

10. AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA DOS EQUINOS PRODUTORES DE SOROS HIPERIMUNES ANTIBOTRÓPICO DA FAZENDA VITAL BRAZIL.

SOBRINHO, A. P.; MEIRELLES, L. G.; DACASA, J. A. L.; CUNHA, L. E. R.; TAKEUTI, V. Y.; PARREIRAS, L. P.; MPALANTINOS, M. A.; CASTANHEIRA, P. N.

Resumo. O processo de produção de plasma hiperimune no Instituto Vital Brazil seguiu um calendário próprio, tendo como objetivo o monitoramento dos equínos para a avaliação do da saúde dos animais. O estudo foi baseado na realização de hemogramas periódicos, em vinte nove cavalos imunizados e seis cavalos não imunizados. Foram colhidas amostras antes da inoculação, das sangrias de produção e após as reinfusões das hemácias, totalizando em 350 amostras. Variações pouco significativas foram observadas nas análises de leucograma e eritrograma no grupo experimental quando comparados ao grupo controle. Após o período de repouso foi observada uma recuperação dos valores hematológicos (96,4% dos hematócritos e 98,7% dos eritrócitos), o que facilitou o rápido retorno para normalidade hematológica dos animais. Desta forma foi evidenciada que plano de imunização utilizado pela Fazenda Vital Brazil torna os equínos aptos para um novo ciclo de produção de plasma.

Palavras-chaves: Hemograma, *Bothrops*, plasmaferese e cavalos.

Introdução. No Brasil são registrados cerca de 28 mil casos de acidentes ofídicos por ano, a maior parte é causada pelo gênero *Bothrops* (~ 90%) com uma letalidade cerca de 0,4% dos casos tratados. Os soros antiofídicos são adquiridos pelo Ministério da Saúde e disponibilizados gratuitamente no Sistema Único de Saúde. Quatro laboratórios produzem o soro antibotrópico: o Instituto Butantan (SP), Instituto Vital Brazil – IVB (RJ), Fundação Ezequiel Dias (MG), Centro de Produção e Pesquisa de Imunobiológicos (PR), com venenos provenientes das cinco espécies do gênero: *Bothrops jararaca* – 50%, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. neuwiedi* – 12,5% (1). A produção do soro antibotrópico utilizando equínos inicia-se com a extração do veneno das serpentes e preparação do antígeno para inoculação nesses animais. O trabalho teve como objetivo a avaliação das alterações hematológicas dos equínos submetidos ao protocolo próprio de imunização antibotrópico. O monitoramento da recuperação dos animais após os ciclos de inoculação, sangria e plasmaferese foi importante para avaliar o protocolo usado pelo IVB na produção do plasma hiperimune.

Materiais e Métodos. Para o estudo foram utilizados trinta e cinco equínos mestiços entre machos e fêmeas com idade de 6 a 15 anos, clinicamente sadios. Foram utilizados vinte e nove equínos imunizados no grupo experimental e seis equínos no grupo controle não imunizados. Todos os animais são do plantel da Fazenda Vital Brazil. O período de avaliação dos equínos por hemograma foi acompanhado durante quatro meses e compreendeu o período de inoculação, sangria e plasmaferese, totalizando 350 amostras do grupo experimental, em dois ciclos. As amostras foram coletadas segundo o protocolo de imunização do Instituto Vital Brazil (Quadro 1), que consiste de um período de inoculação com quatro aplicações do antígeno. Ao final das inoculações foi realizado o tubo prova para avaliação do título de anticorpos. A etapa seguinte consiste no período de sangria (quatro sangrias com a respectiva reinfusão das hemácias). A avaliação dos resultados foi obtida segundo o calendário de imunização e sangria apresentado no quadro abaixo.

Quadro 1 – Calendário de imunização e sangria dos equínos produtores de plasma antibotrópico.

Calendário de imunização e sangria	1º Período	2º Período
Imunização	18/01 a 28/01/2011	21/03 a 25/03/2011
Sangria	02/02 a 08/02/2011	30/03 a 06/04/2011
Descanso	09/02 a 14/03/2011	07/04 a 09/05/2011

Para a realização do hemograma foram coletadas amostras de sangue, com um volume de 4,5 mL de cada animal, sempre no período da manhã e pela punção da veia jugular externa usando uma seringa descartável de 10 mL, com agulha de 40 x 12 descartável e tubos com anticoagulante (tubo BD Vacutainer estéril com K₂ Etilenodiamino tetracético – EDTA 7,2 mg). As amostras foram processadas no equipamento Analisador Hematológico Automatizado Poch-100iV Diff (Veterinário). Foram avaliados os parâmetros: Leucócitos, eritrócitos, hematócrito e % de células leucocitárias (neutrófilos, monócitos e basófilos). O cálculo dos valores da média aritmética, do desvio-padrão e a variação dos resultados obtidos para os parâmetros hematológicos avaliados nesta pesquisa foram determinados pelo método descrito no SAS/STAT® 9.2 User's Guide Introduction to Clustering Procedures (3).

Resultados e discussão: O hemograma é uma ferramenta muito importante na clínica veterinária, na avaliação e no monitoramento da saúde do animal. Os valores fisiológicos de referência são influenciados pelo ambiente, a espécie, a raça e a idade do animal (4). Duas partes são utilizadas para a avaliação: o leucograma e o eritrograma. O leucograma tem como função avaliar a resposta do hospedeiro frente aos estímulos antigênicos provocados, seja por infecções microbianas ou por um agente externo (inoculação do veneno); e o eritrograma que compreende o número total de hemácias, a concentração de hemoglobina, volume globular e as proteínas plasmáticas (5). A primeira etapa estudada foi o leucograma. Estas células estão relacionadas com a defesa orgânica dos equínos, e quando estimuladas por intermédio da utilização do pool de veneno botrópico, desenvolvem uma resposta humoral. A análise do gráfico 1 do leucograma dos equínos do grupo experimental demonstrou uma pequena leucocitose (valor médio $11,9 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 1,03$) quando comparado ao grupo controle (valor médio $9,7 \times 10^3/\mu\text{L} \pm 0,41$). O gráfico 2 apresentou uma variação pouco significativa no aumento de neutrófilos, basófilos e monócitos do total de leucócitos (valor médio 73,4 % $\pm 3,6$) em relação ao grupo controle (63,2 % $\pm 2,0$). Os dados do gráfico 1 e 2 comprovaram uma variação dos valores das células leucocitárias, durante o protocolo de inoculação dos animais do grupo experimental, fato que deve estar relacionado ao estímulo antigênico, porém esta variação não foi significativa ao serem correlacionados com os valores do grupo controle.

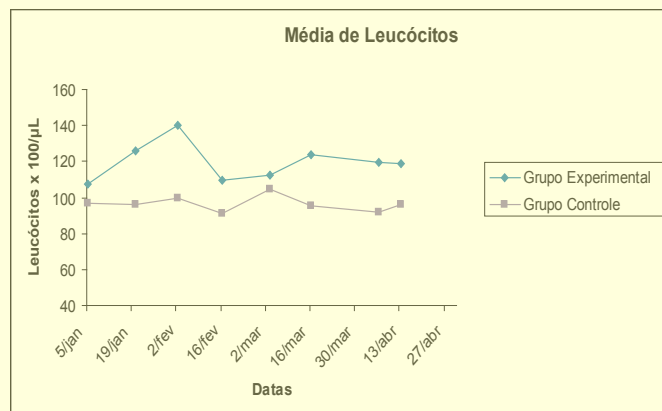


Gráfico 1 – Média dos leucócitos

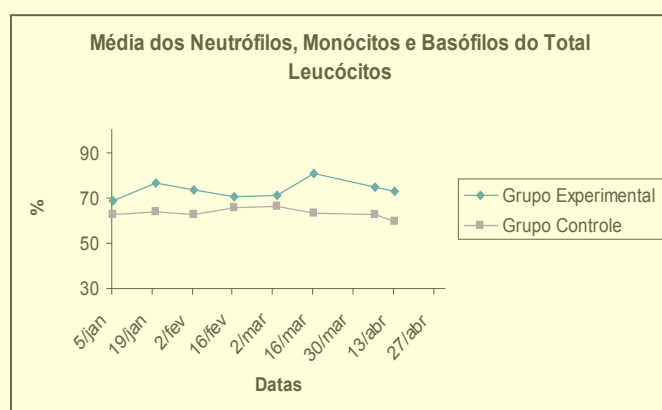


Gráfico 2 – Média dos neutrófilos e outros

As médias dos leucócitos do grupo experimental e do grupo controle se apresentaram dentro dos parâmetros normais dos valores de referência encontrados na literatura para leucócitos (valor 60 -120 x 100/μL), segundo García-Navarro e Pachaly (6).

A segunda etapa de avaliação do hemograma consistiu na análise dos dados do eritrograma, devido à importância do acompanhamento do hematócrito e dos eritrócitos, uma vez que, os animais são submetidos a sangrias periódicas para a produção de plasma hiperimune. As anemias que ocorrem durante as manipulações com o decréscimo do número de eritrócitos e conseqüentemente do hematócrito, pode ocorrer não somente pela perda dos eritrócitos, mas também de plasma altamente protéico, segundo Feldman et al. (7). A reinfusão de hemácias auxilia na recuperação hematológica e no retorno do animal ao seu estado fisiológico normal. Existe a possibilidade dos animais não se recuperarem devido ao acometimento destas anemias sem resposta medular isso pode ocorrer, tanto pela interferência indireta da inoculação crônica do veneno quanto pelo esgotamento das reservas de ferro e de proteínas conseqüentes às sangrias sucessivas (8). A análise do gráfico 3, da média dos eritrócitos dos equinos do grupo experimental, apresentaram uma pequena variação (valor médio $7,4 \times 10^6/\mu\text{L} \pm 0,54$) quando comparado ao grupo controle (valor médio $7,8 \times 10^6/\mu\text{L} \pm 0,31$). O grupo experimental (gráfico 4) apresentou uma variação pouco significativa no hematócritos (valor médio $33,8 \pm 2,42$) em relação ao grupo controle (Valor médio $36,5 \pm 1,7$). Ao final do período de descanso os animais recuperaram em torno de 96,4% dos hematócritos e 98,7% dos eritrócitos em relação ao grupo controle.

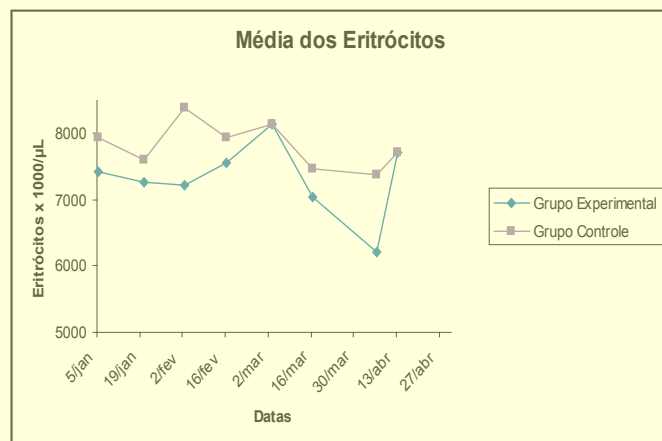


Gráfico 3 – Média dos eritrócitos

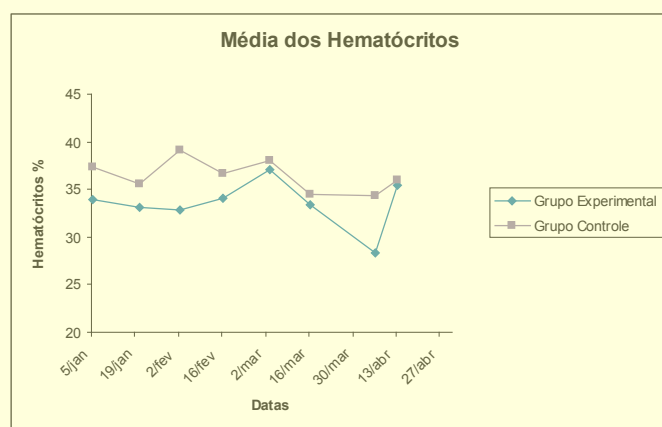


Gráfico 4 – Média dos hematócritos

Conclusão. Com o presente trabalho verificamos a eficácia do protocolo de imunização utilizado pela Fazenda Vital Brazil na obtenção de plasma hiperimune antibotrópico. O tempo de recuperação dos animais, determinado pelo protocolo, utilizado na rotina de produção do IVB atende os requisitos de manutenção da higiene dos equinos, assim como, o tempo protocolado para inoculação de veneno, sangria e recuperação dos equinos é adequado e não compromete a saúde do animal.

Referências Bibliográficas

- 1 – Cardoso, J. L. C.; Wen F. H. **Introdução ao ofidismo – Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2003.
- 2 – Lucas, E. P. R.; **Estudo interlaboratorial para o estabelecimento do veneno botrópico e do soro antibotrópico de referência nacional** [Tese de Mestrado]. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2009.
- 3 – SAS Institute Inc. SAS/STAT® 9.2. User's Guide. **Introduction to Clustering Procedures (Book Excerpt).** Cary, North Carolina. USA. c 2008.
- 4- Jain, N.C.; **Essentials of veterinary hematology.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
- 5 – Lopes, S. T. A.; Cunha, C. M. S.; **Patologia Clínica Veterinária.** Tipo de trabalho – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria. 2002.
- 6 – García Navarro, C. E. K.; Pachaly, J. R.; **Manual de hematologia veterinária –** São Paulo: Livraria Varela, 1994.
- 7 – Feldman, B.F.; Zinkl, J. G.; Jain, N.C.; **Schalm's Veterinary Hematology,** 5 th ed, Philadelphia: Lippincot Williams & Wilkins, 2000: p.110 –116.
- 8 – Jain, N.C.; **Scham's Veterinary Hematology,** 4 ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1986.