

CLÍNICA CIRÚRGICA DE PEQUENOS ANIMAIS - CONTROLE MICROBIOLÓGICO NA OBTENÇÃO DO PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

MICROBIOLOGICAL CONTROL IN OBTAINING PLATELET-RICH PLASMA (PRP)

L. S. SFRIZO^{1*}, J. M. PAZZINI², M. G. P. A. FERREIRA³, R. A. R. USCATEGUI⁴,
A. B. DE NARDI⁵, C. PIGATTO-DENARDI⁶

RESUMO

O plasma rico em plaquetas é um produto obtido por meio da centrifugação do sangue, e devido as suas propriedades de estimular a angiogênese, este é utilizado em cirurgias reconstrutivas a fim de evitar complicações pós-cirúrgicas. A coleta do sangue é feita de forma asséptica para obtenção do PRP, porém há possibilidade de contaminação bacteriana no momento da sua confecção podendo assim ocasionar complicações ao paciente. Objetivou-se ressaltar a importância do rigor no controle microbiológico do produto obtido, bem como avaliar a possibilidade de contaminação bacteriana no momento da confecção (PRP), antes do seu emprego no leito de enxertos cutâneos em coelhos. No presente estudo, apenas quatro amostras das sessenta confeccionadas apresentaram colônias bacterianas, indicando que o plasma rico em plaquetas obtido de maneira asséptica é propício e seguro em cirurgias reconstrutivas. Conclui-se que o rigor no controle microbiológico aliado a adequada desinfecção do centro cirúrgico e antisepsia do campo operatório, bem como o preparo asséptico do PRP, seu uso é indicado e seguro, não provocando riscos de contaminação da ferida cirúrgica.

PALAVRAS-CHAVE: Angiogênese; Bactéria; Cirurgia Reconstrutiva; Enxertos Cutâneos

SUMMARY

Platelet-rich plasma is a product obtained by centrifuging blood, and due to its properties of stimulating angiogenesis, it is used in reconstructive surgery in order to avoid post-surgical complications. Blood collection is done aseptically to obtain platelet-rich plasma, but there is a possibility of bacterial contamination at the time of making it, thus causing complications to the patient. The objective was to emphasize the importance of rigor in the microbiological control of the product obtained, as well as to evaluate the possibility of bacterial contamination when making platelet-rich plasma (PRP), before its use in the bed of skin grafts in rabbits. In the present study, only four samples of the sixty made had bacterial colonies, indicating that the platelet-rich plasma obtained aseptically is conducive and safe in reconstructive surgery. It is concluded that the rigor in microbiological control combined with adequate disinfection of the operating room and antisepsis of the operating field, as well as the aseptic preparation of the PRP, its use is indicated and safe, without causing risks of contamination of the surgical wound.

KEY-WORDS: Angiogenesis; Bacteria; Reconstructive Surgery; Skin Grafts

¹ Médica Veterinária Graduada pela Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP/FCAV – Câmpus Jaboticabal – Jaboticabal – SP. Endereço para correspondência: Rua Oswaldo Luís Angarano, 40, Colina Verde, CEP: 14887-384 Email lussfrizo@hotmail.com

² Profa. Dra. da União das Faculdades do Grande Lago/ Unilago – São José do Rio Preto – SP Email josipazzini@hotmail.com

³ Profa. Dra. da Universidade Federal do Vale São Francisco – Pernambuco – PE Email Mary_pops1@hotmail.com

⁴ Prof. dr. Adjunto do Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal do Vale do Jequitinhonha e Mucuri – Câmpus Unaí – Minas Gerais – MG Email ramirezuscategui@hotmail.com

⁵ Prof. Dr. do departamento de Clínica e Cirurgia do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” -UNESP/FCAV – Câmpus Jaboticabal – Jaboticabal – SP Email andrigobarboza@yahoo.com.br

⁶ Profa. do Instituto Federal de Ciências e Tecnologia de São Paulo – Câmpus Matão – Matão – SP. Email carolinepigatto@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

As plaquetas têm como funções promover a hemostasia, cicatrização de feridas e reepitelização, além de liberarem diversos fatores de crescimento, os quais estimulam a angiogênese, o crescimento vascular e a proliferação de fibroblastos, responsáveis pela síntese de colágeno. O plasma rico em plaquetas (PRP) é um subproduto sanguíneo autólogo e seu produto final visa ter uma alta concentração de plaquetas em relação ao plasma. Tanto as plaquetas quanto o plasma, por terem fatores de crescimento (FCP), têm a função de iniciar o processo de cicatrização. O FCP tem atividades específicas no processo de reparação tecidual, estimulando a angiogênese, replicação tecidual, ação antiinflamatória, indução cicatricial e crescimento de novas estruturas, tendo assim grande importância em procedimentos cirúrgicos de reconstrução tecidual (EURIDES et al., 2015).

Devido ao PRP ser rico em nutrientes, a necessidade do controle microbiológico é importante. Falhas nas medidas preventivas e de controle do processo de obtenção podem levar ao comprometimento da eficácia do produto devido a alteração de características físicas e químicas. Um fator muito importante para que o PRP seja confeccionado sem qualquer tipo de contaminação bacteriana é a correta desinfecção da pele, pois em sua microbiota há bactérias Gram-positivas, especialmente *Staphylococcus* sp, além da presença de Gram-negativas também. Outra consideração relevante é que o procedimento seja realizado por uma pessoa experiente para não contaminar a amostra no momento de seu preparo. Todos esses cuidados evitam o desenvolvimento de quadros de infecção, comprometimento do leito cirúrgico e, em situações mais graves, quadros de sepse (CORRÊA, 2017). Dias e colaboradores (2015) ressaltam a importância de uma boa desinfecção de superfícies, equipamentos e áreas físicas, bem como a antisepsia das mãos e o uso de luvas. Outro aspecto a ser considerado é o efeito inibitório que o PRP pode possuir, como demonstrou o estudo realizado por Dori et al. (2019) foi utilizado o PRP em grupo de pessoas submetidas a cirurgia periodontal reconstrutiva foi observando, além da aceleração da cicatrização, a inibição do desenvolvimento de algumas espécies bacterianas.

O emprego do PRP em procedimentos cirúrgicos é de grande interesse, devido a sua alta capacidade de favorecer a cicatrização de feridas. Estudos como o de Pazzini et al. (2016), que utilizaram o PRP em retalhos de padrão axial em coelhos, encontraram resultados favoráveis à cicatrização. Além disso, a observação da redução da necrose nas extremidades dos retalhos sugerem sucesso na utilização desse produto.

Considerando a aplicabilidade do PRP, tanto em Medicina Veterinária como na Medicina Humana, o controle de qualidade na obtenção do produto é fundamental. Desta maneira, o presente estudo objetivou ressaltar a importância do rigor no controle microbiológico do produto obtido, bem como detectar

contaminação bacteriana no momento do preparo do PRP das amostras, antes do seu emprego no leito de enxertos cutâneos em coelhos.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

Foi realizado no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP Câmpus de Jaboticabal – SP, um estudo com 60 coelhos da raça Nova Zelândia branco (*Oryctolagus cuniculus*). O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de animais (CEUA) processo número 305468/2013-8.

Procedimento Cirúrgico

O procedimento cirúrgico de reconstrução foi realizado de maneira asséptica, empregando enxerto cutâneo de espessura completa no membro torácico, na região do carpo a fim de corrigir lesão extensa. Para a realização da ferida dermoepidérmica e demarcação do segmento de pele retirado em região de carpo esquerdo, foi utilizada caneta cirúrgica⁷ e régua estéril⁸ para criar uma lesão de quatro cm de comprimento por quatro cm de largura, no formato de quadrado. Com o auxílio de lâmina de bisturi n°15⁹ foi excisado o fragmento cutâneo de 16 cm², na porção distal do carpo, do membro torácico esquerdo.

A ferida do leito doador no tórax foi submetida à dermorráfia em padrão de fechamento em formato de figura geométrica, com náilon 4. O gel de plasma rico em plaquetas autólogo foi colocado antes da síntese da lesão do carpo, com auxílio do cabo de bisturi¹⁰ e distribuído de maneira homogênea entre o subcutâneo do leito doador e o subcutâneo do leito receptor, após sua aplicação procedeu-se a síntese da ferida cirúrgica.

Protocolo de obtenção do plasma rico em plaquetas

Para a realização do procedimento não foi necessário submeter os animais ao jejum alimentar e hídrico. O protocolo anestésico ao qual os animais foram submetidos consistiu de midazolam¹¹, na dose de 0,5 mg/kg pela via intramuscular (IM) e cloridrato de tramadol¹², na dose de 5 mg/kg pela mesma via. Após sedação, foram coletadas amostras de sangue dos 60 coelhos submetidos ao procedimento cirúrgico. Realizou-se tricotomia da região auricular para acesso das veias auriculares, e procedeu-se antisepsia com clorexidine e solução de álcool a 70%. Os animais

⁷ Skins – T Surgical Skin Marker - Batrik Medical Manufacturing Inc – Quebec – Canadá.

⁹ Lâmina de bisturi N15 - Solidor – São Paulo - São Paulo - Brasil.

¹⁰ Cabo de bisturi n4 – Brasmed Empresa Brasileira de Cirurgia Veterinária LTDA – Paulínia – São Paulo – Brasil.

¹¹ Midazolam – Medley Industria Farmacêutica Ltda – Campinas – São Paulo – Brasil

¹² Tramal – Medley Industria Farmacêutica Ltda – Campinas – São Paulo – Brasil

foram posicionados em decúbito ventral, e procedeu-se a venopunção das veias auriculares, e coleta de 7,2 mL de sangue, acondicionada em dois tubos estéreis, com capacidade de 3,6mL contendo citrato de sódio¹³ (anticoagulante) destinados à preparação do PRP.

O frasco com citrato de sódio foi empregado na produção do PRP pelo protocolo de dupla centrifugação em centrífuga laboratorial comum¹⁴ conforme, descrito por Pazzini et al. (2016a). Os tubos foram centrifugados com tampa fechada, a 1600 rotações por minuto (rpm) durante 10 minutos, resultando na separação em hemácias e plasma contendo leucócitos e plaquetas. Em capela de fluxo laminar, os tubos foram destampados para que o plasma fosse pipetado e transferido para outro tubo estéril sem agentes anticoagulantes, e foi centrifugado novamente a 2000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, descartou-se em torno de 80% do sobrenadante, constituído pelo PPP (plasma pobre em plaquetas), mantendo-se no frasco apenas 1mL do PPP, juntamente com botão plaquetário. Esse material foi levemente agitado para promover a ressuspensão das plaquetas, e no momento de sua utilização adicionou-se 0,3mL de gluconato de cálcio, para promover ativação das plaquetas, resultando no gel de plasma rico em plaquetas (PRP).

A quantificação do número de plaquetas foi realizada após a coleta das amostras, indicando os valores padrões entre 290.000 a 678.000. Ao final do procedimento de confecção do PRP foi contabilizado em média 1.176.933 plaquetas/ul, obtendo de um valor de 7,2ml de volume total 0,7ml de PRP.

Controle de qualidade microbiológico do plasma rico em plaquetas (PRP)

Uma alíquota de PRP foi utilizada para a realização do cultivo bacteriano. A amostra foi semeada em quatro placas contendo ágar sangue utilizando a técnica de esgotamento. Duas placas foram incubadas em aerobiose e duas em anaerobiose a 37°C. Após 48 horas as placas foram retiradas da estufa e analisadas. Para a identificação dos grupos morfológicos das colônias encontradas, foi realizada Coloração de Gram. O procedimento de coloração consistiu em colocar a lâmina em um suporte e corar o esfregaço com cristal violeta e aguardar por um minuto. Posteriormente retirou-se o excesso desse corante e cobriu-se a superfície da lâmina com lugol por mais um minuto. Em seguida, lavou-se a lâmina com álcool acetona, deixando-o agir por 30 segundos, e depois lavou em água corrente, imergindo-a em safranina ou fucsina, deixando agir por 30 segundos, e em seguida lavou-a novamente em água corrente, deixando-a secar, para depois aplicar óleo de imersão sobre a mesma para observação ao microscópio. (RIBEIRO et al., 2011)

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo foi feito em modelos experimentais, utilizando metodologia padronizada de análise microbiana. Na literatura não foram encontrados relatos de realizações de testes semelhantes durante a obtenção do PRP, dando assim ênfase a esse tipo de estudo.

Das amostras dos 60 coelhos, apenas quatro apresentaram colônias bacterianas nas placas incubadas em anaerobiose (Figura 1A). Nas colônias foram realizadas coloração de Gram para identificação dos grupos morfológicos. Em duas placas encontrou-se presença de cocos Gram positivos, em forma de cachos (Figura 1B), sendo esses grupos bacterianos encontrados comumente na pele e mucosas dos animais. Nas outras duas placas encontraram-se bastonetes Gram positivos (Figura 1C), provavelmente micro-organismos de origem ambiental. Em um estudo realizado por Moreira e seus colaboradores (2018), eles afirmam que a contaminação bacteriana costuma ser escassa, mas sua quantificação e qualificação em relação às infecções hospitalares são de difícil detecção. Eles ainda afirmam que os micro-organismos presentes no ambiente hospitalar costumam ser multirresistentes, possibilitando contaminação do ambiente cirúrgico. Dias et al. (2015), afirma que quando os pacientes admitidos no ambiente hospitalar são assintomáticos ou estão em estágio de incubação, isso já acarreta infecções hospitalares. Esse processo se dá pela interação entre os agentes patogênicos, que estão sempre em maior quantidade e o paciente que na maioria das vezes pode estar imunossuprimido, facilitando assim a transmissão de doenças e contaminação local. Em contrapartida, neste estudo as amostras de sangue dos 60 animais foram testados quanto a presença de alteração hematológica que pudesse comprometer o estudo e nenhum dos animais apresentou qualquer problema sistêmico. No estudo realizado por Dias et al. (2015) foram encontradas cepas de *S. aureus* e *S. intermedius*, os quais fazem parte da microbiota da pele e oro-nasal de humanos e animais, corroborando assim com os achados deste estudo.

Mesmo nas amostras de plasma positivas no cultivo microbiano, não foi observado qualquer tipo de infecção na ferida cirúrgica após a aplicação do PRP, visto que a cicatrização foi adequada. No pós-operatório os animais foram submetidos à antibioticoterapia Pentabiótico¹⁵ por via subcutânea na dose de 0,06ml/Kg, com intervalo de 48h para nova dose, por cinco dias, e antiinflamatório com Meloxicam¹⁶ durante três dias, sendo por via subcutânea na dose de 0,2 mg/Kg no primeiro dia, e no segundo e terceiro dia 0,1mg/Kg, com intervalos de 24 horas. Além da antibioticoterapia aplicada, pode-se levar em conta os resultados de Dori e seus colaboradores (2019) que ressaltam a ação inibitória do PRP em micro-organismos, evitando infecções.

¹³ Tubo BD vacutaneir® citrato de sódio – BD – São Paulo – São Paulo – Brasil.

¹⁴ Modelo 206 I centrifuge/Fanem® - SP.

¹⁵ Mogipen – Jofadel Indústria Farmacêutica S/A Monte Mor – São Paulo - Brasil.

¹⁶ Maxicam – OuroFino Agronegócios - Cravinhos - São Paulo - Brasil.

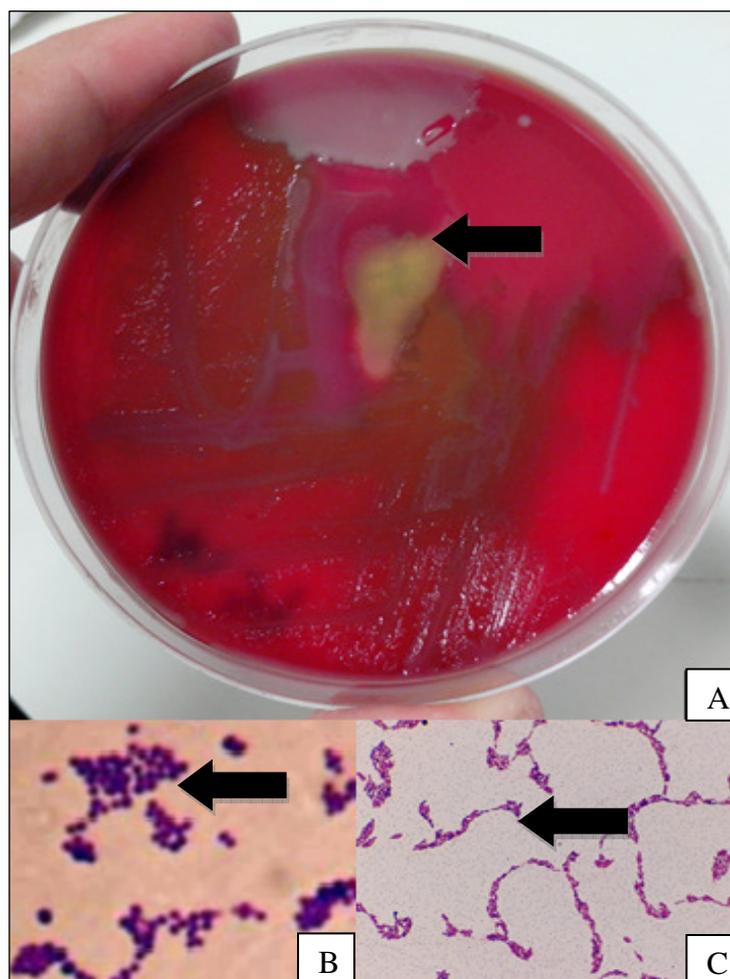


Figura 1 - Imagens fotográficas de placa de Ágar sangue contendo amostra de PRP empregado em cirurgia reconstrutiva realizado no Hospital Veterinário da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Unesp, Câmpus de Jaboticabal, 2015. A) Presença de colônias bacterianas em cultivo de PRP em ágar sangue em condições de anaerobiose (seta). B) Presença de Cocos Gram – positivos em forma de cachos provenientes de amostras de PRP (seta). C) Bastonetes Gram – positivos provenientes de amostra de PRP (seta).

O PRP, há alguns anos, vem sendo estudado, tanto na Medicina Humana quanto na Medicina Veterinária, devido às suas propriedades de crescimento tecidual que atuam na cicatrização e capacitação das células às mitoses e angiogênese (BONFÁ et al., 2017). Devido às propriedades benéficas que o plasma rico em plaquetas apresenta, pesquisas como esta são de suma importância para melhorar os cuidados na obtenção do produto visando minimizar qualquer tipo de contaminação durante o tratamento, já que são poucos os estudos que avaliam a contaminação no momento de sua confecção, corroborando com o que Moreira et al. (2018) afirma de que é muito difícil qualificar e quantificar os micro-organismos no ambiente hospitalar, mesmo com todos os cuidados assépticos tomados.

CONCLUSÕES

O presente estudo conclui que o rigor no controle de qualidade microbiológico, aliado a adequada desinfecção do centro cirúrgico, antisepsia

do campo operatório e da venopunção, o adequado treinamento do profissional que executará a técnica, a antisepsia das mãos e uso de luva em período integral ao procedimento torna a utilização do PRP segura. Em tempo, é importante enfatizar que para ocorrer de forma adequada o processo cicatricial, é importante avaliar as amostras sanguíneas dos animais antes do processamento do plasma rico em plaquetas, descartando alterações hematológicas que possam interferir no processo de reepitelização da ferida cirúrgica.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP e CNPQ

REFERÊNCIAS

BONFÁ, A. F., NOMURA, R.H.C., PRADO, A. M. B., SILVEIRA, A. B., DORNBUSCH, L. P. T. C., DORNBUSCH, P. T. 2017. Efeito do Gel de Plasma Rico em Plaquetas na cicatrização de enxertos

cutâneos em eqüinos. **Ciência Animal Bras.** Goiânia v. 18, n.1-12.

CORRÊA, T. Q. 2017. Técnicas ópticas para o controle microbiológico de sangue. **Tese de Doutorado apresentado na Universidade Federal de São Carlos – São Paulo.**

DIAS, R. A., JÚNIOR, F. G., SOUZA, A P. 2015 Avaliação da contaminação bacteriana nos setores de Clínica e Cirurgia de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UFCG. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária.** Paraíba v. 37, n. 173-177.

DORI, F., KRISTÓF, K., GERA, ISTVÁN, SCULEAN, A., EICK, SIGRUN 2019. Bacterial contamination of Eptfe membranes following regenerative surgery intrabony defects treated with Platelet-rich Plasma and Natural Bone Mineral. **Oral Health Prev Dent.** v. 17: 439-445.

EURIDES, D., GUIMARÃES, C. P. A., BELLETI, M. E., MUNDIM, A. V., SOUZA, L. G., GONÇALVES, G. F., EURIDES, G. P. 2015 Plasma Rico em Plaquetas autólogas na cicatrização do tendão do músculo gastrocnêmio de coelhos. **Braz J. Vet. Res. Anim. Sci – São Paulo** v.52, n.1 p. 48-56.

MOREIRA, T. C., SOUZA, J. B. B., PAULA, E. M. N., STELLA, A. E. 2018 Infecções nosocomiais por Estafilococos Multirresistentes: um risco eminente no ambiente hospitalar veterinário. **III Colóquio Estadual de Pesquisa multidisciplinar e I Congresso Nacional Multidisciplinar.** Centro Universitário de Mineiros – Minas Gerais.

PAZZINI J. M., DE NARDI A. B., HUPPES R. R., GERING A. P., FERREIRA M. G. P. A., SILVEIRA C. B. P., LUZZI M. C., SANTOS R. 2016a. Method to obtain platelet rich plasma from rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). **PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA.** 36(1):39-44.

PAZZINI J. M., DE NARDI A. B., HUPPES R. R., GERING A. P., FERREIRA M. G. P. A., SILVEIRA C. B. P., LUZZI M. C., OLIVEIRA J. A. 2016b. Utilização de plasma rico em plaquetas para estimulação da angiogênese em flape de padrão axial toracordosal em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **PERQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA.** 36(2):108-118.

RIBEIRO, M. C., STELATO, M. M. 2011 Microbiologia prática: aplicações de aprendizagem de microbiologia básica – bactérias, fungos e vírus. **Atheneus, 2ed.**