

ANEMIA HEMOLÍTICA IMUNOMEDIADA: UMA ABORDAGEM DOS SINAIS CLÍNICOS E TÉCNICAS PARA DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

IMMUNE-MEDIATED HEMOLYTIC ANEMIA: AN APPROACH TO CLINICAL SIGNS AND TECHNIQUES FOR LABORATORY DIAGNOSIS

Resumo: A Anemia Hemolítica Imunomediada (AHIM) é comum na rotina clínica veterinária e sua patologia envolve a destruição imunomediada dos eritrócitos, levando à anemia. Em grande parte dos cães a AHIM pode ter origem primária ou idiopática, não tendo uma causa definida, ou ser secundária a doenças infecciosas, neoplásicas, vacinação, medicamentos e transfusões, entre outras causas. As manifestações clínicas surgem conforme a intensidade da anemia, mecanismos compensatórios e gravidade da hipóxia tecidual. Não existe padrão ouro de diagnóstico estabelecido para AHIM em cães, por isso as alterações laboratoriais devem ser interpretadas em combinação com testes diagnósticos e a resposta à imunossupressão. Os principais exames complementares solicitados para o paciente são hemograma, bioquímica sérica, urinálise, contagem de reticulócitos e exame detalhado do esfregaço sanguíneo. Os testes empregados para diagnóstico de AHIM levam em consideração as interações antígeno-anticorpo. O teste de autoaglutinação em solução salina é realizado para visualização de macroaglutinação a olho nu ou microaglutinação observada em microscopia. O teste de Coombs (teste de autoaglutinação direta), revela anticorpos e frações do sistema complemento na membrana das hemárias. A avaliação da medula óssea por meio do mielograma pode evidenciar a interrupção em algum estágio dos precursores eritróides. Assim sendo, o presente estudo terá como objetivo revisar a AHIM em cães, dando ênfase as manifestações clínicas, achados laboratoriais e métodos de diagnóstico, a fim de colaborar com a possibilidade de instituição de tratamentos mais precoces e melhoria no prognóstico do paciente.

Palavras-chave: Autoaglutinação. Esferócitos. Hemólise. Hemograma.

Abstract: Immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) is common in veterinary clinical practice and its pathology involves the immune-mediated destruction of erythrocytes, leading to anemia. In most dogs, IMHA may be primary or idiopathic in origin, with no defined cause, or secondary to infectious or neoplastic diseases, vaccination, medications, and transfusions, among other causes. Clinical manifestations arise according to the intensity of anemia, compensatory mechanisms, and severity of tissue hypoxia. There is no established gold standard for the diagnosis of IMHA in dogs, so laboratory alterations should be interpreted in combination with diagnostic tests and the response to immunosuppression. The main complementary tests requested for the patient are complete blood count, serum biochemistry, urinalysis, reticulocyte count, and detailed examination of the blood smear. The tests used to diagnose IMHA take into account antigen-antibody interactions. The saline autoagglutination test is performed to visualize macroagglutination with the naked eye or microagglutination observed under microscopy. The Coombs test (direct autoagglutination test) reveals antibodies and fractions of the complement system on the red blood cell membrane. Bone marrow evaluation by means of a myelogram is expected to show the interruption at

Dhieniffer Correia S. Branquinho¹

Ladyelle de Oliveira Lopes²

Marcos Matheus de Assis³

Jandra Pacheco dos Santos⁴

¹ UNIGOIÁS.

² UNIGOIÁS.

³ UNIGOIÁS.

⁴ UNIGOIÁS.

some stage of the erythroid precursors. Therefore, the present study will aim to review IMHA in dogs, emphasizing clinical manifestations, laboratory findings and diagnostic methods, in order to collaborate with the possibility of instituting earlier treatments and improving the patient's prognosis.

Keywords: Autoagglutination. Spherocytes. Hemolysis. Hemogram.

INTRODUÇÃO

A tolerância frente ao “próprio” representa um mecanismo evolutivo que deve ser preservado para garantir a existência de um indivíduo. Caso algo que destrua a integridade da auto tolerância aconteça, uma resposta imune ao próprio – ou auto imunidade – se desenvolverá. A Anemia Hemolítica Imunomediada (AHIM) é comum na rotina clínica veterinária e sua patologia envolve a destruição imunomediada dos eritrócitos, levando à anemia. Em grande parte dos cães a AHIM pode ter origem primária ou idiopática, não tendo uma causa definida, ou ser secundária (Daisley, 2015, p.1). As respostas IgM ou IgG aos抗ígenos localizados na superfície dos eritrócitos levam à destruição dessas células por dois mecanismos. O primeiro envolve a destruição intravascular que resulta da hemólise pela ativação da cascata do complemento, levando a liberação de hemoglobina no plasma e hemoglobinúria. O segundo mecanismo envolve a retirada das hemácias marcadas com anticorpos por macrófagos localizados no baço e fígado. Essa

hemólise extravascular resulta na presença de bilirrubina na urina e plasma (Archer *et al.* 2013).

As manifestações clínicas surgem conforme a intensidade da anemia, mecanismos compensatórios e gravidade da hipóxia tecidual (Jericó *et al.* 2023). Os animais com anemia aguda podem apresentar alterações clínicas graves e pior prognóstico, enquanto os pacientes com quadro anêmico de evolução mais gradativa podem se adaptar à anemia e manifestar sinais clínicos menos graves (Thrall *et al.* 2015). Não existe padrão ouro de diagnóstico estabelecido para AHIM em cães, por isso os exames laboratoriais devem ser interpretados em combinação com outros testes diagnósticos e a resposta à imunossupressão (Garden *et al.* 2019).

Os principais exames complementares solicitados para o paciente são hemograma, bioquímica sérica, urinálise, contagem de reticulócitos e exame detalhado do esfregaço sanguíneo (Jericó *et al.* 2023). O hemograma inclui dados da avaliação quantitativa e qualitativa das células que compõem o sangue,

fornecendo informações fundamentais para a avaliação da anemia (Macneill *et al.* 2019).

Na AHIM, grande parte das anemias são classificadas como regenerativas (Martinato, 2020, p.2). O exame do esfregaço sanguíneo frequentemente revela esferocitose, que é o achado mais útil no diagnóstico desses pacientes (Garden *et al.* 2019). No leucograma, a leucocitose neutrofílica com desvio a esquerda moderado a acentuado é um achado comum em cães com AHIM. Isso acontece devido a hipoxia anêmica que ocasiona lesões teciduais (necrose). A análise do plaquetograma também é um passo importante no diagnóstico, pois muitas vezes a AHIM cursa com trombocitopenia imunomediada (Jericó *et al.* 2023). O perfil bioquímico pode evidenciar hiperbilirrubinemia, hiperglobulinemia e aumento das enzimas hepáticas, principalmente a Alanina aminotransferase (ALT) (Archer *et al.* 2013). Além disso, há elevação dos níveis de ureia e creatinina no perfil bioquímico. Na urinálise podem ser identificadas hemoglobinúria e bilirrubinúria (Jericó *et al.* 2023; Thrall *et al.* 2015).

Existem testes que podem ser utilizados para o diagnóstico da AHIM, porém não existe um exame com 100% de sensibilidade. Os testes empregados levam em consideração as interações antígeno-anticorpo (Mcneill *et al.*

2019). O teste de autoaglutinação em solução salina, o teste de Coombs (teste de autoaglutinação direta) e a citometria de fluxo são exemplos de exames que podem ser solicitados (Daisley, 2015, p. 2; Bovens, 2017, p. 2; Garden *et al.* 2019). Em cães, a AHIM está associada a elevada morbidade e mortalidade e deve ser considerada no diagnóstico diferencial em pacientes que apresentam quadros anêmicos graves. Assim sendo, o presente estudo terá como objetivo revisar a AHIM em cães, dando ênfase as manifestações clínicas, achados laboratoriais e métodos de diagnóstico, a fim de colaborar com a melhoria no prognóstico do paciente.

METODOLOGIA

O trabalho é uma revisão de literatura do tipo revisão integrativa. Além de livros veterinários, Pubmed e Google Acadêmico foram os sites oficiais utilizados para extração do material literário. Foram utilizados materiais referentes aos temas publicados entre os anos 2010 e 2024.

Foi utilizado o método de busca avançada em ambos os sites, no qual foram definidas palavras chaves relacionadas ao tema do presente trabalho para busca de materiais literários. No Google Acadêmico só foram considerados os artigos que continham em

qualquer parte do texto os termos: anemia hemolítica imunomediada em cães e diagnóstico. No campo de preenchimento *will the exact phrase* da busca avançada foi utilizado o termo “anemia hemolítica imunomediada em cães”, no campo de preenchimento *with at least one of the words* foi utilizado o termo “diagnóstico”. Foram obtidos 31 artigos totais, dos quais 2 foram selecionados como material bibliográfico. Também foi utilizado para essa ferramenta de busca o termo em inglês “*Immune-mediated hemolytic anemia in dogs*” no campo de preenchimento *will the exact phrase* e o termo “*diagnosis*” no campo de preenchimento *with at least one of the* da busca avançada, foram obtidos 409 artigos, dos quais 3 artigos foram selecionados. No Pubmed, foi utilizado como descritor o termo em inglês: “*dogs immune-mediated hemolytic anemia*” no campo de busca avançada. Foram obtidos 368 artigos totais, dos quais 31 foram pré-selecionados a partir da leitura de títulos, e posteriormente 8 foram selecionados a partir da leitura de resumos.

Para selecionar os estudos obtidos foi feita a leitura de títulos e resumos, verificando a compatibilidade da literatura referencial ao trabalho a ser produzido, excluindo os que contenham informações incompatíveis com o objetivo do estudo, data de publicação fora do

intervalo estipulado e artigos que tratam do tema apenas para espécie felina. Trabalhos de conclusão de curso e relatos de caso também foram excluídos por possuírem baixo nível de evidência.

REVISÃO DE LITERATURA

Fisiopatologia

A AHIM é uma reação imune do tipo II, na qual a formação de anticorpos contra as hemácias causa uma acelerada destruição dos eritrócitos. É uma doença que exibe regeneração marcante, tendo um alto grau de policromasia. Porém, em algumas situações, a anemia pode ser arregenerativa devido à formação de anticorpos contra precursores de eritrócitos, causando destruição dos eritrócitos policromatofílicos ou de precursores de células imaturas (Thrall *et al.* 2015).

Há maior prevalência em caninas fêmeas de meia idade das raças *Cocker Spaniel*, *Collie*, *Poodle*, *Setters Irlandeses* e *Springer Spaniels Ingleses* (Archer *et al.* 2013). A anemia hemolítica imunomediada é classificada como primária quando é idiopática ou secundária, quando existe doença concomitante. Na secundária, muitas vezes a causa não é determinada, mas pode haver envolvimento de infecções, vacinas com vírus modificado, neoplasias, principalmente as do

sistema linfoide, intoxicação, picadas de abelhas ou outras doenças imunomediadas (Daisley, 2015, p.1). Medicamentos como penicilina, cefalosporina, levamisol também estão associados à doença e podem levar a hemólise imunomediada devido a ligação do medicamento com os eritrócitos (Archer *et al.* 2013).

As imunoglobulinas são proteínas sintetizadas por plasmócitos que interagem a partir de estímulos com imunógenos. Em cães com AHIM as principais imunoglobulinas presentes nas hemácias são IgM e IgG, podendo também haver esporadicamente presença de IgA. O complemento é um sistema de proteínas plasmáticas que pode ser ativado diretamente por patógenos ou indiretamente por anticorpos unidos a superfície de patógenos ou células, levando a uma cascata de reações que resulta em lise. O sistema complemento sofre ativação mediante a opsonização das hemácias, realiza o reconhecimento dos anticorpos aderidos a sua superfície e causa deposição de imunocomplexos, ocasionando ataque a membrana celular a qual resulta em hemólise (Martinato, 2020, p.4).

A hemólise envolve mecanismos de eritrofagocitose (hemólise extravascular) e hemólise intravascular. Os macrófagos possuem receptores para anticorpos e para

complemento (C3B), e podem remover eritrócitos no baço, medula óssea e no fígado. O C3b é um fragmento da proteína C3, ele atua como uma opsonina, ou seja, esse fragmento se adere a superfície da hemácia recoberta por anticorpos, funcionando como uma espécie de “alvo” para as células fagocitárias. Além disso, o C3b contribui para a formação do complexo de ataque a membrana (MAC). O MAC promove a formação de poros na superfície da hemácia, causando sua lise e consequente liberação de hemoglobina na circulação. A eritrofagocitose parcial pelos macrófagos resulta na formação de esferócitos que é uma característica da AHIM. Essas células têm aparência densa e pequena, volume normal e sem palidez central, além disso possuem meia vida mais curta pois não são tão deformáveis quanto eritrócitos em forma de discos bicôncavos normais e uma maior fragilidade à solução salina. O processo de eritrofagocitose pode resultar em bilirrubinemia e bilirrubinúria. Quando ocorre fixação de complemento, que resulta no dano à membrana pelos complexos formados, ocorre lise intravascular. Neste caso pode haver a presença de eritrócitos fantasma no esfregaço sanguíneo. A hemoglobinúria e a hemoglobinemias são esperadas nestes casos (Gorenstein *et al.* 2019; Tizard, 2019, p. 30).

Quando a IgM se liga às glicoproteínas da membrana dos eritrócitos é possível observar a aglutinação macroscópicamente. A IgG é referenciada como incompleta, pois em geral não ocasiona hemólise intravascular ou aglutinação, no entanto predispõe a eritrofagocitose pelos macrófagos (Thrall *et al.* 2015). A AHIM em cães pode ser classificada de acordo com a classe de anticorpo, temperatura ideal de reação de anticorpos e natureza do processo hemolítico (Tizard, 2019, p. 417).

A taxa de mortalidade em cães pode chegar a 80% e a maioria dos óbitos ocorre nas primeiras semanas após diagnosticado. Aproximadamente 50% desses óbitos é decorrente de tromboembolismo no fígado, pulmão, baço, ou outros órgãos. Uma reação inflamatória está presente na maioria dos cães e a presença dessa inflamação também é evidenciada pela atividade de quimiotaxinas como a proteína quimioatraente de monócitos-1 e o fator estimulador de colônias de macrófagos granulócitos e proteínas de fase aguda (Piek *et al.* 2011).

Sinais clínicos

Durante a consulta o médico veterinário deve seguir uma abordagem sistemática que envolve resenha, anamnese, histórico e exame físico. Na resenha, é importante identificar

alguns fatores de risco como idade, raça e sexo do animal e levar em consideração que há algumas raças que são mais acometidas (Garden *et al.* 2019).

Na anamnese, normalmente o tutor relata alterações no estado geral do animal, como fraqueza, intolerância ao exercício, letargia e anorexia. Também pode haver relatos de vômitos, alterações respiratórias como a dispneia, presença de poliúria, polidipsia e urina de coloração escura. É fundamental perguntar sobre o histórico de medicações e vacinação, questionar sobre o uso de medicações como antibióticos e antiparasitários, perguntar se o animal foi vacinado recentemente ou se teve contato com plantas tóxicas, veneno ou produtos químicos (Pereira, 2016, p.6; Garden *et al.* 2019).

No exame físico, identifica-se mucosas hipocoradas e icterícia, taquipneia, taquicardia e em alguns casos é possível auscultar sopro cardíaco. Pode haver também linfadenopatia e febre. Durante a palpação o animal pode apresentar aumento de volume e dor abdominal decorrentes de esplenomegalia e hepatomegalia. Em casos em que o paciente apresenta trombocitopenia imunomediada concomitante o animal pode apresentar petéquias, equimoses, epistaxe e melena (Pereira, 2016, p. 7; Archer *et al.* 2013).

Os animais com anemia aguda podem apresentar alterações clínicas graves e pior prognóstico, enquanto os pacientes com quadro anêmico de evolução mais gradativa podem se adaptar à anemia e manifestar sinais clínicos mais brandos (Thrall *et al.* 2015).

Exames complementares

Hemograma

A maioria dos cães com AHIM apresentam anemia grave, manifestando hematócrito entre 12 e 14%. Grande parte dessas anemias são classificadas como regenerativas, mas a ausência de regeneração não elimina a AHIM, pois aproximadamente 30% dos cães têm anemia não regenerativa (Martinato, 2020, p.2; Garden *et al.* 2019).

Normalmente os índices eritrocitários revelam macrocitose e hipocromia decorrentes do alto índice de regeneração e a grande quantidade de eritrócitos imaturos. Os sinais de regeneração também podem ser identificados durante a avaliação do esfregaço sanguíneo, dentre eles pode haver policromasia, anisocitose, corpúsculos de Howell-Jolly e eritrócitos fantasma. Além disso, por meio dessa análise é possível detectar hemoparasitas como a *Babesia sp.* (Jericó *et al.* 2023; Mcneill *et al.* 2019; Archer *et al.* 2013).

A quantificação de reticulócitos é um parâmetro importante para averiguar o índice

de regeneração. Para que a anemia seja considerada regenerativa a contagem absoluta de reticulócitos deve estar acima de 60.000 μl , no entanto é preciso levar em consideração que o pico da resposta regenerativa ocorre aproximadamente quatro dias após o desenvolvimento da anemia aguda (Jericó *et al.* 2023).

O exame do esfregaço sanguíneo frequentemente revela esferocitose, que é o achado mais útil no diagnóstico desses pacientes, no entanto é necessário que a análise seja feita na monocamada do esfregaço sanguíneo fabricado com sangue armazenado por no máximo 24 horas, para preservar a sua qualidade (Garden *et al.* 2019). Essas células são hemácias que perderam sua palidez central e assumiram um formato esférico por meio de fagocitose de macrófagos contra anticorpos ou complemento que opsonisaram a membrana eritrocitária. No leucograma, a leucocitose neutrofílica com desvio à esquerda moderado a acentuado é um achado comum em cães com AHIM. Isso acontece devido a hipóxia anêmica que ocasiona lesões teciduais (necrose) (Thrall *et al.* 2012).

A análise do plaquetograma também é um passo importante no diagnóstico, pois muitas vezes a AHIM cursa simultaneamente com trombocitopenia imunomediada (TIM), sendo então denominada síndrome de Evans

(Jericó *et al.* 2023). Na síndrome de Evans, a disfunção do sistema imunológico, que ocasiona hemólise, pode se estender a outros componentes do sangue, neste caso as plaquetas também se tornam alvos, fazendo com que haja presença de anticorpos contra plaquetas e hemácias, coagulação intravascular disseminada e sequestro esplênico (Nelson; Couto, 2023). Em cães com AHIM, a destruição concomitante de plaquetas mediada pelo sistema imunológico é uma suspeita frequente, porém raramente comprovada devido à dificuldade em diferenciar as causas de trombocitopenia, a variabilidade na produção de autoanticorpos e a falta de testes altamente sensíveis (Bestwick, 2022, p.1268).

Mielograma

O mielograma é um exame que avalia a medula óssea e é útil para o diagnóstico de doenças de caráter hematológico (Oliveira *et al.* 2015). O material é coletado por meio de aspiração com uma agulha, os locais mais utilizados para aspiração são a extremidade proximal do fêmur e parte proximal do úmero e crista ilíaca, após a coleta, o material é espalhado em uma lâmina e corado para visualização microscópica (Thrall *et al.* 2015). Em animais com suspeita de anemia hemolítica imunomediada de caráter arregenerativo é recomendado avaliação da medula óssea a fim

de elucidar a causa da anemia (Macneill *et al.* 2019).

Espera-se que a avaliação da medula óssea por meio do mielograma evidencie a interrupção em algum estágio dos precursores eritroides (Thrall *et al.* 2015). A hiperplasia eritroide em amostras de medula óssea é um achado que revela processo de eritropoiese ativa, porém ocorre a maturação incompleta pela presença de rubrifagocitose – fagocitose por macrófagos direcionado a precursores eritroide (Macneill *et al.* 2019). A depender de qual fase de maturação eritrocitária ocorre a fagocitose há uma variação da classificação do mielograma além da hiperplasia eritroide. Em casos de rubrifagocitose de precursores extremamente jovens como o proeritroblasto e eritroblasto, pode-se interpretar como hipoplasia eritrocitária, não por apresentar incapacidade de eritropoiese, mas por imitar um padrão de hipoplasia eritrocitária. Este padrão é justificado pelo baixo número de precursores eritroides em fase inicial maturando nos compartimentos medulares por causa da rubrifagocitose. A mielofibrose por colágeno pode ocorrer a depender do tempo e intensidade em que o organismo sofre com a rubrifagocitose. Corantes como a reticulina são usados para evidenciar a mielofibrose (Lucidi *et al.* 2017).

Bioquímica

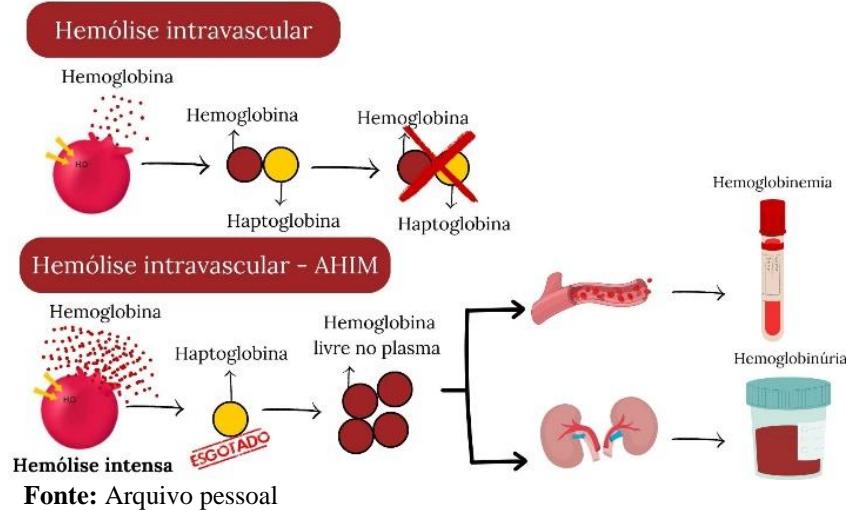
O perfil bioquímico pode evidenciar hiperbilirrubinemia que pode ocorrer devido à acentuada hemólise intravascular e extravascular. Essa alta concentração de bilirrubina pode provocar o estresse hepático, ou seja, o fígado sofre uma sobrecarga com a alta demanda de bilirrubina não conjugada, e isso pode provocar danos aos hepatócitos e consequente aumento das enzimas hepáticas, principalmente as enzimas de extravasamento como a Alanina aminotransferase (ALT) e elevação da concentração sérica de bilirrubina não conjugada (Thrall *et al.* 2015; Archer *et al.* 2013).

Apesar disso, a hiperbilirrubinemia não é uma alteração patognomônica de hemólise, por isso é necessário identificar se há redução da massa hepática funcional, colestase obstrutiva ou sepse para definir que tal alteração está relacionada à hemólise (Garden *et al.* 2019). A deposição de complexos antígenos-anticorpos na membrana eritrocitária leva a destruição das hemácias e consequente hemoglobinemia que promove efeito tóxico nas células dos túbulos renais e pode causar

insuficiência renal aguda, com elevação dos níveis de ureia e creatinina no perfil bioquímico. A hemoglobinemia pode ser detectada por meio do exame visual do plasma ou medição de hemoglobina livre de células, porém só deve ser interpretada como evidência de hemólise após a eliminação das causas de hemólise *in vitro* (Jericó *et al.* 2023; Garden *et al.* 2019).

Urinálise

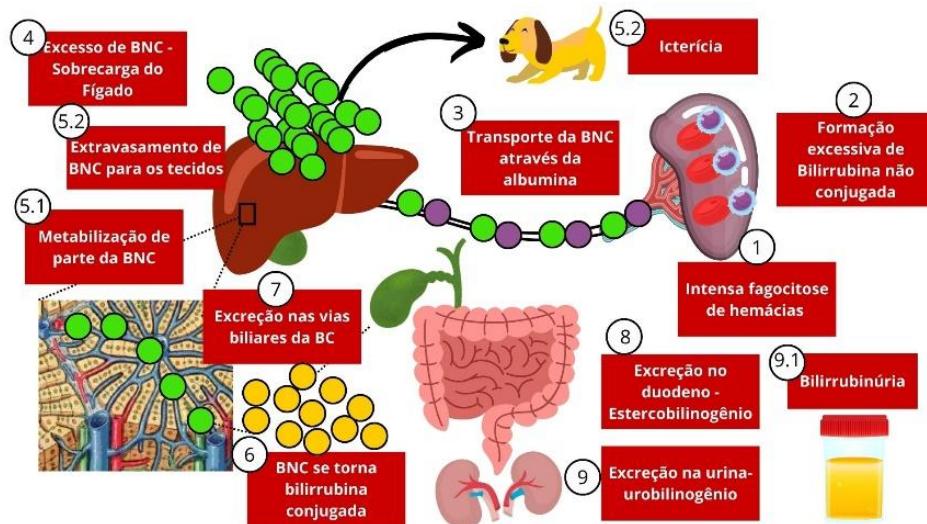
Na urinálise podem ser identificadas hemoglobinúria decorrente da hemólise intravascular e bilirrubinúria ocasionada pela hemólise extravascular. A hemoglobinúria surge como consequência da hemoglobina que é liberada diretamente na corrente sanguínea. A haptoglobina transporta a hemoglobina e faz com que ela seja degradada, no entanto devido à hemólise intensa, a capacidade de ligação da haptoglobina é ultrapassada, resultando em hemoglobina livre circulante. Esta é então filtrada pelos rins e surge na urina conferindo a ela uma coloração avermelhada ou marrom escuro (Zachary, 2018, p. 733)

Figura 1: Diferença entre hemólise intravascular fisiológica e patológica (AHIM)


Durante a avaliação da urina é importante diferenciar se a coloração se deve a hematúria ou hemoglobinúria. Para definir que se trata de hemoglobinúria a urina deve estar avermelhada e a coloração não pode ser eliminada com a centrifugação. Além disso, é importante que a amostra analisada seja de urina fresca (Garden *et al.* 2019).

A hemoglobina liberada no processo de hemólise extravascular é convertida em bilirrubina indireta, a qual é conjugada no fígado tornando-se bilirrubina direta. Apesar

de haver uma sobrecarga hepática o fígado ainda produz grande quantidade de bilirrubina direta, que é solúvel em água e por isso é filtrada pelos rins e eliminada na urina, justificando a bilirrubinúria. A bilirrubina indireta não é solúvel em água, portanto, é incapaz de passar pelo filtro renal. O excesso de bilirrubina na urina confere a ela uma coloração amarela escura ou marrom (Zachary, 2018, p.733).

Figura 2:Processo de hemólise extravascular na anemia hemolítica imunomediada


Fonte: Arquivo pessoal

Testes Diagnósticos

Aglutinação em solução salina

A detecção da AHIM é realizada a partir de uma série de evidências interpretadas em conjunto. Para o diagnóstico o profissional tem ao seu alcance testes laboratoriais que levam em consideração interações antígeno-anticorpo (Garden *et al.* 2019). Anticorpos IgG e IgM aderidos à hemácia podem causar autoaglutinação de hemácias vista macroscópicamente em um tubo com EDTA e confirmado microscopicamente por meio de diluição em solução salina (Daisley, 2015, p. 1).

Um teste de aglutinação em solução salina confirma que existem anticorpos aderidos à superfície eritróide (Bovens, 2017, p. 2) e deve ser realizado com uma gota de sangue coletado em tubo com EDTA e quatro

gotas de solução salina colocadas em uma lâmina para visualização a microscopia. Esse teste possui especificidade que varia de 65% a 96%. Em casos de macroaglutinação é possível visualizar a alteração a olho nu, porém esse achado não exclui a necessidade de visualização microscópica para visualização de aglutinação verdadeira em “cachos de uvas” ou *roleaux* em “pilhas de moedas” (Archer *et al.* 2013).

A aglutinação em solução salina é o teste menos dispendioso, porém deve ser realizado de maneira correta a fim de evitar diagnósticos errôneos. A lavagem insuficiente das hemácias pode causar resultados falso positivos, portanto é necessário que seja lavado pelo menos três vezes em solução isotônica ou tamponada com fosfato para garantir a verdadeira aglutinação (Macneill, 2020, p. 9). A solução salina evita falsas aglutinações e

formação de *roleaux*, mas não dispersa aglutinação verdadeira (Archer *et al.* 2013). O aumento de diluições e lavagens em solução salina aumenta a especificidade e precisão do diagnóstico, porém reduz a sensibilidade (Sun; Jeffery, 2020). Caso a aglutinação não seja detectada, não se deve excluir o diagnóstico. Nesses casos o teste de Coombs e citometria de fluxo podem ser usados para identificar diretamente imunoglobulinas aderidas aos eritrócitos (Garden *et al.* 2019).

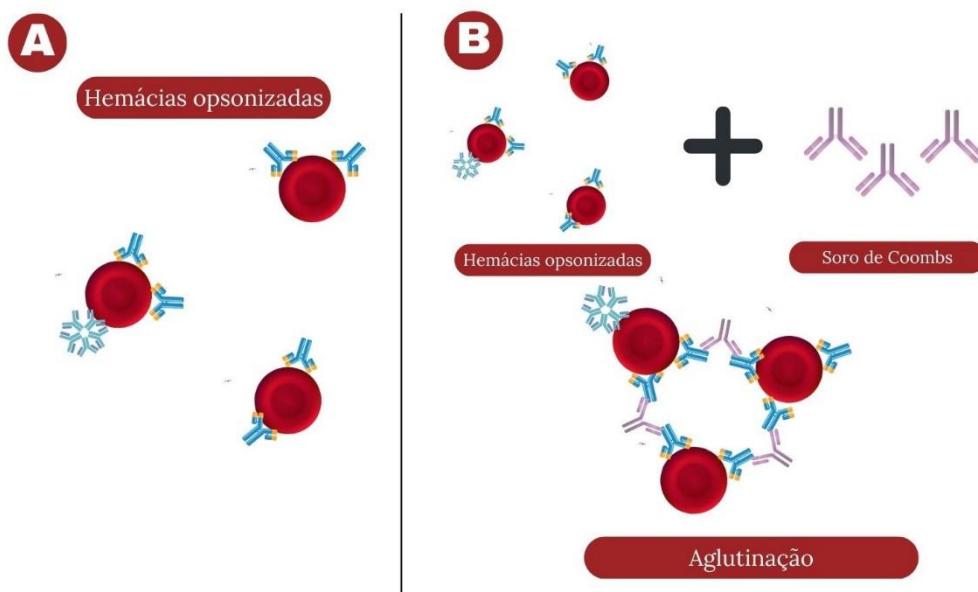
Teste de Coombs

Robin Coombs foi o veterinário responsável pelo desenvolvimento do teste de antiglobulina direto em 1945. Atualmente esse exame continua sendo uma importante ferramenta que auxilia no diagnóstico tanto na medicina humana quanto na veterinária (Giger, 2021, p. 1). O teste de antiglobulina direto (TAD) é capaz de sinalizar imunoglobulinas e complemento ligados às hemácias (Archer *et al.* 2013).

O teste utiliza um soro policlonal normalmente preparado em coelhos que revela imunoglobulinas aderidas às células eritróides (Thrall *et al.* 2015). No soro está presente anticorpos direcionados contra imunoglobulinas IgG, IgM e frações do sistema complemento como o C3 que se ligam

a estas imunoglobulinas ligadas aos eritrócitos de uma amostra de sangue do animal e resulta em aglutinação das células. O TAD possui sensibilidade de 61% a 82% (Garden *et al.* 2019; Macneill *et al.* 2019). Vários fatores influenciam na eficácia e sensibilidade do teste, sendo eles: (1) tratamento farmacológico prévio (2) baixa concentração sérica de imunoglobulinas (3) temperatura de manuseio do reagente, pois se estiver frio irá inibir atividade dos anticorpos e resultar em falso negativo, e se aquecido além do recomendado irá aumentar a atividade dos anticorpos, levando a reações cruzadas não específicas e resultando em falso positivos, (4) dificuldades técnicas como lavagem incompleta, pois a lavagem tem a função de eliminar anticorpos não específicos, e se realizada de maneira inadequada irá resultar em falso positivo, (5) contaminação da amostra ou reagente e (6) transfusão sanguínea prévia (Macneill *et al.* 2019). Mesmo que realizado de maneira adequada, sem intercorrências, devido a sensibilidade não ser absoluta, uma parte dos animais testados ainda podem testar falso negativos. Devido a este fato, apenas TAD negativo não exclui diagnóstico de AHIM (Daisley, 2015, p. 1).

Figura 3: A) Hemácias opsonizadas, B) Aglutinação das hemácias opsonizadas após adição do soro de coombs



Fonte: Arquivo Pessoal

Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é outro método que permite a identificação de anticorpos aderidos às hemácias (Macneill *et al.* 2019). Possui uma vantagem sobre o TAD por fornecer um resultado quantitativo da porcentagem de hemácias positivas com anticorpos. Dessa forma há a possibilidade de associação com as características clínico – laboratoriais para acompanhamento do sucesso terapêutico (Garden *et al.* 2019).

Ao agrupar imunoglobulinas e fração do sistema complemento IgG, IgM, IgA e C3B revela uma sensibilidade de 67% e especificidade de 87,5% a 92%. Estudos revelaram que a imunossupressão induzida por

fármacos imunossupressores diminui a sensibilidade do teste, portanto é recomendado a realização do teste antes do início da terapia (Garden *et al.* 2019).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A AHIM é uma doença de alta relevância na clínica veterinária, tendo um alto índice de acometimento em fêmeas de meia idade, sendo algumas raças mais predispostas. Apesar da sua alta taxa de mortalidade, ainda há escassez de informações na literatura relacionadas ao diagnóstico desta doença e isso impacta negativamente no sucesso do tratamento. Desse modo, percebe-se a importância do processo fisiopatológico desta

doença, facilitando assim a compreensão dos sinais clínicos e alterações laboratoriais. Os exames laboratoriais de rotina são ferramentas que podem ser utilizadas a favor do profissional, pois podem dar indícios de hemólise, no entanto é de extrema importância que o médico veterinário saiba interpretar os exames e traçar um raciocínio clínico de forma adequada. Os testes de aglutinação, Coombs e citometria de fluxo possuem variabilidade tanto na sensibilidade quanto especificidade. Para casos confirmados de AHIM sem sinais de regeneração, o mielograma se mostra um importante método de diagnóstico para auxiliar no prognóstico.

REFERÊNCIAS

ARCHER, T. et. al. Diagnosis of Immune-Mediated Hemolytic Anemia. **Today's veterinary practice.** 2013 Disponível em: <https://www.todaysveterinarypractice.com/hematology/diagnosis-of-immune-mediated-hemolytic>. Acesso em: 15 de maio de 2024.

BESTWICK, J.P. et al. Splenectomy in the management of primary immune-mediated hemolytic anemia and primary immune-mediated thrombocytopenia in dogs. **Journal of Veterinary internal medicine**, 2022. v.36, n.4, p.1267-1280. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jvim.16469>. Acesso em: 15 de maio de 2024.

BOVENS, C. IMHA disease in canines – diagnosis and treatment. **Vet times**, 2017. Disponível em: <www.vettimes.co.uk/app/uploads/wp-post-to->

pdf-enhancedcache/1/imha-disease-in-canines-diagnosis-and-treatment.pdf> Acesso em: 15 de maio de 2024.

DAISLEY, L. Canine immune-mediated haemolytic anaemia. **South African veterinary association.** 2015. Disponível em: <https://www.sava.co.za/vetnews/2015/May/VN%20CPD%20May%202015.pdf> Acesso em: 15 de maio de 2024.

GARDEN, O.A. et al. ACVIM consensus statement on the diagnosis of immunemediated hemolytic anemia in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v.33, n.2, p. 313 - 334, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jvim.15441>> Acesso em: 15 de maio de 2024.

GIGER, U. Letter regarding “Effect of dilution of canine blood samples on the specificity of saline agglutination tests for immune-mediated hemolysis,” original and modified saline agglutination tests vs direct Coombs’ tests. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v.35, p. 1214–1215, 2021. Disponível em: <www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8163119/>. Acesso em: 15 de maio de 2024.

GORENSTEIN, T. G. et al. Primary immune-mediated hemolytic anemia in dogs - literature review. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR.** v.22, n. 2, p. 71 – 75, 2019. Disponível em: <[10.25110/arqvet.v22i2.2019.6065](https://doi.org/10.25110/arqvet.v22i2.2019.6065)> Acesso em: 15 de maio de 2024.

JERICÓ, M. M.; NETO, J. A.; KOGIKA, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos.** 2. ed. p. 1989 – 1995. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

LUCIDI, C. A. et. al. Histologic and cytologic bone marrow findings in dogs with suspected precursor-targeted immune-mediated anemia and associated phagocytosis of erythroid precursors. **Veterinary Clinical Pathology.**

v.46, n.3, p.401-415, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/vcp.12502>>. Acesso em: 15 de maio de 2024.

MACNEILL, A.L. et. al. The utility of diagnostic tests for immune-mediated hemolytic anemia. **Veterinary Clinical Pathology**. V.48, n.1, p. 7-16, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/vcp.12771> Acesso em: 06 de maio de 2024.

MARTINATO, F. **Alterações laboratoriais em cães com anemia hemolítica imunomediada secundária (AHIM) responsiva e não responsiva.** 2020. 42 p. Dissertação (Mestrado em Patologia animal) - Faculdade de ciências agrárias e veterinária de Jaboticabal, Universidade estadual paulista – Unesp, Jaboticabal, 2020.

NELSON, R. W.; COUTO, C. G. **Medicina Interna de Pequenos Animais.** 6. ed. P. 1216 – 1219. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023.

OLIVEIRA, R. A.; PEREIRA, J.; BEITLER B. **Mielograma e imunofenotipagem por citometria de fluxo em hematologia - prática e interpretação.** 1. ed. P. 3. São Paulo: Roca, 2015.

PEREIRA, S. S. **Anemia hemolítica imunomediada em cães.** 2016. 107p. Dissertação (mestrado em medicina veterinária) - Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila real, 2016.

PIEK, C. J. et al. High intravascular tissue factor expression in dogs with idiopathic immune-mediated haemolytic anaemia. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.144, 3rd – 4rd ed., p. 346 – 354, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.08.010>> Acesso em: 15 de maio de 2024

SUN, P.L.; JEFFERY, U. Effect of dilution of canine blood samples on the specificity of saline agglutination tests for immune-mediated hemolysis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v.34, n.6, p. 2374-2383, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/jvim.15945>>. Acesso em: 15 de maio de 2024.

THRALL, M. A. et. al. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária.** 2.ed. p. 198 - 202. São Paulo: Roca, 2015.

TIZARD, I. **Imunologia veterinária.** 10. ed. p. 417 - 418. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2023

ZACHARY, J. F. **Bases da patologia veterinária.** 6. ed. p.733. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018