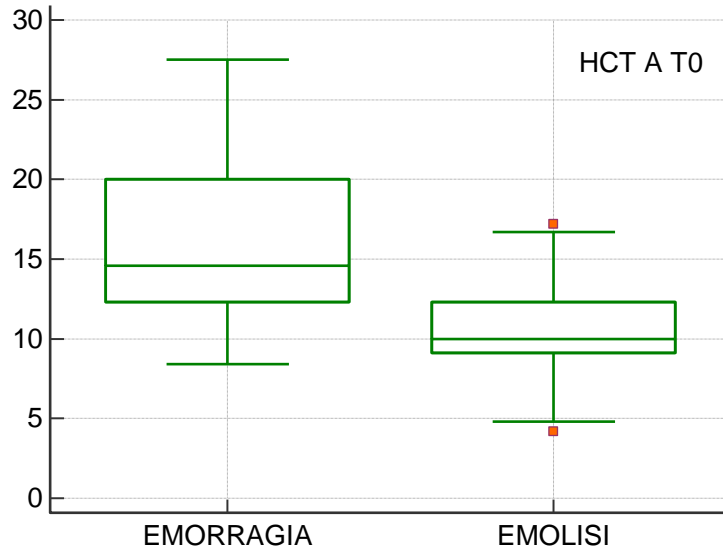


Grafico 19 – comparazione (Box and Whiskers plot) tra Hct pre-trasfusione dei soggetti con emorragia e di quelli con emolisi

Di seguito, è rappresentato l'andamento grafico dell'ematocrito in soggetti con emorragia e in soggetti con emolisi (Grafico 20, Grafico 21).

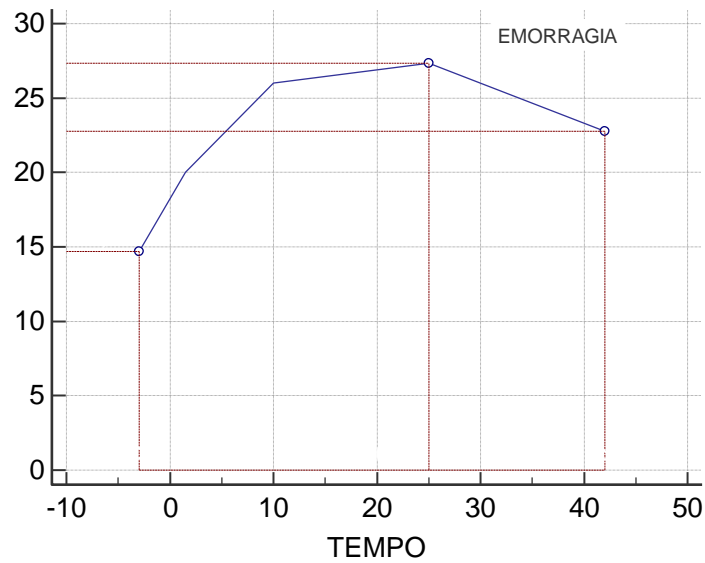


Grafico 20 – andamento Hct nei soggetti con emorragia

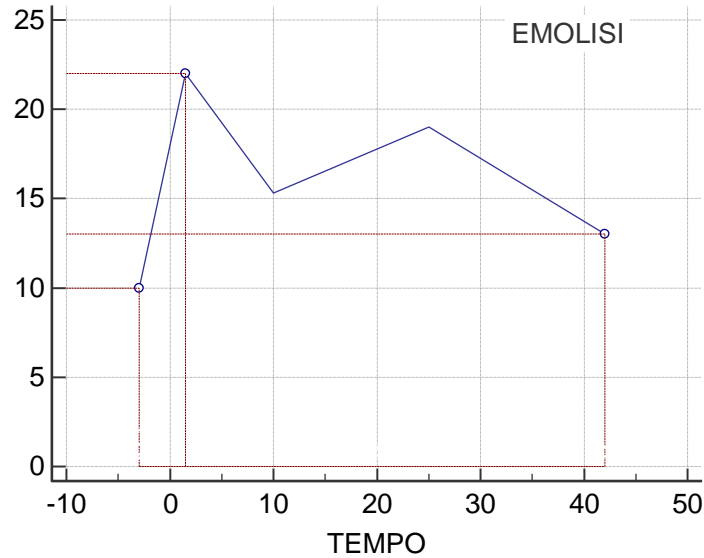


Grafico 21 – andamento Hct nei soggetti con emolisi

Nella Tabella 30 sono riportati i valori dell'incremento dell'ematocrito dei riceventi con emorragia e con emolisi, ed il risultato (valore P) del test di Mann Whitney per la comparazione dei due gruppi ad ogni intervallo di tempo.

T	causa	N°	Mediana (Min-Max)	P
T1	emolisi	6	11,5 (5-18)	0,051 (ns)
	emorragia	9	3,7 (-3,5-19)	
T2	emolisi	5*	3,3 (1-14)	1 (ns)
	emorragia	9	6 (-0,3-22,1)	
T3	emolisi	7	7,2 (1,3-11,5)	0,29 (ns)
	emorragia	8	13,65 (-1,3-24,9)	
T4	emolisi	5*	1,4 (1-9,4)	0,08 (ns)
	Emorragia	8*	4 (1,1-34)	

Tabella 30 – valori dell'incremento di Hct dei riceventi con emorragia e con emolisi
*distribuzione non normale

Di seguito i relativi box-plot (Grafico 22, Grafico 23, Grafico 24, Grafico 25).

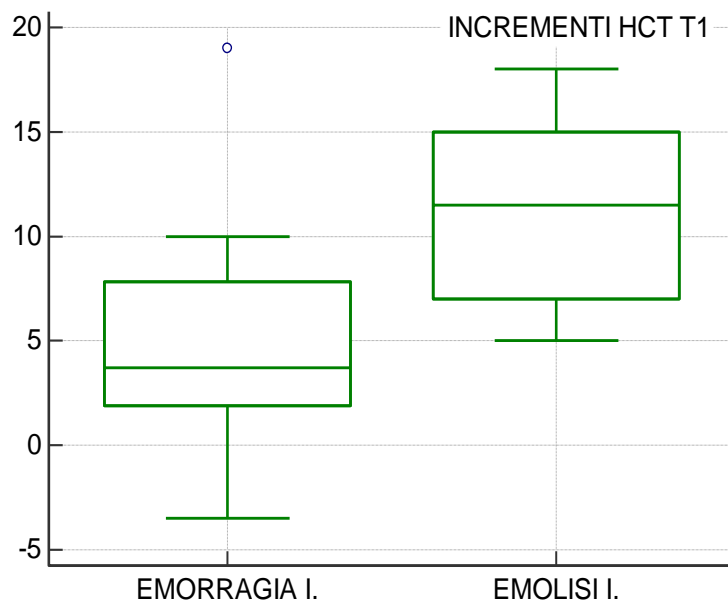


Grafico 22 – comparazione (Box and Whiskers plot) tra Hct a T1 dei soggetti con emorragia e di quelli con emolisi (I.= incremento)

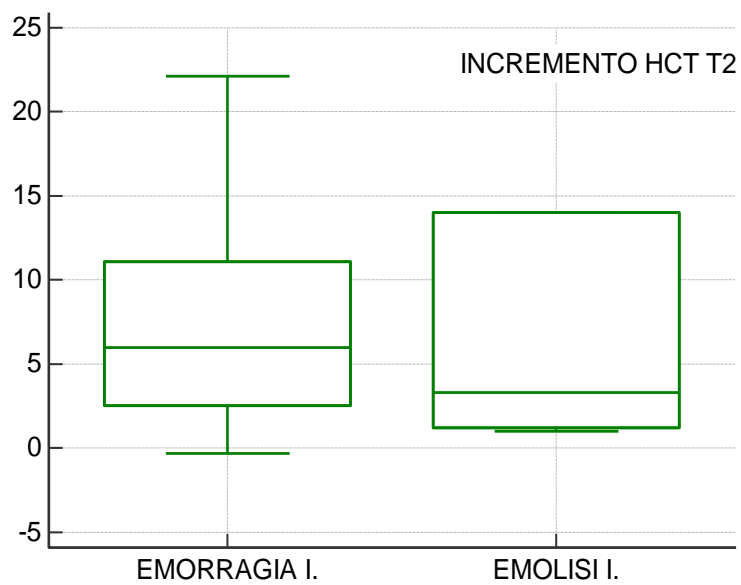


Grafico 23 – comparazione (Box and Whiskers plot) degli incrementi di Hct a T2 tra soggetti con emorragia e quelli con emolisi (I.= incremento)

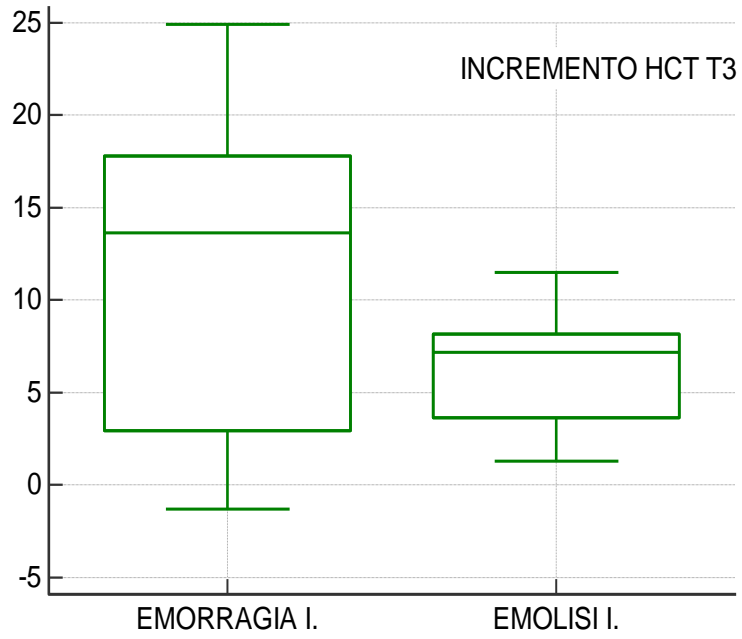


Grafico 24 – comparazione (Box and Whiskers plot) tra Hct a T3 dei soggetti con emorragia e di quelli con emolisi (I.= incremento)

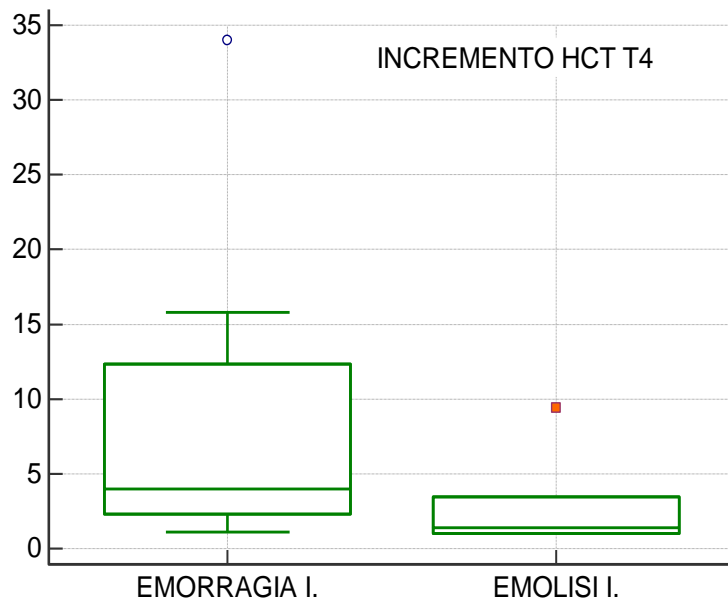


Grafico 25 – comparazione (Box and Whiskers plot) tra Hct a T4 dei soggetti con emorragia e di quelli con emolisi (I.= incremento)

11.7 Monitoraggio dei parametri vitali

La Tabella 31 riporta le mediane dei valori dei parametri misurati a T0, T1, T2 e T3 ed il risultato (valore P) della comparazione dei valori mediante Friedman test

Parametro	N°	T0	T1	T2	T3	P
FC	26	140	141	122	118	0,00003 (s)*
FR	26	38	34,5	30	32	0,65 (ns)
T°	24	38,15	38,15	38,1	38,05	0,22 (ns)

Tabella 31 – mediane dei valori di FC, FR e temperatura misurati a T0, T1, T2, T3 e il risultato (valore P) della comparazione mediante Friedman test

*i valori a T0 e T1 sono significativamente differenti rispetto a quelli a T2 e T3

Di seguito le rappresentazioni grafiche (box-plot) dei valori di FC, FR e temperatura a T0, T1, T2 e T3 (Grafico 26, Grafico 27, Grafico 28).

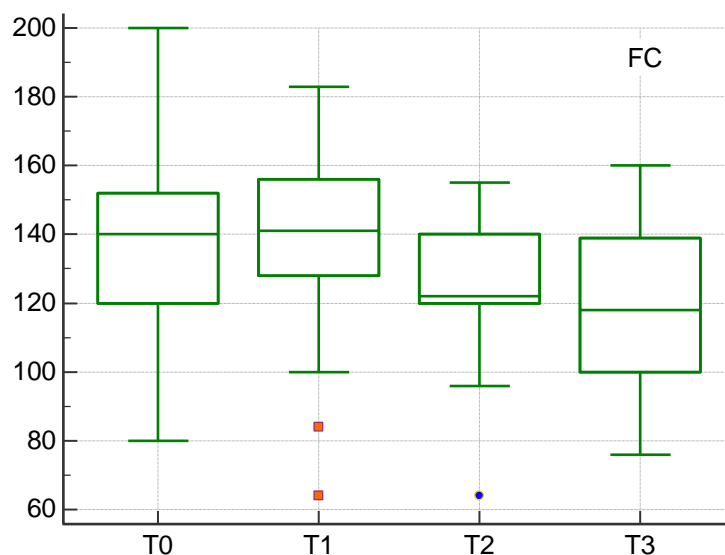


Grafico 26 – valori di FC a T0, T1, T2 T3 (Box and Whiskers plot)

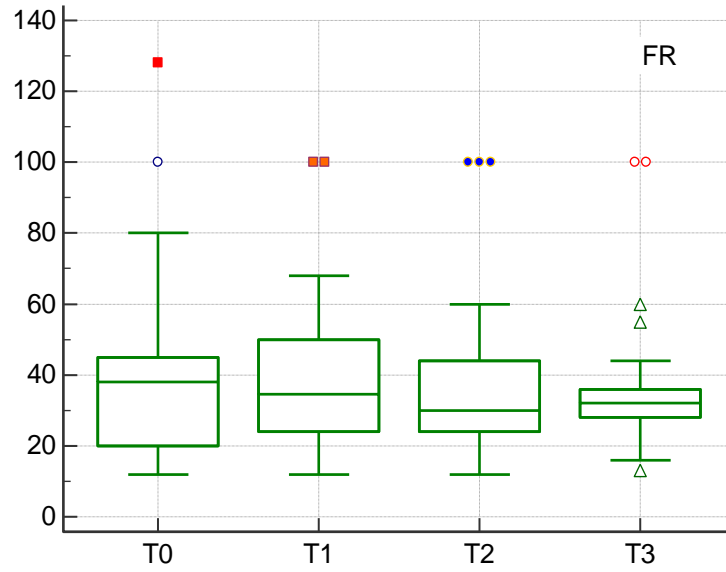


Grafico 27 – valori di FR a T0, T1, T2 T3 (Box and Whiskers plot)

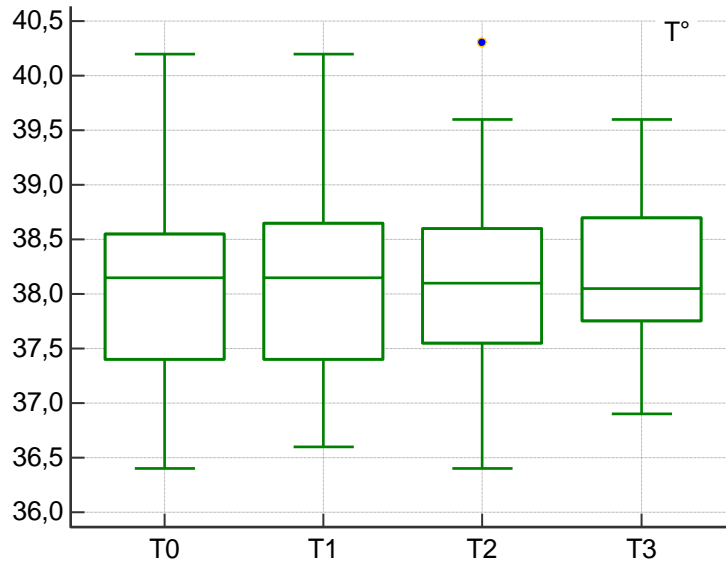


Grafico 28 – valori di Temperatura a T0, T1, T2 T3 (Box and Whiskers plot)

Gli andamenti dei parametri vitali nel tempo (minuti) sono rappresentati graficamente nei seguenti grafici (Grafico 29, Grafico 30, Grafico 31).

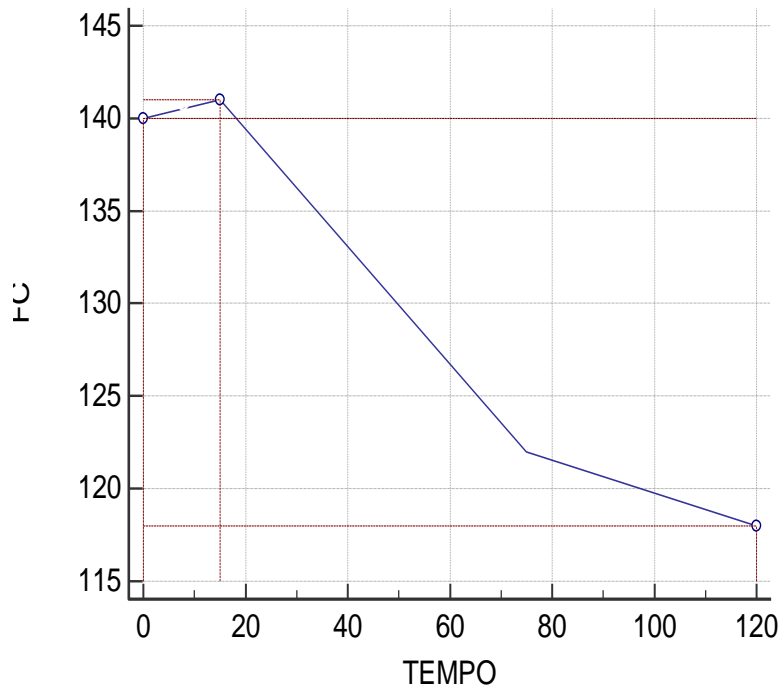


Grafico 29 –andamento della FC durante la trasfusione

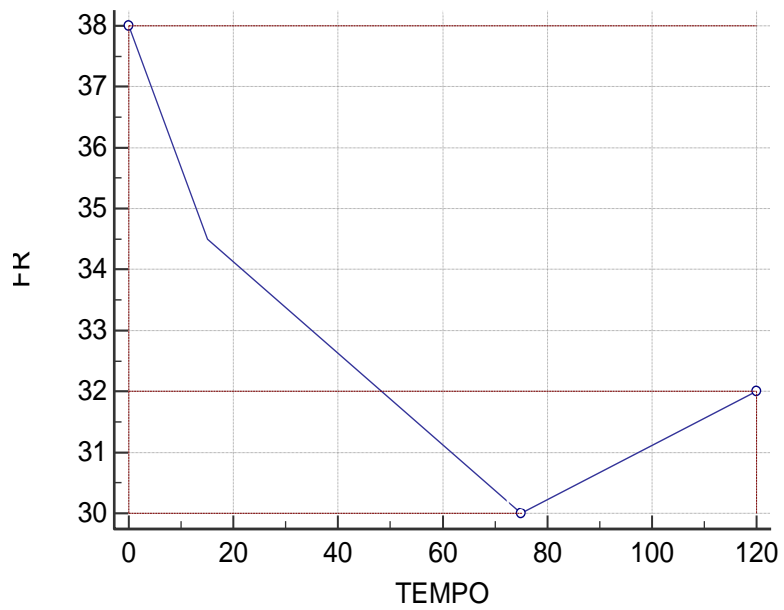


Grafico 30 – andamento della FR durante la trasfusione

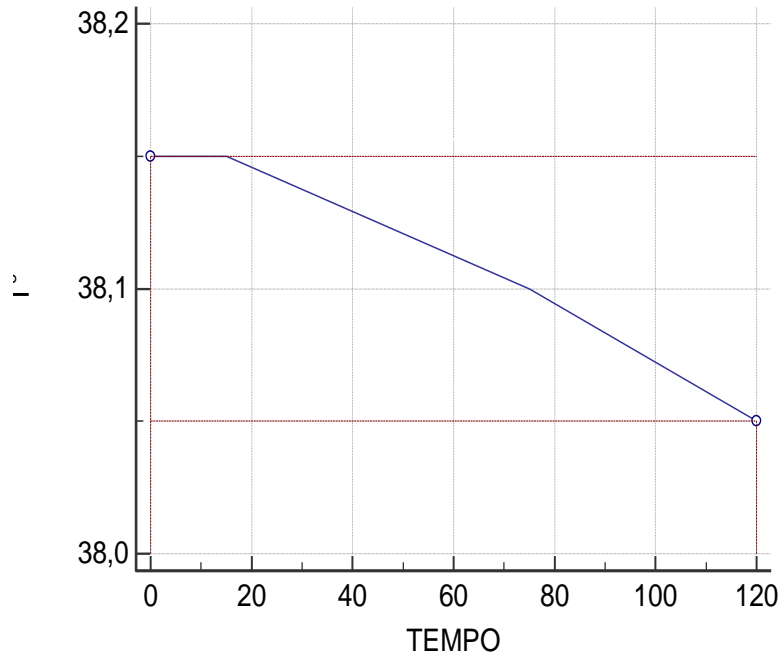


Grafico 31 – andamento della temperatura durante la trasfusione

11.8 Soggetti politrasfusi

Per quanto riguarda i soggetti politrasfusi, la Tabella 32 riporta il numero di trasfusioni ricevute da ogni soggetto, il motivo della trasfusione, l'ematocrito pre-trasfusione, il tempo intercorso tra 1° e 2° trasfusione, l'ematocrito precedente e successivo alla 2° trasfusione.

Sogg	N° trasfusioni	Motivo	Hct pre	Tempo tra 1° e 2° trasfusione	Hct pre 2°trasfusio ne	Hct post 2°trasfusio ne
1	3		13,1	14 gg	14,6	
2	2	Emolisi	17,2	20h	18,5	
3*	2	Anemia e ipoproteinemia	6,2	Circa 1 gg	10 *	13
4	2	Emorragia, coagulopatia	11,6	4 gg	10,2	
5	2	Emolisi, piastrinopenia, neoplasia polmonare	12	18h	7	
6	2	Emolisi, morso vipera	10	3gg	9,7	
7	2	Emorragia, coagulopatia, trombocitopenia e linfocitosi	18,6	1gg		
8	2	Emolisi	8	6gg	9,2	
9**	2		10,6	1 gg		
10 ***	2		6,8	4gg		
11	3	Epatite, ittero, ipoalbuminemia	11,8	21h	14,6	18
12	2	Shock emorragico	12,3	12h	12	
13*	2	CKD	14,4	18h		
14*	3	Shock, linfadenomegalia, splenomegalia	13,1	24h	16*	
15	2	Emolisi, tricitopenia	13,9	38h	11,4	
16	2		5,2	11 gg	11,8	21

Tabella 32 –numero di trasfusioni, motivi e valori di Hct nei soggetti politrasfusi

* soggetti trasfusi anche con plasma; **trasfuso con 2 SWB; ***trasfuso con SWB e PRBC

12 DISCUSSIONE

12.1 Donatori e prodotti trasfusionali

Come si può vedere in Tabella 10 le sacche di PRBC e SWB ottenute sono 303 (313 totali, delle quali 10 sono state eliminate), alcune delle quali sono state utilizzate presso altre strutture, altre sono state utilizzate all'interno dell'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato".

Tra le 147 trasfusioni documentate all'interno dell'Ospedale Didattico Veterinario, solamente in 75 casi si è potuto risalire al codice della sacca di PRBC/SWB trasfusa (vedi Tabella 13) e tra le 106 trasfusioni sottoposte ad analisi, soltanto in 59 casi si è potuto ottenere una corrispondenza tra donatore e ricevente attraverso il codice della sacca. Per migliorare la rintracciabilità delle sacche trasfuse e la corrispondenza donatore-ricevente, potrebbe essere utile prevedere un collegamento tra il database amministrativo e quello del Centro Trasfusionale; potrebbe essere utile anche dotare la sacca di un sistema di identificazione asportabile (per esempio, una piccola etichetta, in aggiunta all'etichetta già prevista), da apporre velocemente sulla scheda di monitoraggio/cartella clinica del paziente trasfuso, dato che la maggior parte delle trasfusioni vengono eseguite in regime di emergenza.

Analizzando i valori di ematocrito dei soggetti donatori del Centro Trasfusionale Veterinario del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa, risulta un valore mediano di 45,7% e una deviazione standard relativa bassa (10,7 %) (vedi Tabella 14).

12.2 Anemia e valori di ematocrito nei soggetti riceventi

Dall'analisi sui principali motivi di trasfusione emerge che la principale causa di anemia nei soggetti trasfusi è una perdita eritrocitaria acuta (53%); in particolar modo, nei soggetti presi in esame in questo studio, l'emorragia è causa abbastanza frequente (nel 36%) di trasfusione, come già constatato in altri studi e la perdita ematica intraoperatoria (durante la rimozione di tumori splenici e durante altre operazioni chirurgiche) ne costituisce la principale causa ⁴¹.

Il dato si potrebbe giustificare con il fatto che i soggetti con emorragia acuta presentano più frequentemente condizioni cliniche critiche, tali da giustificare la trasfusione in emergenza.

In linea generale, i soggetti con ematocrito inferiore al 20% sono candidati alla trasfusione, ma in caso di emorragia, la trasfusione è consigliata anche con valori di ematocrito superiori, perché i cani con una perdita acuta di sangue (>20% del volume totale di sangue circolante) non mostreranno un calo dell'ematocrito se non diverse ore dopo (quando l'ipovolemia sarà compensata da un richiamo intravascolare di fluidi) (Giger, 2015). La decisione di trasfondere, infatti, dipende anche dalla velocità di insorgenza dell'anemia e dai sintomi clinici; in caso di anemia ad insorgenza rapida, come nel caso dell'emorragia, la trasfusione è necessaria anche a livelli di ematocrito uguali o superiori al 20% (Gibson, 2007) (Hohenhaus, 2014) perché i meccanismi compensatori si instaurano dopo diversi giorni (Giger, 2015) (Hohenhaus, 2014).

Analizzando la gravità dell'anemia nei soggetti sottoposti a trasfusione, si nota una prevalenza dei soggetti con anemia gravissima (55%) e con anemia grave (35%). Anche in questo caso, c'è una maggiore necessità di trasfusione nei suddetti casi.

Nonostante non esista un valore soglia dell'ematocrito sotto il quale è necessario effettuare una trasfusione, sicuramente quando l'ematocrito è inferiore al 12%, la trasfusione può diventare una necessità in quanto c'è una diminuzione della capacità di ossigenazione tissutale e i principali sistemi organici non sono in grado di compensare il deficit eritrocitario ^{3029 25}.

La valutazione della rigenerazione delle anemie in base al numero assoluto di reticolociti o all'IR mostra che nell'87,5% dei casi la rigenerazione è assente o lieve. Apparentemente, questo dato è in contraddizione con la prevalenza di soggetti con anemia da perdita eritrocitaria acuta, che è notoriamente rigenerativa ¹⁶. In realtà, non è stato possibile mettere in correlazione il motivo della trasfusione con la rigenerazione dell'anemia, in quanto soltanto in alcuni soggetti è stato possibile avere entrambe le informazioni; inoltre, nella maggior parte dei casi l'esame emocromocitometrico è stato effettuato dopo poco tempo dalla perdita di sangue.

All'inizio, infatti, l'anemia da perdita acuta di sangue è normocitica normocromica e non rigenerativa; dopo qualche ora viene stimolata la produzione di eritropoietina e solamente dopo 3 giorni si nota rigenerazione nel sangue periferico ⁴²

12.3 Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione all'ematocrito iniziale

Per quanto riguarda la correlazione tra l'ematocrito iniziale e l'incremento dello stesso, a T1 e a T3 c'è una correlazione (statisticamente significativa) moderata e inversamente proporzionale: ciò

significa che, in questo studio, i soggetti con anemia più grave hanno un maggiore incremento di ematocrito subito dopo la trasfusione e a T3; la mancata correlazione dell'incremento a T2 potrebbe essere spiegata con un'eventuale emodiluizione.

Il PRBC viene somministrato dopo essere stato risospeso con NaCl 0,9% (per la sua eccessiva viscosità); inoltre, in questo studio, la maggior parte dei riceventi sono stati trasfusi durante il ricovero nell'Unità di Terapia Intensiva o durante un'operazione chirurgica e hanno ricevuto una fluidoterapia concomitante alla trasfusione (documentata nelle schede di monitoraggio nelle cartelle cliniche), quindi l'emodiluizione dopo qualche ora dalla trasfusione è fortemente probabile.

La mancata correlazione a T4 e T5 potrebbe dipendere da vari fattori tra i quali: un'ulteriore emodiluizione per la terapia fluidica o la patologia sottostante (emorragia o anemia emolitica immunomediata) che potrebbe aver condotto ad una perdita eritrocitaria.

Per una valutazione più precisa, sarebbe stato opportuno confrontare l'incremento di ematocrito con il motivo della trasfusione ed eventualmente con la misurazione delle proteine totali e della disidratazione, per essere sicuri di non sovrastimare o sottostimare l'ematocrito. I limiti di questo studio consistono nella non concomitante presenza di tutte le informazioni per ogni soggetto, necessarie per una valutazione clinica completa.

La stessa considerazione può essere fatta per il rilievo di valori negativi tra gli incrementi dell'ematocrito (vedi Tabella 22), che indicano valori di Hct post-trasfusione minori dell'Hct iniziale: anche in questo caso, questo dato si potrebbe ricondurre alla patologia sottostante o all'emodiluizione, fattori che non è stato possibile escludere, data la mancanza di dati sufficienti.

Dalle mediane dei valori di Hct e dall'andamento grafico dell'ematocrito, si può notare:

1. Nei cani con anemia gravissima (Grafico 9): un rapido incremento di Hct nelle due ore dopo la trasfusione (il valore mediano aumenta di circa 9 punti percentuali), una leggera diminuzione (di circa 1 punto percentuale) e una stabilizzazione del valore fino a 25h dopo; da 25h a 42 h dopo la trasfusione, si nota un rapido decremento fino a valori prossimi a quelli pre-trasfusione, seguito da un rialzo fino ad un valore mediano di 19,1% fino a circa 55h dopo.
2. nei cani con anemia grave (Grafico 10): un rapido incremento dell'Hct subito dopo la trasfusione (di circa 7 punti percentuali), che si mantiene più o meno stabile, tranne un leggero decremento (di circa 1,5 punti percentuali) 20-25h dopo la trasfusione
3. Nei cani con anemia moderata (Grafico 11), si ha un leggero decremento (di circa 3 punti percentuali) dell'Hct subito dopo la trasfusione; l'aumento massimo (di circa il 7 punti percentuali) si ha dopo circa 10h, seguito da un progressivo decremento, fino a valori prossimi all'ematocrito pre-trasfusione

In quest'ultimo caso è stato preso in esame un numero ridotto di soggetti (8), la metà dei quali con emorragia acuta al momento della trasfusione, quindi con ematocrito sovrastimato al momento della trasfusione, che tenderà a diminuire in qualche ora ²⁹

Anche in questo caso, la limitazione dello studio consiste nella mancata concomitante valutazione dei motivi della trasfusione e, nel caso dei cani con anemia moderata, dal numero ridotto di soggetti.

Le comparazioni tra incrementi di ematocrito in soggetti con anemia gravissima, grave e moderata sono risultati statisticamente non significativi (vedi Tabella 25). Dai valori delle mediane degli incrementi e dai Boxer and Whiskers plot (Grafico 12, Grafico 13, Grafico 14, Grafico 15) si nota un incremento superiore di Hct nei soggetti con anemia gravissima, soprattutto se confrontati con i soggetti con anemia moderata, tranne a T4 (35-50h dopo la trasfusione).

L'analisi dei valori mediani degli incrementi di Hct riflette quanto già detto riguardo l'andamento dell'ematocrito.

12.4 Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione alle caratteristiche del prodotto trasfuso

L'incremento di ematocrito dopo la trasfusione, oltre che dalla patologia in atto, è influenzato anche dalla quantità di prodotto trasfuso, in relazione al peso del ricevente.

In questo studio, la correlazione tra aumento di Hct e volume trasfuso non ha prodotto risultati significativi; il risultato di questo test potrebbe dipendere dal ridotto numero di soggetti per ogni gruppo (vedi Tabella 26).

Nei 32 casi in cui è stato possibile risalire al volume (ml/kg) di prodotto trasfusionale somministrato, il volume non è, in nessun caso, inferiore a 6ml/kg. Anche in questo caso, non è stato possibile tenere in considerazione la patologia in atto del ricevente, che influenza l'aumento di ematocrito, in quanto presenti pochissimi soggetti con informazioni sufficienti.

La correlazione tra l'età della sacca e l'incremento di Hct del ricevente a T3 e T4 ha prodotto risultati statisticamente significativi, mostrando una correlazione rispettivamente moderata e forte; in entrambi i casi l'incremento di Hct è inversamente proporzionale all'età della sacca trasfusa. Le modificazioni delle caratteristiche del prodotto trasfusionale durante lo stoccaggio sono note: la diminuzione dei livelli di ATP si ripercuote negativamente sulla deformabilità della membrana eritrocitaria²⁴, aumentando il rischio di lisi con conseguente diminuzione dell'emivita delle emazie trasfuse. Le "storage lesion" del prodotto trasfusionale potrebbero influenzare l'aumento di ematocrito nel ricevente, giustificando i risultati del test; anche in questo caso, l'influenza dell'età della sacca sull'incremento di Hct del ricevente è stato analizzato senza prendere in considerazione gli altri fattori che influenzano l'Hct del ricevente, per la mancanza di informazioni sufficienti.

12.5 Incremento di ematocrito nei riceventi in relazione alla causa di anemia

La relazione tra Hct pre-trasfusione dei soggetti con anemia acuta e di quelli con anemia cronica è risultata statisticamente non significativa; i valori mediani dell'ematocrito sono molto simili (vedi Tabella 28) ma il valore massimo di Hct dei soggetti con anemia acuta è superiore di 7 punti percentuali rispetto al valore di Hct più alto nella popolazione con anemia cronica; dal Grafico 18 si può notare che la distribuzione dei valori nei soggetti con anemia cronica ha una dispersione minore, con asimmetria negativa (distanza tra mediana e primo quartile superiore alla distanza tra mediana e terzo quartile). Come già detto, in caso di anemia acuta, la trasfusione diventa necessaria anche a livelli di Hct > 20%²⁹.

La comparazione dell'ematocrito pre-trasfusione dei riceventi con emorragia e con emolisi risulta statisticamente significativo (vedi Tabella 29).

In questo studio, nella maggior parte dei soggetti con emolisi l'anemia è gravissima (valore mediano dell'ematocrito= 10), con una dispersione della distribuzione dei valori minore (vedi Grafico 19: distanza interquartilica minore) rispetto ai valori di Hct dei soggetti con emorragia.

Dal Grafico 19 la distribuzione dei valori di Hct pre-trasfusione dei soggetti con emorragia risulta con una maggiore dispersione e con asimmetria positiva con un valore mediano di 14,6%.

Il grafico che rappresenta l'andamento dell'Hct:

1. nei riceventi con emorragia evidenzia un progressivo aumento dell'ematocrito dall'inizio della trasfusione fino a 10h dopo, quando il valore mediano aumenta di 12 punti percentili; dalle 10 alle 25h c'è un incremento minimo e dopo le 25h si osserva un progressivo decremento (Grafico 20).
2. nei riceventi con emolisi mostra un andamento meno progressivo: un rapido aumento subito dopo la trasfusione (di 12 punti percentili) è seguito da un brusco decremento (di 7 punti percentili) a 10h; seguono un ulteriore incremento dalle 10 alle 25h dopo la trasfusione e un decremento dopo le 25h (Grafico 21).

L'andamento dell'ematocrito dei soggetti con emolisi può essere giustificato dal contemporaneo processo emolitico in corso, che tende ad annullare i benefici della trasfusione.

Si deve tener presente che l'andamento dell'ematocrito post-trasfusione può essere influenzato anche dalla contemporanea fluidoterapia; inoltre per tracciare graficamente l'andamento dell'Hct si è fatto ricorso alle mediane delle misurazioni dell'Hct nei diversi intervalli di tempo: come già detto, le misurazioni dell'Hct post-trasfusione dei soggetti presi in esame non sono regolari e risultano in numero ridotto rispetto alle misurazione di Hct pre-trasfusione (come evidente in Tabella 29).

La comparazione degli incrementi di Hct tra soggetti con emorragia e con emolisi non sono risultate statisticamente significative; tuttavia, dalla Tabella 30 e dal Box plot (Grafico 22) si nota un incremento maggiore nelle prime ore dopo la trasfusione nei cani con emolisi ; questo può essere spiegato sia dalla maggiore gravità dell'anemia nei soggetti con emolisi, sia dal fatto che i soggetti con emorragia acuta mostrano una maggiore diminuzione dell'ematocrito soltanto diverse ore dopo la perdita acuta di sangue, o dopo fluidoterapia ²⁹

Nelle altre fasce di tempo, invece, risulta maggiore l'incremento di Hct nei soggetti con emorragia (Grafico 23, Grafico 24, Grafico 25).

12.6 Monitoraggio dei parametri vitali

Per quanto riguarda i parametri vitali, si può evincere che quasi tutti i soggetti ad inizio trasfusione presentano un aumento della frequenza cardiaca e respiratoria rispetto ai range di normalità; in corso di anemia, infatti, per compensare la ridotta ossigenazione tissutale, si instaura tachicardia (per aumentare la gittata cardiaca) e tachipnea ⁴⁰

Come si osserva nella Tabella 31 e dai grafici che rappresentano l'andamento temporale di FC e FR (Grafico 29, Grafico 30), si assiste ad una diminuzione evidente di questi parametri in corso di trasfusione per il miglioramento della perfusione e dell'ossigenazione tissutale. La temperatura non subisce variazioni evidenti, se non una lieve diminuzione, probabilmente dovuta alla temperatura del prodotto trasfuso.

In particolar modo dai confronti delle misurazioni nel tempo (tramite Friedman test, vedi Tabella 31) di ogni parametro vitale, la differenza tra le misurazioni della FC è risultata statisticamente significativa, in particolar modo le misurazioni ad inizio trasfusione e dopo 15 minuti risultano statisticamente differenti rispetto alle misurazioni effettuate a metà e a $\frac{3}{4}$ della trasfusione.

La frequenza cardiaca è, dunque, il parametro che varia maggiormente durante la trasfusione.

La tachicardia è uno dei primi meccanismi di compensazione ad instaurarsi in corso di anemia, in risposta sia all'ipoperfusione da ipovolemia (in caso di emorragia), ma soprattutto in risposta alla scarsa ossigenazione tissutale; durante la trasfusione, l'apporto di emazie contribuisce a migliorare l'ossigenazione tissutale e la FC tende a tornare a valori fisiologici.

12.7 Soggetti politrasfusi

Per quanto riguarda i soggetti politrasfusi, il tempo medio tra 1° e 2° trasfusione nella maggior parte dei soggetti (in 10 cani) è di circa 23h; in 4 casi di 4 giorni; in due casi è >10giorni.

La necessità di una seconda trasfusione è data da un incremento insufficiente dell'ematocrito ed dal persistere dell'anemia: il valore dell'ematocrito precedente alla 2° trasfusione era presente in 12 casi e il valore mediano è 11,6 (vedi Tabella 32)

Il motivo della trasfusione è specificato in 12 casi ed è riconducibile, nella maggior parte dei casi a perdita acuta (5 casi di anemia emolitica e 3 casi di emorragia); tranne che in due casi, i soggetti con anemia emolitica o emorragica hanno avuto necessità di un'altra trasfusione entro le 24h successive.

13 CONCLUSIONI

Riassumendo i risultati descritti in questa tesi hanno evidenziato che:

1. La principale causa di anemia nei soggetti riceventi analizzati è una perdita eritrocitaria acuta (53%), causata più frequentemente da emorragia (36% dei casi)
2. Tra i cani riceventi si nota una prevalenza dei soggetti con anemia gravissima (55%) e grave (35%)
3. Nell'87,5% dei casi l'anemia ha rigenerazione assente o lieve
4. I cani con anemia più grave hanno avuto un incremento maggiore di ematocrito, in particolar modo subito dopo la trasfusione e da 16 a 34 ore (T3) dopo la trasfusione
5. L'incremento di Hct dalle 16 alle 50h (T3 e T4) dopo la trasfusione è inversamente proporzionale all'età della sacca trasfusa
6. La maggior parte dei soggetti presentavano valori di FC e FR aumentati prima della trasfusione, ma entrambi i parametri diminuiscono evidentemente durante la trasfusione
7. La diminuzione della FC in corso di trasfusione è statisticamente significativa: i valori a inizio trasfusione e dopo 15 minuti differiscono significativamente dai valori misurati a metà e a $\frac{3}{4}$ della trasfusione
8. Tra i soggetti che hanno avuto bisogno di un'ulteriore trasfusione, la maggior parte è rappresentata da cani con anemia da emolisi e da emorragia, che, tranne in 2 casi, ha avuto necessità di un'altra trasfusione entro 24h dalla prima.

Questo lavoro ha messo in evidenza l'importanza di un protocollo di misurazione dei parametri ematici e vitali dopo la trasfusione. Dall'analisi dei valori di Hct post-trasfusione, è emerso che i tempi di misurazione sono diversi in ogni soggetto e sarebbe quindi auspicabile misurare l'ematocrito post-trasfusione in tempi standard per avere dal punto di vista clinico dei dati comparabili.

È importante monitorare i parametri vitali con maggiore frequenza all'inizio della trasfusione (al fine di svelare precocemente eventuali reazioni trasfusionali)^{2 16} e uniformare i tempi di misurazione degli stessi. Nonostante sia mancata un'uniformità nei tempi di misurazione, è stato comunque possibile evidenziare un miglioramento dei parametri vitali in seguito a trasfusione.

Purtroppo non è stato possibile analizzare tutti i dati contestualmente, ma comunque sarebbe interessante approfondire con ulteriori studi l'influenza delle singole variabili sull'incremento dell'ematocrito, escludendo altri possibili fattori; ciò sarà possibile avendo a disposizione, per ogni soggetto, informazioni circa: il motivo della trasfusione, eventuali patologie in atto, lo stato di idratazione, la quantità di prodotto trasfuso, i parametri ematici e vitali misurati prima, durante e dopo la trasfusione a tempi standard.

14 BIBLIOGRAFIA

1. G.U. n.25. Linea guida relativa all'esercizio delle attività sanitarie riguardanti la medicina trasfusionale in campo veterinario. (2016).
2. Carli, E. *trasfusione sanguigna nella pratica veterinaria. manuale di ematologia veterinaria e medicina trasfusionale* (edizioni veterinarie, 2013).
3. Acierno, M. M., Raj, K. & Giger, U. DEA 1 expression on dog erythrocytes analyzed by immunochromatographic and flow cytometric techniques. *J. Vet. Intern. Med.* **28**, 592–8 (2014).
4. Blais, M.-C., Berman, L., Oakley, D. A. & Giger, U. Canine Dal blood type: A red cell antigen lacking in some Dalmatians. *J. Vet. Intern. Med.* **21**, 281–6 (2007).
5. Giger, Urs Acierno, M. Euler, C. Kim, Hee Y. Lee, Jaeho Mizukami, Keiji Polak, Klaudia Raj, K. Blood Typing and Blood Compatibility Testing in Dogs. in *ACVIM FORUM* (2016).
6. Mesa-Sanchez, I., Ruiz de Gopegui-Fernández, R., Granados-Machuca, M. M. & Galan-Rodriguez, A. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in galgos (Spanish greyhounds). *Vet. Rec.* **174**, 351 (2014).
7. Spada, E. *et al.* Prevalence of dog erythrocyte antigens 1, 4, and 7 in galgos (Spanish Greyhounds). *J. Vet. Diagn. Invest.* **27**, 558–61 (2015).
8. Riond, B., Schuler, E., Rogg, E., Hofmann-Lehmann, R. & Lutz, H. Prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in dogs in Switzerland evaluated with the gel column technique. *Schweizer Arch. für Tierheilkd.* **153**, 369–74 (2011).
9. Iazbik, M. C. *et al.* Prevalence of dog erythrocyte antigens in retired racing Greyhounds. *Vet. Clin. Pathol.* **39**, 433–5 (2010).
10. van der Merwe, L. L., Jacobson, L. S. & Pretorius, G. J. The breed prevalence of dog erythrocyte antigen 1.1 in the Onderstepoort area of South Africa and its significance in selection of canine blood donors. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **73**, 53–6 (2002).
11. Ferreira, R. R. F., Gopegui, R. R. & Matos, A. J. F. Frequency of dog erythrocyte antigen 1.1 expression in dogs from Portugal. *Vet. Clin. Pathol.* **40**, 198–201 (2011).
12. Bagnagatti De Giorgi, G. *et al.* suitability of four dog breeds as canine blood donors in four university blood banks. in *Atti SISVet LXVII* 167 (2013).
13. Spada, E. *et al.* Prevalence of Dog Erythrocyte Antigens 4 and 7 in Italian Canine Blood Donors Using Gel Agglutination Technique. in *ECVIM-CA Congress 188* (ECVIM-CA, 2015). at <<https://arpi.unipi.it/handle/11568/764685>>
14. Carli E., Capello K., Carminato A. , Furlanello T., Antognoni M.T. , Miglio A., Proverbio D. , Spada E., Stefani A., V. M. Frequenza dell'espressione dell'antigene eritrocitario DEA 1 nel cane. in *Atti Congresso Internazionale Scivac* (2015).
15. Melzer, K. J., Wardrop, K. J., Hale, A. S. & Wong, V. M. A Hemolytic Transfusion Reaction due to DEA 4 Alloantibodies in a Dog. *J. Vet. Intern. Med.* **17**, 931–933 (2003).
16. Lubas, G. *Appunti di ematologia clinica veterinaria.* (2011).
17. Diagnostici per cani - RapidVet H DEA 1.1 Cane - Istruzioni per l'uso. at <http://www.agrolabo.it/IT/index.php?page=articolo&menu=100&ID=1129&ID_prod=93&om=>
18. Kessler, R. J. *et al.* Dog erythrocyte antigens 1.1, 1.2, 3, 4, 7, and Dal blood typing and cross-matching by gel column technique. *Vet. Clin. Pathol.* **39**, 306–16 (2010).
19. Seth, M., Jackson, K. V, Winzelberg, S. & Giger, U. Comparison of gel column, card, and cartridge techniques for dog erythrocyte antigen 1.1 blood typing. *Am. J. Vet. Res.* **73**, 213–9 (2012).
20. Blois, S. L., Richardson, D. M. & Abrams-Ogg, A. C. G. Comparison of a gel column blood

- typing method and a point-of-care cartridge for dog erythrocyte antigen 1.1. *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*. **23**, 340–3 (2013).
21. Wardrop, K. J. in *Handbook of Small Animal Practice* 18–86 (Elsevier Inc., 2007). doi:10.1016/B978-0-323-07307-3.10082-5
 22. Abrams-Ogg, A. in *Ematologia e medicina trasfusionale del cane e del gatto* (ed. UTET) (2004).
 23. Wardrop, K. J. *et al.* Update on Canine and Feline Blood Donor Screening for Blood-Borne Pathogens. *J. Vet. Intern. Med.* **30**, 15–35 (2016).
 24. Kisielewicz, C. & Self, I. A. Canine and feline blood transfusions: controversies and recent advances in administration practices. *Vet. Anaesth. Analg.* **41**, 233–42 (2014).
 25. Hohenhaus, A. E. in *Clinica medica veterinaria. Malattie del cane e del gatto* 477–482 (2014).
 26. Abrams-Ogg, Anthony C G Schneider, A. in *Schalm's veterinary hematology* (ed. Weiss, Douglas J. Wardrop, K. J.) 731–737 (2010).
 27. Walton, J. E. *et al.* Coagulation factor and hemostatic protein content of canine plasma after storage of whole blood at ambient temperature. *J. Vet. Intern. Med.* **28**, 571–575 (2014).
 28. Urban, R., Guillermo Couto, C. & Iazbik, M. C. Evaluation of hemostatic activity of canine frozen plasma for transfusion by thromboelastography. *J. Vet. Intern. Med.* **27**, 964–9 (2013).
 29. Giger, U. in *Small animal critical care medicine* (Elsevier, 2015).
 30. Gibson, G. in *BSAVA manual of canine and feline emergency and critical care* (2007).
 31. Lubas, G. *et al.* Guida pratica alla trasfusione degli emocomponenti nel cane. (2016).
 32. Brooks, M. B. in *Schalm's veterinary hematology* (ed. Wardrop, K. Jane Weiss, D. J.) 744–750 (2010).
 33. Snow, S. J., Ari Jutkowitz, L. & Brown, A. J. Trends in plasma transfusion at a veterinary teaching hospital: 308 patients (1996-1998 and 2006-2008). *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*. **20**, 441–5 (2010).
 34. Bragg, R. F. *et al.* Clinical evaluation of a single dose of immune plasma for treatment of canine parvovirus infection. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **240**, 700–4 (2012).
 35. Weatherton, L. K. & Streeter, E. M. Evaluation of fresh frozen plasma administration in dogs with pancreatitis: 77 cases (1995-2005). *J. Vet. Emerg. Crit. Care (San Antonio)*. **19**, 617–22 (2009).
 36. Davidow, B. Transfusion medicine in small animals. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* **43**, 735–56 (2013).
 37. Vlaar, A. P. J. & Juffermans, N. P. Transfusion-related acute lung injury: a clinical review. *Lancet (London, England)* **382**, 984–94 (2013).
 38. McMichael, M. in *Small animal critical care medicine* (2015).
 39. Villiers, E. in *Gli esami di laboratorio* 26–36 (2006).
 40. Bizzeti, M. *Semiotica medica veterinaria*. (Il Campano, 2012).
 41. Callan, M. B., Oakley, D. A., Shofer, F. S. & Giger, U. Canine red blood cell transfusion practice. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* **32**, 303–311 (1996).
 42. Giger, U. in *Clinica medica veterinaria. Malattie del cane e del gatto* 1930–1951 (2014).