

Avaliação hematológica e da função renal em cães com AHIM

Hematological and Renal Function Evaluation in Dogs with IMHA

Lívia Fagundes Moraes¹, Regina Kiomi Takahira¹ & Marjorie de Assis Golim²

ABSTRACT

Background: The IMHA is a common cause of anemia in dogs and characterized by direct destruction or phagocytosis of erythrocytes opsonized by IgG, IgM and/or complement. The diagnosis is based on the identification of erythrocytes destruction in the presence of anti-erythrocyte antibodies, producing spherocytes, auto-agglutination, Coomb's test or flow cytometry test positive, in addition to anemia and clinical signs of hemolysis. The renal biochemical profile and urinalysis may reveal important changes due to the severity of the kidney damage. The aim of this study were to evaluate the incidence of hematological and renal abnormalities, and the prevalence of immunoglobulin's classes involved in IMHA.

Materials, Methods & Results: In a total of 87 anemic dogs were selected and tested by Coomb's test, flow cytometry (FC), and auto-agglutination, along with CBC, reticulocyte count, renal profile (ureia and creatinine), hemoparasite search in peripheral blood smears, and *Ehrlichia* sp. and leptospirosis tests. The results were analyzed by *t* test or Mann-Whitney with 5% of significance. Therefore, 61 dogs (70.11%) were positive for IMHA by FC, 31 (35.63%) by Coomb's test, and 24 (27.58%) by auto-agglutination. There was not a predominance of IgG or IgM involvement. The hematological and clinical changes in dogs with IMHA included macrocytic, hypochromic regenerative anemia, and reticulocytosis, as well as icterus, fever, auto-agglutination, hyperglobulinemia and bilirrubinuria. Spherocytosis was found in 9.8% of dogs with IMHA, and 29.5% of dogs had leukocytosis, 39.6% neutrophilia, and 72.1% thrombocytopenia. Mostly of cases of IHMA (74.6%) were attributed to infectious diseases and associated with *Ehrlichia* sp. (secondary IMHA), 21.4% of dogs with IMHA had azotemia, and 51.8% had increased urine protein creatinine ratio.

Discussion: The FC was confirmed as a more sensitive technique for the diagnosis of IMHA compared to auto-agglutination and Coomb's tests. The auto-agglutination test was more specific than the Coomb's test, however the last one was more sensitive. The similar prevalence of IgG and IgM in IMHA did not indicate which class of immunoglobulin would be a better choice for diagnosis by the FC technique. Antibodies are produced against normal red cells (primary or idiopathic IMHA) or to red cells that are antigenical changed by the action of drugs, neoplasia or infectious diseases (leptospirosis, babesiosis, canine ehrlichiosis), known as secondary IMHA. This study alerts for the high prevalence of IMHA in dogs, in most cases characterized by a regenerative anemia associated with intense thrombocytopenia and secondary to *Ehrlichia* sp. in areas endemic to this infectious disease. In Brazil, the presence of endemic areas for various infectious diseases may contribute to the high prevalence of secondary IMHA. Kidney damage may occurs because tissue hypoxia increases the risk of progressive injury, due to acute hematocrit decrease (below 22%), leading to renal tubular necrosis, whereas the deposition of immune complexes, mainly in the renal parenchyma, may aggravate the renal injury, further complicating the clinical state of the animal. Direct renal injury caused by crystallization of free hemoglobin in the renal tubules may result in renal azotemia. Hypoxia and nephrotoxicity caused by hemoglobinemia reflects increased liver enzymes and azotemia, respectively. Significant proteinuria and the increase in urine protein creatinine ratio revealed evidence of renal injury in dogs with IMHA.

Keywords: dogs, immune mediated hemolytic anemia, renal disease, *Ehrlichia* sp., hematology.

Descritores: cães, anemia hemolítica imuno-mediada, doença renal, *Ehrlichia* sp., hematologia.

INTRODUÇÃO

A anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) em cães é uma causa comum de anemia e caracteriza-se pela destruição direta ou fagocitose das hemácias opsonizadas por IgG, IgM e/ou complemento [18,32].

Os anticorpos podem ser direcionados às hemácias normais (AHIM primária ou idiopática) ou, ainda, às hemácias antigenicamente alteradas pela ação de medicamentos, neoplasias ou doenças infecciosas, sendo nestes casos conhecida como AHIM secundária [13,17,18].

A AHIM é uma reação de hipersensibilidade tipo II na qual as hemácias são destruídas devido à quebra da auto tolerância imune e a produção de anticorpos, da classe IgG ou IgM. Estes anticorpos geralmente reconhecem as glicoproteínas de membrana dos eritrócitos [33].

O diagnóstico das AHIM está fundamentado na identificação da destruição das hemácias na presença de anticorpos anti-hemácias, cuja situação depara-se com o encontro da presença de esferócitos, auto-aglutinação, teste de Coomb's ou citometria de fluxo positivos, além da anemia e sinais de hemólise (icterícia, hiperbilirrubinemia, bilirrubinúria, hemoglobinemia e/ou hemoglobinúria) [5].

Geralmente as anemias são regenerativas e o perfil bioquímico renal somado à urinálise podem revelar alterações importantes face à gravidade da lesão renal causada pela hipóxia ou por deposição de imuno-complexos [33,36].

Neste trabalho objetivou-se caracterizar as alterações hematológicas e renais de cães com AHIM, somados à avaliação clínico-laboratorial de acordo com a resposta à anemia, e possível estabelecimento da etiologia. Objetivou-se também avaliar os principais testes diagnósticos para AHIM e estabelecer a prevalência das classes de imunoglobulinas (IgG ou IgM) envolvidas.

MATERIAIS & MÉTODOS

Animais

Foram selecionados 87 cães atendendo aos seguintes critérios: hematócrito inferior a 20%, configurando um quadro de anemia tanto regenerativa quanto arregenerativa, sem histórico prévio de tratamento com corticóides ou transfusão sanguínea recente e apresentar ao menos um sinal clínico (hepato ou esplenomegalia, icterícia, dispneia, taquicardia, febre) ou

laboratorial (esferócitos, auto-aglutinação, hiperproteïnemia, hiperglobulinemia, bilirrubinúria) comumente associado à AHIM ou possuir pré-disposição racial (Cocker Spaniel, Old English Sheepdog, Doberman, Pinscher miniatura, Collie e Setter Irlandês). Foram excluídos os animais com outras causas conhecidas de anemia, tais como doença renal crônica, aplasia medular induzida por drogas como estrógeno ou agentes quimioterápicos e casos de verminose.

Análises hematológicas

Estes cães foram submetidos ao teste de Coomb's, citometria de fluxo (CF) e auto-aglutinação para o diagnóstico de AHIM e também foram avaliados quanto ao hemograma e contagem de reticulócitos, perfil renal, pesquisa de hematozoários em sangue periférico, além do teste para *Ehrlichia* sp., pela técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase). A sorologia para leptospirose foi realizada apenas para os cães positivos para AHIM.

Para a padronização da técnica de CF foi formado um grupo controle com 19 cães saudáveis selecionados com base nos exames físico e laboratoriais, provenientes do canil do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), UNESP campus de Botucatu, SP. Todos os cães anêmicos foram obtidos a partir da casuística do atendimento no Hospital Veterinário da FMVZ Unesp, campus de Botucatu, SP.

O teste de auto-aglutinação foi avaliado macro e microscopicamente em solução salina (cloreto de sódio 0,9%) na diluição 5:1 [35].

O teste de Coomb's foi realizado a partir da utilização de antiglobulina policlonal caprina (anti-IgG, IgM e C3), de acordo com as especificações do fabricante¹.

A CF foi realizada no equipamento FacScalibur², utilizando-se o software CELLQuest. 100 µL do concentrado de hemácias foram diluídos em 4,9 mL de solução PBS (tampão fosfato-salino). Esta solução foi centrifugada, em seguida foi removido o sobrenadante e acrescentou-se 4,9 mL de solução PBS para uma nova lavagem e subsequente centrifugação. Este procedimento foi realizado por mais duas vezes, obtendo uma solução de hemácias a 2%. Para utilização na técnica de CF, obteve-se uma solução de hemácias a 1%. Foram utilizados anticorpos policlonais monoespecíficos caprinos³ anti-IgG (anti-IgG de cão marcado com fluoresceína - FITC) e anti-IgM (anti-IgM de cão marcado com FITC). Foram utilizados três tubos, sendo o primeiro

tubo, um tubo controle contendo apenas 100 µL da solução de hemácias a 1%. Ao segundo e terceiro tubo foi adicionado 1 µL (1 mg/mL) de antiglobulina policlonal caprina anti-IgG ou anti-IgM de cão, respectivamente. Os tubos foram incubados por 20 min em ambiente escuro em temperatura ambiente. As hemácias foram novamente lavadas com 1,0 mL de PBS. A leitura foi realizada imediatamente após a preparação da amostra.

A população de hemácias foi selecionada com base nos parâmetros FSC (forward scatter - tamanho) e SSC (side scatter - granulidade), e a presença de IgG e IgM na superfície das células foi avaliada pela intensidade de fluorescência (FL1). Foram adquiridos 20.000 eventos para confirmação do diagnóstico de AHIM e classificação da classe de imunoglobulina (IgG ou IgM) envolvida.

A seleção da população de hemácias foi realizada por meio de “gate”, desenhado com base nos parâmetros FSC e SSC, conforme recomendado na literatura [16,29,40]. A utilização de “gate” é importante para excluir qualquer sinal oriundo de contaminação por plaquetas ou debris celulares [40]. Adotou-se um valor de corte para positividade com base na média das porcentagens de células marcadas dos cães controles + 2 DP (desvio padrão), baseado em estudos anteriores [27,40]; sendo consideradas positivas para AHIM amostras com fluorescência para IgG maior que 16,72% e para IgM maior que 9,56%.

A CF foi escolhida como teste padrão-ouro, pois diversos trabalhos anteriores evidenciaram sua maior sensibilidade e especificidade em relação aos testes de auto-aglutinação e Coomb's [16,29,39,40].

O hemograma foi realizado no contador automático de células Hemascreeen 18⁴ e incluiu os seguintes parâmetros: eritrograma (hematócrito, contagem de hemácias, hemoglobina, volume corpuscular médio (VCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice de distribuição do diâmetro dos eritrócitos (red cell distribution width - RDW), leucograma (contagem de leucócitos totais, valores relativos e absolutos), contagem de plaquetas, volume plaquetário médio (VPM) e amplitude de distribuição das plaquetas com base em seu tamanho (platelet distribution width - PDW). Para a determinação da contagem de reticulócitos foi utilizada a técnica manual em esfregaços sanguíneos após coloração com Novo Azul de Metileno e incubação em banho-maria a 37°C por 15 min. As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em esfregaços

sanguíneos corados com panótico rápido (coloração de Romanowsky), por microscopia óptica em aumento de 100x em um total de 100 leucócitos observados na monocamada de hemácias [12].

Análises bioquímicas e testes para as doenças infecciosas

Para avaliação da função renal foram realizadas as dosagens plasmáticas de ureia⁵ e creatinina⁶ pelo método enzimático colorimétrico e cinético, respectivamente; além do estabelecimento da relação proteína/creatinina urinárias e do exame de urina. A determinação da proteína urinária foi realizada por teste colorimétrico⁷ específico para baixas concentrações. A determinação da creatinina urinária foi realizada também pelo método cinético. Todas as análises bioquímicas foram realizadas no equipamento automatizado COBAS Mira plus⁸.

Os testes de PCR (reação em cadeia da polimerase) para *Ehrlichia* sp., sorologia para leptospirose e pesquisa de hematozoários em esfregaço sanguíneo foram utilizados para se estabelecer a classificação das AHIM em primárias ou secundárias. As AHIM primárias foram confirmadas nos casos negativos para estes testes e sem histórico de administração de medicamentos ou vacinas em um período de quatro semanas, neoplasia ou outras doenças infecciosas.

Urinálise

O exame de urina consistiu em avaliação física, química e do sedimento. O exame químico foi realizado por meio de tiras reagentes Combur 10 Test⁸. A densidade urinária por refratometria e análise do sedimento urinário por avaliação microscópica do sedimento fresco em aumento de 40X [12]. As amostras, em sua maioria, foram obtidas por cistocentese.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise descritiva para a avaliação da incidência das alterações hematológicas e renais, bem como da incidência da classe de imunoglobulina envolvida. Os resultados foram agrupados de acordo com a classificação da resposta à anemia (regenerativa ou arregenerativa) e quanto ao tipo de AHIM (primária ou secundária). As médias das variáveis obtidas para os referidos grupos (positivos ou negativos para AHIM) foram comparadas pelo teste *t* ou Mann-Whitney, de acordo com o tipo de distribuição da variável, ao nível de 5% de significância, no programa Sigmastat 3.1.

RESULTADOS

Dos 87 cães avaliados, 60 cães (68,96%) foram positivos para AHIM pela técnica de CF, ao passo que apenas 31 (35,63%) foram positivos no teste de Coomb's e 24 (27,58%) no teste de auto-aglutinação.

É importante ressaltar que dos 60 cães com diagnóstico de AHIM, seis cães foram positivos para o teste de auto-aglutinação e negativos para o teste de Coomb's e 13 foram negativos para o teste de auto-aglutinação e positivos para o teste de Coomb's. A Tabela 1 apresenta a relação entre os resultados dos testes utilizados para o diagnóstico de AHIM e a resposta à anemia. Quatro cães apresentaram resultados falsos positivos para o teste de Coomb's, pois estes foram negativos na CF.

Em dois casos, o resultado negativo para a CF não foi compatível com a suspeita clínica e outros achados laboratoriais; no entanto, para fins estatísticos e padronização do diagnóstico, estes animais foram incluídos no grupo de cães negativos para AHIM. Estes cães apresentaram resultados positivos nos testes de auto-aglutinação e Coomb's, anemia regenerativa macrocítica hipocrômica com reticulocitose, icterícia, febre e PCR positivo para *Ehrlichia* sp. Além disso, um dos casos também foi observado esferócitos em esfregaço sanguíneo. A Tabela 2 resume a especificidade e sensibilidade, em diferentes estudos, dos principais métodos diagnósticos para AHIM.

Não houve predomínio de uma classe de imunoglobulina (Ig) envolvida nas AHIM, pois 58 cães foram positivos tanto para IgG quanto para IgM. Apenas um

cão foi positivo somente para IgM (27,43% de hemácias fluorescentes) e um outro positivo somente para IgG (34,63% de hemácias fluorescentes), sendo que nestes casos a AHIM foi detectada apenas pela técnica de CF.

As alterações clínico-laboratoriais dos 87 cães avaliados estão resumidas na Tabela 3. A maioria dos cães positivos para AHIM não possuía raça definida e, dentro das raças predispostas à AHIM, quatro eram Cocker Spaniel e um Collie, sendo três casos de AHIM primária em cães da raça Cocker Spaniel. Não houve prevalência de sexo ou raça.

Neste estudo, as alterações clínico-laboratoriais mais comuns nos cães positivos incluíram esplenomegalia, icterícia, febre, auto-aglutinação, hiperglobulinemia e bilirrubinúria.

Para as variáveis do hemograma, os cães com AHIM apresentaram valores de metarrubrócitos e contagem de reticulócitos significativamente maiores ($P < 0,05$) que os animais anêmicos negativos para AHIM ($n = 27$). Um total de 9,8% dos cães com AHIM apresentaram esferocitose. Neste estudo, 58,3% (35/60) dos cães positivos apresentaram anemia regenerativa e o grau de regeneração foi mais intenso quando comparado com outras causas de anemias em cães, apesar da intensidade da anemia não apresentar diferença estatística (Tabela 4).

Apenas 30% (18/60) dos cães positivos apresentaram leucocitose e 38,3% (23/60) neutrofilia. Os 18 cães com leucocitose também apresentaram sinais de hemólise como icterícia, bilirrubinúria e/ou auto-aglutinação das hemácias. A Tabela 5 resume os resultados encontrados no leucograma dos animais anêmicos.

Tabela 1. Porcentagens de positividade e negatividade nos testes de auto-aglutinação, Coomb's, citometria de fluxo e presença de esferócitos em relação à classificação da anemia nos 87 cães avaliados para anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM).

Teste para Diagnóstico das AHIM	Classificação da Anemia	Resultados Positivos	Resultados Negativos
Auto-aglutinação	Regenerativa	17,2% (15/87)	32,2% (28/87)
	Arregenerativa	10,3% (09/87)	40,2% (35/87)
Teste de Coomb's	Regenerativa	20,7% (18/87)	29,9% (26/87)
	Arregenerativa	14,9% (13/87)	34,5% (30/87)
Citometria de Fluxo	Regenerativa	40,2% (35/87)	10,3% (09/87)
	Arregenerativa	28,7% (25/87)	20,7% (18/87)
Esferócitos	Regenerativa	6,9% (06/87)	43,7% (38/87)
	Arregenerativa	0	49,4% (43/87)

Tabela 2. Comparação da sensibilidade e especificidade, em diferentes estudos, das técnicas de citometria de fluxo ao teste de Coomb's para o diagnóstico de anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) em cães.

Porcentagem	CF	Coomb's	Referência
Sensibilidade	100	58	Wilkerson <i>et al.</i> 2000
	92	53	Quigley <i>et al.</i> 2001
	84,6	68,4	Pereira 2006
	88	---	Morley <i>et al.</i> 2008
Especificidade	87,5	100	Wilkerson <i>et al.</i> 2000
	100	100	Quigley <i>et al.</i> 2001
	65,5	100	Pereira 2006
	74,2	---	Morley <i>et al.</i> 2008

Tabela 3. Alterações clínico-laboratoriais de cães positivos e negativos para anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM).

Alteração clínica ou laboratorial	Positivo para AHIM	Negativo para AHIM
Hepatomegalia	8,3% (05/60)	3,7% (01/27)
Esplenomegalia	20% (12/60)	22,2% (06/27)
Icterícia	28,3% (17/60)	33,3% (09/27)
Febre	28,3% (17/60)	48,1% (13/27)
Raça predisponente	8,3% (05/60)	11,1% (03/27)
Dispneia	6,7% (04/60)	3,7% (01/27)
Taquicardia	3,3% (02/60)	3,7% (01/27)
Esferócito	10% (06/60)	0
Auto-aglutinação Positiva	35% (21/60)	11,1% (03/27)
Hiperproteinemia	31,7% (19/60)	22,2% (06/27)
Hiperglobulinemia	66,7% (40/60)	70,4% (19/27)
Bilirrubinúria	44,6% (25/56)	50% (08/16)
Idade	Média 5,54 ± 3,75 anos	Média 4,98 ± 4,37 anos
Sexo	Fêmea 30	Fêmea 12
	Macho 30	Macho 15

Tabela 4. Médias e desvios-padrão dos animais positivos (n = 60) e negativos (n = 27) para anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) em relação à hematimetria, contagem de reticulócitos e plaquetas.

	Hemácias (/microlitro)	Hemoglobina (g/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	CHCM (%)	RDW	Reticulócitos (/microlitro)	Plaquetas (/microlitro)
POS.	1,83 ± 0,72	4,9 ± 1,39	15,44±3,91	96,66 ± 51,38	31,77 ± 4,43	21,92 ± 12,41	146.829 ± 156.402	111.072 ± 134.518
NEG.	2,09 ± 0,82	4,99 ± 1,73	15,89±5,08	79,69 ± 14,39	31,33 ± 3,53	19,52 ± 10,80	66.511 ± 111.016	138.994 ± 150.018

POS: Positivo; NEG: Negativo.

Tabela 5. Médias e desvios-padrão dos animais positivos (n = 60) e negativos (n = 27) para anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) em relação à leucometria total e contagem diferencial de leucócitos (/microlitro).

Animal	Leucócitos Totais (x10 ³)	Metamiel.	Bastão	Neutrófilo	Linfócito	Eosinófilo	Monócito	Metarrub.
POS	14,49 ± 12,27	33,1 ± 105,1	223,9 ± 435,1	12.424,9 ± 10.231,1	1.219,3 ± 1.282,3	157,4 ± 270,7	1.108,2 ± 1.530,9	11,9 ± 22,3
NEG	11,23 ± 13,1	11,1 ± 52,0	63,1 ± 185,5	11.769,4 ± 11.897,2	914,0 ± 858,8	196,8 ± 221,9	970,2 ± 1.456,9	5,27 ± 21,9

POS: Positivo; NEG: Negativo; Metamiel: Metamielócito; Metarrub: Metarrubrícto.

A maioria dos cães (72,1%) apresentou trombocitopenia. Houve diferença estatística para VPM, com uma média maior para os cães negativos para AHIM ($13,78 \pm 2,94$; $P = 0,012$). Os cães positivos não apresentaram diferença estatística quando comparados com os cães saudáveis (média $11,89 \pm 2,94$).

Todos os cães foram testados para *Ehrlichia* sp. e a sorologia para leptospirose foi realizada apenas para os cães positivos para AHIM. 76,7% (46/60) dos casos de AHIM foram secundários a doenças infecciosas, em sua maioria associadas à *Ehrlichia* sp. (89,1%).

Apenas cinco casos (8,3%) foram associados à leptospirose pelos sorovares canicola, copenhageni, hardjo e grippotyphosa. Dois cães com titulação positiva para leptospirose também foram positivos para *Ehrlichia* sp. Também foram diagnosticados um caso de cinomose e um de babesiose a partir da observação das respectivas inclusões em esfregaço sanguíneo e um caso de neoplasia renal.

As AHIM primárias (14 cães - 23,3%, sendo sete fêmeas) foram confirmadas nos casos negativos para os testes de PCR e sorologia para leptospirose e sem histórico de administração de medicamentos ou vacinas em um período de quatro semanas, neoplasia ou outras doenças infecciosas. Dentre estas AHIM primárias, 11 cães apresentaram anemia regenerativa e nove apresentaram teste de auto-aglutinação positivo.

O exame de urina foi realizado em 56 dos 60 animais positivos para AHIM, devido à impossibilidade de coleta em quatro casos (pouca urina na bexiga, incontinência urinária ou início de fluidoterapia antes da coleta).

A isostenúria foi observada em seis cães. A maioria dos cães apresentou proteinúria ($n = 42$) [30 a 500 mg/dL], sendo esta mais significativa nos cães positivos e semelhante para as AHIM primárias e secundárias. Os dados referentes à avaliação da proteinúria estão descritos na Tabela 6. Houve diferença significativa para a relação proteína: creatinina urinárias ($P = 0,043$). Um total de 21,4% dos cães positivos para AHIM apresentaram azotemia e 51,8% aumento da relação proteína: creatinina urinária (Tabela 7).

Apenas 25 cães apresentaram bilirrubinúria positiva ao teste com fita reagente para urinálise, sendo que 14 apresentaram cristais de bilirrubina à sedimentação urinária, e dentre estes, nove apresentaram impregnação por bilirrubina. A bilirrubinúria foi uma alteração laboratorial importante observada em 44,6% dos casos.

No entanto, 39 animais apresentaram reação de sangue oculo positivo (de 1 a 4+) ao teste com fita reagente para urinálise, quatro apresentaram reação traço e 13 animais apresentaram resultado negativo. Seis cães apresentaram hematúria discreta a moderada (até 50 células/campo em aumento de 400x) e nove apresentaram leucocitúria discreta a moderada. Apenas dois cães apresentaram bacterúria significativa.

Para as concentrações de ureia e creatinina plasmáticas não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos dos cães positivos e negativos para AHIM, no entanto, as médias dos animais positivos ($74,8 \pm 65,5$ mg/dL e $1,15 \pm 0,83$ mg/dL, respectivamente) foram maiores quando comparadas aos animais negativos (Tabela 7).

Tabela 6. Grau de proteinúria dos cães com anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM) primária, secundária e cães negativos para AHIM.

Animal	Proteinúria Negativa	Proteinúria (< 30 mg/dL) Traços	Proteinúria (30 a 500 mg/dL) 1+ a 3+	Tipos de Cilindrúria
AHIM 1 ^a	1/13 (7,7%)	3/13 (23,1%)	10/13 (76,9%)	Hialino 1/13 Granuloso 2/13 (23,1%)
AHIM 2 ^a	0/43 (0%)	10/43 (23,2%)	32/43 (74,4%)	Hialino 6/43 Granuloso 9/43 (34,9%)
NEG.	0/16 (0%)	5/16 (31,2%)	11/16 (68,7%)	Hialino 3/16 Granuloso 2/16 (31,2%)

NEG: Negativo.

Tabela 7. Médias e desvios-padrão das variáveis utilizadas para avaliação da função renal de cães positivos (n = 56) e negativos (n = 16) para anemia hemolítica imuno-mediada (AHIM).

	Ureia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	Azotemia	Relação P: C Urínárias	Aumento Relação P: C	Densidade Urinária
POS	74,8 ± 65,5	1,15 ± 0,83	21,4%	1,33 ± 1,02	51,8%	1,028 ± 0,015
NEG	64,9 ± 44,2	1,14 ± 0,64	25,0%	0,75 ± 0,42	18,7%	1,022 ± 0,009
Valor de P	0,597	0,601	---	0,043	---	0,202

POS: Positivo; NEG: Negativo; Relação P: C - Relação proteína: creatinina urinárias.

DISCUSSÃO

A auto-aglutinação em salina positiva é altamente sugestiva de AHIM, pois neste estudo todos os cães positivos para este teste também foram positivos na CF. Em grande parte dos casos, a auto-aglutinação está relacionada à presença de IgM ou grandes quantidades de IgG. Entretanto, uma aglutinação negativa somente é capaz de afirmar que o animal não possui anticorpos aglutinantes, não excluindo a suspeita de AHIM [15,17]. Segundo estudos anteriores, a prevalência de auto-aglutinação nos casos de AHIM é de 40% a 87%; superior à prevalência deste estudo (27,58%) [30,32,38].

A especificidade do teste de Coomb's foi menor do que 100%, discordando de trabalhos anteriores [27,29,40]. Para Morley *et al.* [22], a CF é mais sensível do que o teste de Coomb's para a detecção de anticorpos anti-hemácias, no entanto com especificidade semelhante.

Um dos principais fatores relacionados a resultados falsos positivos para o teste de Coomb's é a presença de hipergamaglobulinemia, observada tanto em pacientes com gamopatia monoclonal quanto policlonal. Acredita-se que este resultado esteja relacionado à ligação não específica das imunoglobulinas devido à alta concentração plasmática [37]. Nos quatro casos falsos positivos deste estudo, os cães apresentaram hiperglobulinemia, podendo assim justificar esse resultado.

O teste de Coomb's possui uma alta especificidade, porém uma menor sensibilidade, por volta de 60% dos casos [32]. Um teste negativo não exclui o diagnóstico de AHIM. Resultados falsos negativos estão relacionados a uma quantidade insuficiente de anticorpos detectáveis, mas suficiente para remoção *in vivo* das hemácias e aparecimento de sinais clínicos,

ou ainda, a uma relação inapropriada entre quantidade de antiglobulina e anticorpo (efeito pró-zona) [13,37]. Estes dados confirmam a menor porcentagem de positividade encontrada neste estudo quando comparada com a CF para o diagnóstico de AHIM.

A CF é capaz de identificar anticorpos ligados a hemácias em 8% dos casos de anemias não relacionadas à AHIM (falso positivo), enquanto no teste de Coomb's a probabilidade de um resultado negativo em um paciente com AHIM é de 38% [40]. No presente estudo os casos falsos negativos na técnica de CF corresponderam a 7,4% (2/27). A CF é um método quantitativo rápido, altamente sensível para o diagnóstico de AHIM quando comparada aos testes de auto-aglutinação e Coomb's, além de requerer uma pequena quantidade de amostra para o teste [22,29].

Este estudo reafirma a maior sensibilidade da técnica de CF para o diagnóstico de AHIM em relação aos testes de auto-aglutinação e de Coomb's, que apresentaram uma sensibilidade ainda menor quando comparados com estudos anteriores [30,32,38]. Entretanto, quando comparado com o estudo de Pereira [27], as porcentagens de positividade nos respectivos testes foram superiores.

A CF é facilmente aplicada na rotina clínica, tendo como fator limitante a aquisição do equipamento específico para processamento das amostras. Casos suspeitos de AHIM, mas negativos para os testes de auto-aglutinação e Coomb's não devem ser descartados, pois a CF pode ser conclusiva nestas situações.

O predomínio dos casos de AHIM causados pela combinação de IgG e IgM reafirma os resultados encontrados em estudos anteriores [22,29]. Cães anêmicos com AHIM apresentam maiores porcentagens de imunoglobulinas (Ig) ligadas a hemácias, principalmente de IgG, se comparados com outras doenças imuno-mediadas. A quantificação dos níveis destas Ig

pode ser utilizada para monitoramento da eficácia da terapia imunossupressiva, principalmente em cães com AHIM, pois há um rápido decréscimo das porcentagens destas Ig após o início do tratamento, antes mesmo da constatação de mudanças no hematócrito ou presença de reticulocitose [22].

Baixas porcentagens de Ig ligadas a hemácias estão normalmente presentes em cães saudáveis e representam a detecção de hemácias senescentes a serem removidas da circulação pelo sistema monocítico fagocitário. Este antígeno provavelmente é uma proteína de membrana que é expressa ou exposta em hemácias mais velhas [2,22,27,29], justificando assim, a baixa marcação de IgG e IgM nos cães saudáveis utilizados como controle.

Em outro estudo também não foi encontrada relação entre AHIM e sexo [15]. A média de idade dos animais positivos é semelhante à relatada em trabalhos anteriores [11,15,18,30,38]. Em média, os cães positivos possuíam idade superior aos cães negativos, no entanto sem diferença estatística.

A literatura relata que 35% dos cães com AHIM primária apresentavam febre [7]. Os sinais clínicos são inespecíficos e estão associados à anemia, como fraqueza, letargia, intolerância ao exercício e palidez de mucosas. Os sinais podem ser agudos ou crônicos e incluem também anorexia, vômito, diarreia, febre, icterícia, desconforto abdominal, taquicardia, dispneia, alteração na coloração da urina, esplenomegalia e menos comumente, hepato e linfadenomegalia [9,18,25].

Cães icterícos apresentando auto-aglutinação são potencialmente candidatos ao desenvolvimento de tromboembolismo, principalmente pulmonar, com maiores chances de óbito se comparados com animais que não a manifesta [14,15,25].

As AHIM se caracterizam por uma anemia regenerativa, macrocítica, hipocrômica, reticulocitose e com média de hematócrito semelhante ($15,44 \pm 3,91$) a estudos anteriores [5,11,15,28,30].

Evidências de anisocitose e aumento de RDW se relacionam a presença de hemácias grandes e pequenas na circulação, ou seja, presença de reticulócitos e esferócitos, respectivamente [6]. Caso a doença apresente um curso agudo sem tempo suficiente para se gerar uma resposta adequada, em um primeiro momento, a anemia é caracterizada como arregenerativa. No entanto, em cerca de um terço dos casos, os anticorpos podem ser direcionados contra precursores medulares

eritróides ou a AHIM pode levar a alterações no microambiente medular e prejudicar a eritropoiese, levando a uma anemia arregenerativa de fato [10,13,15]. Não foi possível a realização do mielograma dos animais que apresentaram uma anemia arregenerativa (25/60), portanto há apenas a suspeita de AHIM contra os precursores medulares.

A combinação de diversos mecanismos pode resultar em leucocitose nos casos de AHIM, como necrose tecidual, a presença de citocinas que estimulam uma hiperplasia mielóide, somadas a uma maior liberação medular, demarginação de neutrófilos e diminuição da migração destas células para tecidos com baixa perfusão e com lesões necróticas [19]. Uma hemólise intravascular intensa pode acarretar em uma intensa leucocitose e uma resposta febril [6].

O prognóstico da AHIM é reservado na maioria dos casos. Alterações laboratoriais incluindo anemia com ausência de regeneração, leucocitose e trombocitopenia intensas, auto-aglutinação, icterícia, hiperbilirrubinemia, refletem em um prognóstico desfavorável [5,15,38].

Os valores médios obtidos para plaquetas mostraram-se inferiores àqueles descritos para as anemias decorrentes de outras etiologias, apesar da ausência de diferença estatística; e 72,1% dos cães apresentaram trombocitopenia, corroborando com estudos anteriores [5,11,32]. Diversos autores relatam a trombocitopenia associada à AHIM [5,11,30,32]. A trombocitopenia em cães com AHIM pode estar relacionada à concomitante destruição imuno-mediada das plaquetas, aumento do consumo devido à vasculite, processos inflamatórios generalizados, CID ou sequestro [32].

Alguns autores relatam que cerca de 20% dos cães apresentam contagem de plaquetas inferior a $50.000/\mu\text{L}$, no entanto neste estudo foi observado um número muito maior de casos (54,2%), sendo esta associada ao aumento da mortalidade e risco de trombose [5,32].

Neste estudo a trombocitopenia observada provavelmente está relacionada à infecção por *Ehrlichia* sp., pois grande parte dos animais apresentaram PCR positivo, sendo esta diminuição relacionada ao consumo devido à vasculite ou destruição imuno-mediada observada nesta doença [25].

Há uma discordância em relação à prevalência das AHIM primárias e secundárias em cães. Tal discordância pode ser decorrente de uma maior prevalência

real da AHIM secundária ou, então, da realização de uma investigação diagnóstica mais detalhada em busca da causa base para a anemia em questão, pois o diagnóstico de AHIM primária é feito por exclusão [1,27,32].

No Brasil, a presença de áreas endêmicas para diversas doenças infecciosas pode contribuir para a maior prevalência de AHIM secundária. No município de Botucatu, SP foi relatada a ocorrência de 30,9% de cães positivos para *Ehrlichia canis* pela técnica de PCR e de 15,3% de cães positivos para 11 sorovares de *Leptospira* sp. pela técnica de soroglutinação microscópica, no entanto estes casos não foram investigados quanto a possibilidade da associação com AHIM [4,21].

Não foram encontrados relatos anteriores sobre a avaliação renal de cães com AHIM. A incapacidade de concentração urinária, assim como a proteinúria e cilindrúria são alguns dos marcadores de lesão renal [25]. Neste estudo, observou-se que os animais apresentaram sinais de lesão renal no momento do diagnóstico, evidenciada por uma proteinúria significativa (75%). A proteinúria persistente de origem renal indica a existência de uma doença renal crônica [35], no entanto como estes cães foram avaliados em um único momento, não foi possível confirmar este quadro.

A proteinúria nos casos de AHIM secundária pode estar associada tanto a lesão renal causada pela *Ehrlichia* sp. quanto a própria doença imuno-mediada, já que houve uma mesma proporção de casos de proteinúria nas AHIM primárias. Em estudos experimentais citados por Neer e Harrus [26] houve um pico de proteinúria em cães com erliquiose, principalmente de albumina, entre 2,5 e 3,5 semanas após infecção.

A bilirrubinúria foi uma alteração laboratorial importante observada em 44,6% dos casos, pois esta pigmentúria é um sinal que precede a icterícia e hemoglobinemias nos casos de hemólise, já que os cães possuem permeabilidade glomerular livre à bilirrubina conjugada (direta) [35].

O aumento, em média, discreto nos valores de ureia e creatinina não descarta a possibilidade de que cães com AHIM apresentem insuficiência renal, já que foram excluídos os casos de anemia associados à evidência de doença renal crônica prévia. O diagnóstico confirmatório de AHIM somente foi realizado após a seleção dos cães atendendo aos critérios determinados, de modo que alguns animais demonstraram uma discreta azotemia apenas após a avaliação laboratorial completa. O perfil bioquímico pode ser importante

para revelar a gravidade da lesão tecidual causada pela hipóxia, pela deposição de imuno-complexos e pela nefrotoxicidade causada pela hemoglobinemias [18,36]. Poucos cães apresentaram isostenúria, o primeiro sinal de perda da função renal [35].

De acordo com a classificação IRIS, a doença renal crônica de cães e gatos é dividida, a partir dos valores de creatinina plasmática, em quatro estágios. Além disso, há uma segunda divisão, em sub-estágios, baseados na proteinúria e pressão sanguínea [3]. Os cães deste estudo, em média, enquadram-se no estágio I da doença renal, pois nesta fase além do valor aumentado de creatinina em até 2,1 mg/dL, há uma proteinúria de origem renal, além de outras alterações incluindo: inadequada capacidade de concentração urinária, sem relação com causas extra-renais, imagem ou palpação anormal dos rins e resultados alterados de biópsia renal.

CONCLUSÕES

A CF se confirmou como uma técnica mais sensível para o diagnóstico de AHIM quando comparada aos testes de auto-aglutinação e Coomb's. O teste de auto-aglutinação é mais específico que o teste de Coomb's, no entanto este último é mais sensível.

A prevalência semelhante de IgG e IgM nas AHIM não privilegia a escolha da classe de Ig envolvida para o diagnóstico pela técnica de CF.

Este estudo alerta para a alta prevalência de AHIM, em grande parte dos casos caracterizada por uma anemia regenerativa associada a uma intensa trombocitopenia.

A maioria dos casos de AHIM é secundária e relacionada à *Ehrlichia* sp. em áreas endêmicas para esta doença infecciosa. Existem indícios de lesão renal associada à AHIM, pois os cães anêmicos apresentam proteinúria significativa e aumento na relação proteína: creatinina urinárias no momento do diagnóstico.

MANUFACTURERS

¹VRMD. Pullman, WA, USA.

²Becton Dickinson. Franklin Lakes, NJ, USA.

³Bethyl Laboratories. Montgomery, TX, USA.

⁴Ebram Produtos Laboratoriais Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

⁵Katal Biotecnológica Indústria e Comércio Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

⁶Laborlab Produtos para Laboratórios Ltda. São Paulo, SP, Brazil.

⁷Microprote Doles Reagentes e Equipamentos para Laboratório Ltda. Goiânia, GO, Brazil.

⁸Roche Diagnóstica Brasil. São Paulo, SP, Brazil.

Funding. The study was supported by FAPESP (Project number 2008/10427-3).

Ethical approval. Ethics commission in animal experimentation (CEPA) approved this study. (Decision No. 165/2008).

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of paper.

REFERENCES

- 1 **Balch A. & Mackin A. 2007.** Canine immune-mediated hemolytic anemia: treatment and prognosis. *Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian*. 29(4): 230-238.
- 2 **Barker R.N. & Elson C.J. 1995.** Red blood cell glycoporphins as B and T-cell antigens in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 47(3- 4): 225-238.
- 3 **Braun J.-P. & Lefebvre H.P. 2008.** Kidney Function and Damage. In: Kaneko J.J., Harvey J.W. & Bruss M.L. (Eds). *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th edn. San Diego: Academic Press, pp.485-528.
- 4 **Bulla C., Takahira R.K., Araújo Jr. J.P., Trinca L.A, Lopes R.S. & Wiedmeyer C.E. 2004.** The relationship between the degree of thrombocytopenia and infection with *Ehrlichia canis* in an endemic area. *Veterinary Research*. 35: 141-146.
- 5 **Carr A.P., Panciera D.L. & Kidd L. 2002.** Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 16(5): 504-509.
- 6 **Cotter S.M. 1992.** Autoimmune hemolytic anemia in dogs. *The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*. 14(1): 53-59.
- 7 **Day M.J. 1996.** Serial monitoring of clinical, haematological and immunological parameters in canine autoimmune haemolytic anaemia. *Journal of Small Animal Practice*. 37: 523-534.
- 8 **Duval D. & Giger U. 1996.** Vaccine-associated immune-mediated hemolytic anemia in the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 10(5): 290-295.
- 9 **Feldman B.F., Zinkl J.G. & Jain N.C. 2000.** *Schalm's Veterinary Hematology*. 5th edn. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1344 p.
- 10 **Giger U. 2005.** Regenerative anemias caused by blood loss or hemolysis. In: Ettinger S.J. & Feldman E.C. (Eds). *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6th edn. St. Louis: Elsevier Saunders, pp.1886-1907.
- 11 **Goggs R., Boag A.K. & Chan D.L. 2008.** Concurrent immune-mediated haemolytic anaemia and severe thrombocytopenia in 21 dogs. *Veterinary Records*. 163(11): 323-327.
- 12 **Hendrix C.M. 2002.** *Laboratory procedures for veterinary technicians*. 4th edn. St. Louis: Mosby, 559 p.
- 13 **Honeckman A.L., Knapp D.W. & Reagan W.J. 1996.** Diagnosis of canine immune-mediated hematologic disease. *Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian*. 18(2): 113-124.
- 14 **Johnson L.R., Lappin M.R. & Baker D.C. 1999.** Pulmonary thromboembolism in 29 dogs: 1985-1995. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 13(4): 338-345.
- 15 **Klag A.R., Giger U. & Shofer F.S. 1993.** Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 42 cases (1986-1990). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 202(5): 783-788.
- 16 **Kucinskiene G., Schuberth H., Leibold W. & Pieskus J. 2005.** Flow cytometric evaluation of bound IgG on erythrocytes of anaemic dogs. *The Veterinary Journal*. 169: 303-307.
- 17 **Mackin A. 2000.** Immune-mediated haemolytic anaemia. In: Day M.J., Mackin A. & Littlewood J.D. (Eds). *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine*. Gloucester: BSAVA, pp.67-77.
- 18 **McCullough S. 2003.** Immune-mediated hemolytic anemia: understanding the nemesis. *The Veterinary Clinics of North America – Small Animal Practice*. 33(6): 1295- 315.
- 19 **McManus P.M. & Craig L.E. 2001.** Correlation between leucocytosis and necropsy findings in dogs with immune-mediated hemolytic anemia: 34 cases (1994-1999). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 218(8): 1308-1313.
- 20 **Miller S.A., Hohenhaus A.E. & Hale A.S. 2004.** Case-control study of blood type, breed, sex, and bacteremia in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 224(2): 232-235.
- 21 **Modolo J.R., Langoni H., Padovani C.R., Shimabukuro F.H., Mendonça A.O., Victoria C. & Silva W.B. 2006.** Investigação soroepidemiológica de leptospirose canina na área territorial urbana de Botucatu, São Paulo, Brasil. Brazilian. *Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 43(5): 598-604.

- 22 Morley P., Mathes M., Guth A. & Dow S. 2008. Anti-Erythrocyte Antibodies and Disease Associations in Anemic and Nonanemic Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 22: 886-892.
- 23 Noble S.J. & Armstrong J. 1999. Bee sting envenomation resulting in secondary immune-mediated hemolytic anemia in two dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 214(7): 1026-1027.
- 24 Nelson O.L. 2005. Use of the D-dimer assay for diagnosing thromboembolic disease in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 41(3): 145-149.
- 25 Nelson R.W. & Couto C.G. 2009. *Small Animal Internal Medicine*. 4th edn. St. Louis: Mosby, 1504p.
- 26 Neer T.M. & Harrus S. 2006. Canine monocytic ehrlichiosis and neorickettsiosis (*E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ruminantium*, *N. sennetsu*, and *N. risticii* infections in: Ehrlichiosis, Neorickettsiosis, Anaplasmosis, and Wolbachia infection. In: Greene C.E. (Eds). *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 3rd edn. St. Louis: Elsevier Saunders, pp.203-216.
- 27 Pereira P.M. 2006. Avaliação de métodos diagnósticos (citometria de fluxo, teste da antiglobulina direta, auto-aglutinação, presença de esféricitos) e achados clínico-laboratoriais na anemia hemolítica imuno-mediada em cães. 92f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal.
- 28 Piek C.J., Junius G., Dekker A., Schrauwen E, Slappendel R.J. & Teske E. 2008. Idiopathic immune-mediated hemolytic anemia: treatment outcome and prognostic factors in 149 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 22: 366-373.
- 29 Quigley K.A., Chelack B.J., Haines D.M. & Jackson M.L. 2001. Application of a direct flow cytometric erythrocyte immunofluorescence assay in dogs with immune-mediated hemolytic anemia and comparison to the direct antiglobulin test. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 13(4): 297-300.
- 30 Reimer M.E., Troy G.C. & Warnick L.D. 1999. Immune-mediated hemolytic anemia: 70 cases (1988–1996). *Journal of the American Animal Hospital Association*. 35: 384- 391.
- 31 Rodrigues-Lainz A., Fritz C.L. & Mckenna W.R. 1999. Animal and human health risks associated with Africanized honeybees. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 215(12): 1799-1804.
- 32 Scott-Moncrieff J.C., Treadwell N.G., McCullough S.M & Brooks M.B. 2001. Hemostatic abnormalities in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 37(3): 220-227.
- 33 Shaw N. & Harrell K. 2008. IMHA: diagnosing and treating a complex disease. Available in <<http://veterinarymedicine.dvm360.com/imha-diagnosing-and-treating-complex-disease>>. [Accessed online in May 2017].
- 34 Stewart A.F. & Feldman B.F. 1993. Immune-mediated hemolytic anemia. Part I. An overview. *Compendium on Continuing of Education for the Practicing Veterinarian*. 15(3): 372-381.
- 35 Stockham S.L. & Scott M.A. 2002. Urinary system. In: Stockham S.L. & Scott M.A. (Eds). *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Ames: Blackwell Publishing Company, pp.277-336.
- 36 Thrall, M.A., Baker D.C., Campbell T.W., DeNicola D.B. & Fettman M.J. 2004. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 518p.
- 37 Wardrop K.J. 2005. The Coombs' test in veterinary medicine: past, present and future. *Veterinary Clinical Pathology*. 34(4): 325-334.
- 38 Weinkle T.K., Center S.A., Randolph J.F., Warner K.L., Barr S.C. & Erb H.N. 2005. Evaluation of prognostic factors, survival rates, and treatment protocols for immune-mediated hemolytic anemia in dogs: 151 cases (1993-2002). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 226(11): 1869-1880.
- 39 Weiss D.J. 2002. Application of flow cytometric techniques to veterinary clinical hematology. *Veterinary Clinical Pathology*. 31(2): 72-82.
- 40 Wilkerson M.J., Davis E., Shuman W., Harkin K., Cox J. & Rush B. 2000. Isotype-specific antibodies in horses and dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 14: 190-196.
- 41 Wysoke J.M., Berg P.B.V. & Marshall C. 1990. Bee sting-induced haemolysis, spherocytosis and neural dysfunction in three dogs. *Journal of the South African Veterinary Association*. 61(1): 29-32.