

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO
DE MEDULA ÓSSEA PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

Comparison between different techniques of bone marrow evaluation for
parasitological diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis

TAMIRES RAMBORGER ANTUNES

CAMPO GRANDE, MS

2017

TAMIRES RAMBORGER ANTUNES

**COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO
DE MEDULA ÓSSEA PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE
LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**

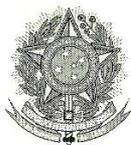
Comparison between different techniques of bone marrow evaluation for
parasitological diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Alda Izabel de Souza

CAMPO GRANDE, MS

2017



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)



Ata de Defesa de Dissertação
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Mestrado

Aos dezesseis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezessete, às catorze horas, na Sala A da Pós-Graduação, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Alda Izabel de Souza (UFMS), Danilo Carlotto Gomes (UFMS) e Magyda Arabia Araji Dahroug Moussa (UCDB), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **TAMIRES RAMBORGER ANTUNES**, CPF 03624967142, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES TÉCNICAS DE AVALIAÇÃO DE MEDULA ÓSSEA PARA O DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO DE LEISHMANIOSE VISCERAL CANINA**" e orientação de Alda Izabel de Souza. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu Parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR

Dra. Alda Izabel de Souza
Dr. Danilo Carlotto Gomes
Dra. Magyda Arabia Araji Dahroug Moussa
Dra. Mariana Isa Poci Palumbo (Suplente)

ASSINATURA

Alda Izabel de Souza
Danilo Carlotto Gomes
Magyda Arabia Araji Dahroug Moussa

AValiação

Aprovada
Aprovada
Aprovada

RESULTADO FINAL:

Aprovação Aprovação com revisão Reprovação

OBSERVAÇÕES:

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinaturas:

Alda Izabel de Souza

Presidente da Banca Examinadora

Tamires R. Antunes

Aluna

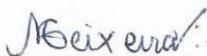


Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFMS



C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº 669/2015 da Pesquisadora **Alda Izabel de Souza**, referente ao projeto de pesquisa “Comparação entre diferentes técnicas de avaliação de medula óssea para o diagnóstico parasitológico da Leishmaniose Visceral Canina”, está de acordo com os princípios éticos adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), com a legislação vigente e demais disposições da ética em investigação que envolvem diretamente os animais e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA/UFMS, em reunião ordinária do dia 27 de abril de 2015.


Maria Araújo Teixeira

Coordenadora da CEUA/UFMS

Campo Grande, 27 de abril de 2015.

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
<http://www.propp.ufms.br/ceua>
ceua.2000@gmail.com
fone (67) 3345-7186

A minha família com imenso carinho, especialmente aos meus pais e irmãos, pelo amor, educação apoio e incentivo.

Aos amigos pelo companheirismo.

A todos que contribuíram para o desenvolvimento e execução deste trabalho.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida, família, amigos, proteção, oportunidades, educação, por tudo.

Aos meus pais, Jorge Ibere Gomes Antunes e Neuza de Fatima Ramborger que me deram tudo e me transformaram na pessoa que me tornei, pelo amor, cuidado, educação, valores, apoio, por terem me ensinado a caminhar e lutar as batalhas.

Aos meus irmãos Christopher Ramborger Antunes, Fagner Ramborger Camargo e Vagner Ramborger Camargo e demais familiares por me acompanharem e apoiarem.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Alda Izabel de Souza pela paciência, ensinamento, apoio, generosidade, “puxões de orelha”, dedicação e exigência durante a minha jornada.

A Kelly Cristina da Silva Godoy pela amizade, companheirismo, paciência e auxílio que sempre vão além da minha vida acadêmica.

A Renata Amarilha Valençoela Peixoto, Simone Sorgatto, Bruna Brito Oliveira, Gustavo Gomes de Oliveira, Alexandre Welzel da Silveira, Polyana Mayume e Andressa Salles pela amizade, companhia, paciência e apoio.

A Franciella Cristina Pezarico e ao Sandro do Nascimento pelos anos de convivência e companheirismo, além da ajuda no processamento dos exames.

Ao Prof^o Dr^o Carlos Alberto do Nascimento Ramos pela orientação, paciência, generosidade e auxílio para execução desta pesquisa.

À equipe do laboratório de Patologia Clínica Veterinária da FAMEZ-UFMS pelos anos de convivência, aprendizado, amizade, apoio, alegrias e pela ajuda no processamento das amostras desta pesquisa.

Às equipes dos setores de Clínica Médica e Anestesiologia de Pequenos Animais e aos laboratórios de Biologia Molecular e Anatomia Patológica da FAMEZ-UFMS pelo auxílio na colheita de informações e processamento das amostras desta pesquisa.

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pela bolsa de estudos concedida (chamada FUNDECT/CAPES nº 05/2015).

A todos que indireta e diretamente auxiliaram durante a minha jornada e para execução desta pesquisa, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

ANTUNES, T.R. Comparação entre diferentes técnicas de avaliação de medula óssea para o diagnóstico parasitológico de leishmaniose visceral canina. 2016. 61p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil, 2016.

O objetivo com este estudo foi comparar as técnicas de citologia aspirativa, biópsia e citobloco para identificação e quantificação parasitológica de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em medula óssea de cães. Amostras de tecido medular de 26 animais, em diferentes estágios clínico-laboratorial da doença, foram estudadas obedecendo os mesmos critérios de investigação nas técnicas de citologia aspirativa, biópsia e citobloco. O menor número de campos para a confirmação parasitológica foi constatado no esfregaço direto obtido por citologia aspirativa. O estágio clínico-laboratorial não influenciou no número de campos necessários para a primeira visualização do agente em nenhuma das técnicas ($p>0,05$) e menor intensidade parasitária foi observada nas lâminas de citobloco. As técnicas de citologia aspirativa e biópsia concordaram na estimativa do coeficiente de infectividade no tecido estudado ($p<0,05$). Apesar da técnica de citobloco permitir a concentração de células e melhor reaproveitamento de amostras, não demonstrou ser um método adequado para rápida identificação e quantificação parasitológica na leishmaniose visceral canina. Considerando suas vantagens, a citologia aspirativa foi o melhor método para detecção microscópica do parasito e determinação do nível de intensidade parasitária no tecido estudado.

Palavras-chave: citologia aspirativa, biópsia, citobloco.

ABSTRACT

ANTUNES, T.R. Comparison between different techniques of bone marrow evaluation for parasitological diagnosis of Canine Visceral Leishmaniasis. 2016. 61p. Master dissertation – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil, 2016.

The aim of the present study was to compare the aspiration cytology, biopsy and cell block techniques for identification and parasitological quantification of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in dogs bone marrow. Bone marrow tissue samples from 26 animals, in different clinical-laboratory stages of the disease, were studied according to the same criteria of investigation in the aspiration cytology, biopsy and cell block techniques. The lowest number of fields for the parasitological confirmation was found in the direct smear obtained by aspiration cytology. The clinical-laboratory stage did not influence the number of fields required for the first visualization of the agent in any of the techniques ($p>0.05$) and less parasitic intensity was observed in the cell block slides. The aspiration cytology and biopsy techniques agreed on the estimation of infectivity coefficient in the tissue studied ($p<0.05$). Although the cell block technique allows the concentration of cells and better reutilization of samples, it has not been shown to be an adequate method for rapid identification and parasitological quantification in canine visceral leishmaniasis. Considering its advantages, aspiration cytology was the best method for microscopic detection of the parasite and determination of the level of parasite intensity in the tissue studied.

Keywords: aspiration cytology, biopsy, cell block

SUMÁRIO

	<i>Página</i>
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1. Leishmaniose Visceral.....	13
2.2. Técnicas de investigação parasitológica na medula óssea.....	15
2.3. Comparação de técnicas de investigação na medula óssea.....	21
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo Geral.....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Aspectos éticos.....	25
4.2. Animais utilizados.....	25
4.3. Critérios de inclusão e exclusão	25
4.4. Confirmação diagnóstica da leishmaniose visceral canina.....	25
4.5. Informações clínicas.....	26
4.6. Exames laboratoriais.....	26
4.7. Formação dos grupos clínico-laboratoriais.....	27
4.8. Eutanásia dos cães.....	28
4.9. Colheita e processamento das amostras de medula óssea.....	28
4.10. Análise das lâminas.....	30
4.11. Análises estatísticas.....	31
5. REFERÊNCIAS.....	32
6. ARTIGO.....	41
7. ANEXOS.....	53
7.1. Anexo 1 - Ficha para análise clínica.....	53

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é considerada uma das enfermidades de maior importância para a saúde pública. No Brasil, a Organização Mundial da Saúde (2016) menciona uma taxa de letalidade de, aproximadamente, 7%. Em áreas endêmicas, a elevada prevalência de casos caninos associada à alta densidade do vetor tornaram os cães um dos mais importantes elos na transmissão do agente, notadamente aos seres humanos (CAMARGO-NEVES et al., 2001).

A presença de animais assintomáticos e a diversidade de manifestações clínicas dificultam o diagnóstico e o controle dessa protozoonose (GONTIJO e MELO, 2004; SILVA et al., 2006; BRASIL, 2014). Diferentes metodologias de investigação são aplicadas, entretanto, nenhuma delas apresenta 100% de especificidade e sensibilidade (FURLAN, 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; TLAMCANI, 2016). A predileção desse parasito pelo sistema fagocítico mononuclear, a persistência e o rápido acúmulo de amastigotas na medula óssea fazem com que a busca do agente, nesse tecido, seja considerada um dos meios mais específicos para a confirmação da leishmaniose (COTTEREL et al., 2000; KUMAR et al., 2007; NICOLATO et al., 2013). Além disso, a quantificação das formas amastigotas na medula óssea é aceita como marcador confiável do estágio clínico-infeccioso do portador da leishmaniose visceral canina (LVC) (REIS et al., 2006).

A obtenção da amostra por meio da aspiração do tecido medular e a avaliação microscópica dos esfregaços diretos são consideradas de grande utilidade para o diagnóstico da doença, especialmente, pela praticidade, baixo custo e segurança para o paciente (RASKIN e MESSIK, 2012; DEFARGES et al., 2013; MILLER e BAIN, 2015).

A biopsia de medula óssea é menos utilizada na obtenção de material medular, apesar de ser reconhecida como ferramenta de busca por agentes de caráter zoonótico e possuir poucas contraindicações ou

complicações na aplicação da técnica (DIEBOLD et al., 2000; CURY, 2003; RILEY et al., 2004; GRINDEM et al., 2009; MILLER e BAIN, 2015). Trabalhos que caracterizem o uso e a eficácia da biopsia de medula óssea para o diagnóstico da LV ainda são insuficientes.

O citobloco (*cell block*) é uma alternativa para melhorar a concentração de células provenientes de amostras líquidas evitando, assim, a dispersão celular e proporcionando o reaproveitamento do material aspirado do tecido medular considerados, muitas vezes, inadequados para análises (ÇAKIR et al., 2014; ONG et al., 2015). A técnica da citoinclusão já foi aplicada na busca de formas amastigotas de *Leishmania*, contudo, os autores reconheceram a necessidade de novas investigações para validação dos resultados (ABRANTES et al., 2016; MENEZES et al., 2016).

O estudo de técnicas de diagnóstico parasitológico que possam otimizar a detecção do agente da LVC na medula óssea e o acompanhamento clínico-laboratorial, em diferentes estágios da doença, é de grande importância.

Portanto, o objetivo com este estudo foi comparar as técnicas de citologia aspirativa, biopsia e citobloco na identificação e quantificação parasitológica de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em amostras de medula óssea de cães.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leishmaniose Visceral

As leishmanioses abrangem um grupo de doenças parasitárias, causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ALVAR et al., 2004). No novo mundo, a transmissão vetorial ao hospedeiro vertebrado ocorre durante repasto sanguíneo da fêmea infectada de insetos do gênero *Lutzomyia* (KILLICK-KENDRICK, 1990; LAISON e RANGEL, 2005).

A doença é apontada como uma das principais enfermidades negligenciadas de maior importância para a saúde pública e endêmica nos cinco continentes. A forma visceral é considerada a apresentação mais grave da protozoonose, com letalidade em torno de 7% se não tratada de forma adequada e pode acometer diversas espécies, com destaque para os caninos e os seres humanos (GRAMICIA e GRADONI, 2005; OMS, 2016).

No Brasil, a leishmaniose foi descrita, inicialmente, como enfermidade de áreas rurais. O desequilíbrio ambiental, provocado pela urbanização das populações, o aumento dos desmatamentos, as condições precárias de saneamento, a adaptação do vetor ao novo ambiente e as dificuldades no controle da doença em grandes centros são fatores que contribuíram para a disseminação do agente e a caracterização da doença como grave problema de saúde pública (GONTIJO e MELO, 2004; BRASIL, 2014).

O aumento da incidência de LV humana em áreas com alta prevalência de leishmaniose visceral canina e alta densidade de *Lutzomyia longipalpis*, tornaram os cães um dos mais importantes elos na transmissão da *Leishmania* aos seres humanos (ASHFORD, 1996; CAMARGO-NEVES et al., 2001; DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006).

Cães infectados podem apresentar diferentes manifestações clínicas em consequência da resposta imunológica e da interação do parasito com o hospedeiro. Os sinais da doença aparecem, em média, após 3-7 meses da inoculação do agente (SOLANO-GALEGO et al., 2011; BRASIL, 2014). Contudo estima-se que, no Brasil, entre 40-60% dos cães soropositivos sejam assintomáticos, portanto não identificados, o que dificulta o controle dessa zoonose (MANCIANTI et al., 1988; XAVIER et al., 2006; BRASIL, 2014).

Animais assintomáticos são considerados tão competentes quanto os sintomáticos na infecção de flebotomíneos e podem transmitir a *Leishmania* a outros caninos e humanos (PALATNIK-DE-SOUZA et al., 2001; LAURENTI et al., 2013). Em cães oligossintomáticos, a despeito da presença dos anticorpos, são identificados poucos e inespecíficos sinais clínicos que, muitas vezes, dificulta a suspeita clínica (LAURENTI et al., 2013).

Durante a infecção o microorganismo se dissemina por meio do sistema vascular e linfático para diversos órgãos, com predileção pelo sistema fagocítico mononuclear, ocorrendo parasitismo persistente com rápido acúmulo de amastigotas na medula óssea (COTTEREL et al., 2000; PEÑA et al., 2000; KUMAR et al., 2007; ALVES et al., 2010; NICOLATO et al., 2013; RIGO et al., 2013; ROSA et al., 2014). Assim, o método parasitológico é o meio mais específico para a detecção da doença, porém, é considerado de sensibilidade variável, com o resultado dependente da densidade parasitária, do tipo de material biológico examinado e do número de campos observados ao microscópio óptico (DANTAS-TORRES e BRANDÃO-FILHO, 2006; GIUDICE e PASSANTINO, 2011; SOLANO-GALEGO et al., 2011; BRASIL, 2014).

A investigação da LV também pode ser realizada por meio da detecção de anticorpos séricos usando os testes de imunofluorescência, imunoenzimático [ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*)] e imunocromatográfico. A sensibilidade e especificidade dessas técnicas

variam de acordo com a fração antigênica utilizada por cada pesquisador (TREVISAN et al., 2015). Outro método de investigação, atualmente mais acessível, baseia-se na amplificação do DNA do parasito mediante PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que apresenta sensibilidade entre 70% e 100% quando aplicado em sangue periférico e próximo de 100% quando em amostras de medula óssea (HASNAIN et al., 2016).

Embora vários pesquisadores investiguem diferentes metodologias, até o momento, não foram desenvolvidos testes que apresentem 100% de especificidade e sensibilidade para o diagnóstico da LV (FURLAN, 2010; SOLANO-GALLEGO et al., 2011; TLAMCANI, 2016). Portanto, a investigação de novos métodos de diagnóstico e a associação de diferentes técnicas é imprescindível para que seja possível melhorar a eficácia da detecção do parasito.

2.2. Técnicas de investigação parasitológica na medula óssea

Atualmente, existem diferentes métodos de colheita e processamento de amostras utilizadas para investigação parasitológica em diversos tecidos.

A citologia aspirativa consiste em uma técnica simples, rápida, barata e minimamente invasiva, amplamente utilizada no diagnóstico de enfermidades (LEVER et al., 1985; BRACARENSE e REIS, 1997; FIELD e GEDDIE, 2016). Na medicina, tem sido empregada desde a metade do século XIX, quando Kun a descreveu como um novo método para o diagnóstico de tumores. Em 1854, foi aplicada pela primeira vez para o estudo de neoplasias mamárias (ANSARI e DERIAS, 1997). Embora, a princípio, tenha sido utilizada para investigação de neoplasias, desde 1904 também é reconhecida para o estudo de doenças infecciosas (SCHMITT, 1997; SHARKEY e WELLMAN, 2011; CLEMENT et al., 2015).

A partir da punção e aspiração, é possível realizar a análise citológica de praticamente todos os tecidos. Na maioria dos casos, sem

necessidade de anestesia e com um mínimo de desconforto ao paciente (LEVER et al., 1985; ANSARI e DERIAS, 1997; BRACARENSE e REIS, 1997; SCHMITT, 1997).

Na medula óssea, o uso da técnica foi descrito pela primeira vez por volta de 1920, quando pesquisadores demonstraram o valor da citologia aspirativa na obtenção de amostras e análise desse tecido (RILEY et al., 2004).

A colheita e avaliação do conteúdo aspirado do tecido medular é, frequentemente, utilizado como método de investigação complementar no diagnóstico de anormalidades hematológicas e, além disso, reconhecida como importante ferramenta na busca de agentes infecciosos, metástases e acompanhamento da progressão de doenças ou respostas a tratamentos (GRINDEM et al., 2009; TOI et al., 2010; RASKIN e MESSIK, 2012).

Especialmente nos casos de LV, a avaliação microscópica dos esfregaços diretos confeccionados a partir da aspiração de tecido medular é considerada de grande utilidade para diagnóstico (MILLER e BAIN, 2015). A praticidade e custo associados ao curto tempo para obtenção do resultado fazem com que seja utilizada na investigação clínica frente à suspeita da doença, especialmente em humanos (RASKIN e MESSIK, 2012; BRASIL, 2014). Por ser um método parasitológico, apresenta alta especificidade, entretanto sua sensibilidade é variável, uma vez que depende da intensidade parasitária no tecido medular e do número de campos observados ao microscópio (SARIDOMICHELAKIS et al., 2005; GIUDICE e PASSANTINO, 2011; BRASIL, 2014). O uso da associação com técnicas que promovam a concentração celular, realização de cultura ou a aplicação de imunocitoquímica no esfregaço direto pode ser recomendada para aumentar a sensibilidade e, assim, melhorar a sua capacidade diagnóstica (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; GEORGIADOU et al., 2015; MILLER e BAIN, 2015).

Na medicina veterinária, a citologia aspirativa dos linfonodos periféricos é, preferencialmente, utilizada na investigação parasitológica da

LVC. Contudo alguns autores atribuíram menor sensibilidade a este tecido, principalmente, em cães assintomáticos ou em fase inicial de infecção, devido ao baixo parasitismo e dificuldade de colheita na ausência de hiperplasia linfóide (SOLANO-GALLEGO et al., 2011; GEORGIADOU et al., 2015). Já as características de promover parasitismo persistente e o rápido acúmulo de amastigotas da medula óssea fazem do tecido um local ideal para avaliação citológica a fim de diagnosticar e monitorar a doença, por isso, recomendado pelo Ministério da Saúde diante da suspeita clínica de (COTTERELL et al., 2000; BRASIL, 2014). A análise do material também fornece informações valiosas para a determinação do estágio clínico-infeccioso do paciente, permitindo o estadiamento, o prognóstico da progressão da doença e a avaliação de eficácia, no caso de realização de tratamento (REIS et al., 2006; BRASIL, 2014).

Somado a isso, a citologia aspirativa da medula óssea é considerada mais segura que os aspirados esplênicos, com risco mínimo de ocorrência de hemorragias, mesmo em pacientes gravemente trombocitopênicos (TOI et al., 2010; DEFARGES et al., 2013; BRASIL, 2014). Na medicina veterinária, apesar destas vantagens, devido ao receio de submeter o paciente a um procedimento invasivo associado à falta de treinamento, a técnica de aspiração do tecido medular ainda é pouco utilizada na rotina diagnóstica (PAPARCONE et al., 2013).

A biópsia é um método que consiste na retirada mecânica de amostra tecidual a ser processada para avaliação microscópica (FEITOSA, 2004). A técnica pode ser aplicada em diferentes tecidos, pois permite o estudo da arquitetura celular e a aplicação de colorações especiais (ZACHARY e McGAVIN, 2013). Sensibilidade, especificidade e acurácia foram reconhecidas em diversos estudos com seres humanos e animais (BERZINA et al., 2008; BUKHARI e AKHTAR, 2009; WASHABAU et al., 2010; KOZIKOWSKI et al., 2015).

A análise de fragmento da medula óssea foi, inicialmente, relatada em 1903, quando um pesquisador colheu amostra do canal medular para

diagnóstico (PARAPIA, 2007). Embora decorridos mais de um século, a técnica continua aceita como importante exame complementar de diagnóstico na rotina clínica (CURY, 2003).

A biópsia de medula óssea é fundamental para determinação fidedigna da celularidade, da avaliação da estrutura tecidual e da identificação de condições específicas, tais como: mielofibrose, mioesclerose, lesões neoplásicas focais ou metastáticas (BAIN, 2001; CURY, 2003; RILEY et al., 2004; GRINDEM et al., 2009; TOI et al., 2010). Somam-se a isso as poucas contraindicações e complicações na aplicação da técnica. A contenção, sedação e anestesia geralmente oferecem mais riscos do que o procedimento em si, podendo ser realizado inclusive em pacientes com doenças hemorrágicas. A chance de contaminação iatrogênica é mínima quando a antisepsia é devidamente realizada (CURY, 2003; RILEY et al., 2004; GRINDEM et al., 2009).

Apesar de menos indicada para investigação de enfermidades infecciosas (MILLER e BAIN, 2015), a biópsia de medula óssea desempenhou um papel importante na identificação de bactérias, fungos e protozoários em pacientes com febre de origem desconhecida (DIEBOLD et al., 2000). A visualização de formas amastigotas de *Leishmania* em lâminas histopatológicas é altamente específica para confirmação de um quadro de LV, contudo é imprescindível a experiência do patologista na diferenciação com outros micro-organismos (BAIN et al., 2008).

Estudo retrospectivo em lâminas histopatológicas de medula óssea de 249 crianças encontrou confusão diagnóstica entre LV e tuberculose devido à presença de granulomas e fundamentou a causa de óbito por LV em nove indivíduos, tratados apenas com medicamentos anti-tuberculose (KUMAR et al., 2007). Grande quantidade de formas amastigotas de *Leishmania* foram observadas em biópsia medular de pacientes sem resposta ao tratamento para malária (SAJID e QURESHI, 2011). Bibas e Del Nonno (2011) mencionam um quadro de recidiva de LV em paciente

com síndrome da imunodeficiência adquirida diagnosticada por meio da avaliação histopatológica do tecido medular.

Trabalhos que caracterizam o uso e a eficácia da biopsia de medula óssea para o diagnóstico e definição de alterações morfológicas do tecido medular na LV são insuficientes. Pesquisadores admitem a escassez de dados e reconhecem que lesões semelhantes podem surgir de diferentes agentes patológicos e a doença pode causar várias alterações que precisam ser melhor esclarecidas (DIEBOLD et al., 2000; MILLER e BAIN, 2015).

Citobloco (*cell block*) ou citoinclusão é uma técnica que permite a concentração de células provenientes de amostras líquidas ou reaproveitamento de material coagulado evitando a dispersão celular (ÇAKIR et al., 2014; ONG et al., 2015). Sua principal vantagem é a preservação da arquitetura tecidual. A inclusão em parafina otimiza às amostras citológicas e a confecção de várias lâminas histológicas (FERNANDES et al., 2015; ONG et al., 2015; ABRANTES et al., 2016).

A técnica foi inicialmente descrita por Bahrenburg (1896) e, a princípio, aplicada para análise de fluídos pleurais e peritoneais, lavagens brônquicas e aproveitamento de amostras líquidas obtidas por meio de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) (ZANONI et al., 2012; ÇAKIR et al., 2014). A partir de então, vem sendo empregada para a investigação de diferentes enfermidades (MANSY, 2004; COLLINS et al., 2012; KASE et al., 2016, UNIYA et al., 2016).

A utilização do citobloco para avaliação do tecido medular é mais recente e reconhecida como importante alternativa no aproveitamento de material aspirado da medula óssea, mesmo em amostras consideradas inadequadas para as análises de rotina. A técnica possibilita a aplicação de diferentes colorações e marcadores imunológicos no tecido (ONG et al., 2015; ABRANTES et al., 2016).

Uma das primeiras aplicações do citobloco utilizando amostra de medula óssea foi realizada por Dee et al. (1976), que confirmaram a

eficácia da técnica na identificação do envolvimento desse tecido em pacientes humanos com linfoma quando comparado ao exame de fragmentos de biópsia, tradicionalmente utilizado. Pesquisadores também reconheceram a eficácia do uso do citobloco na investigação de neoplasias hematopoiéticas, metástases, tuberculose extrapulmonar e invasão por agentes nematoides no tecido medular (UNIYA et al. 2012; SANTOSH et al., 2015; SANTOSH et al., 2016).

Na medicina veterinária, a eficiência da técnica também vem sendo reconhecida. Paiva et al. (2014) testaram protocolos para confecção de citoblocos em amostras provenientes de capa leucocitária e de medula óssea de cães e autenticaram o baixo custo e a reprodutividade do método como complemento ao diagnóstico. A associação do citobloco e imunohistoquímica (IHQ) demonstrou ser útil para a identificação de micrometástases medular de carcinoma em cães e gatos, entretanto os autores alertaram a necessidade de novas avaliações com maior número de pacientes (TAYLOR et al., 2012).

Ong et al. (2015) destacaram a importância do reaproveitamento de material por meio da utilização da citoinclusão, especialmente diante de fragmento e aspirado do tecido medular considerados inadequados para análise. Os autores também salientaram a possibilidade do uso da técnica associada a outros métodos diagnósticos complementares.

Na LV, o emprego do citobloco para o diagnóstico ainda é escasso. Abrantes et al. (2016) e Menezes et al. (2016) confirmaram um aumento na sensibilidade do exame quando a citoinclusão foi comparada com os outros métodos parasitológicos empregados. Supostamente, a formação de uma camada de leucócitos parasitados com as amastigotas após a centrifugação facilitou a observação do agente. Destaca-se, entretanto, que em ambos os trabalhos os pesquisadores associaram à técnica de IHQ, raramente utilizada na rotina clínica, e admitiram a necessidade de novas investigações para validação do método.

2.3. Comparação de técnicas de investigação na medula óssea

A escolha do melhor método para investigação de doença aprimora a capacidade diagnóstica. Por esse motivo, vários pesquisadores procuram comparar diferentes técnicas de avaliação tecidual em busca da melhor alternativa para o reconhecimento da causa das enfermidades.

A comparação entre citologia por aspiração e biopsia, utilizando o tecido medular, foi investigada em diferentes situações. Material medular obtido por biopsia mostrou-se mais sensível para a confirmação de linfoma em pacientes humanos, embora a citologia aspirativa tenha conseguido diferenciar células neoplásicas de não neoplásica nestes indivíduos (DEE et al., 1976). A mesma observação foi feita por Gupta et al (2008) que investigaram pacientes com piroxia de origem desconhecida e constataram que a biopsia assegurou a conclusão de 70% dos casos, contra apenas 16,5% quando somente a citologia aspirativa foi utilizada. Na busca por metástase de tumores sólidos na medula óssea, a biopsia foi o único método capaz de confirmar o diagnóstico em 100% dos casos estudados (CHANDRA e CHANDRA, 2011).

A possibilidade de associação com a técnica de IHQ também é reconhecida como uma das vantagens da utilização das amostras processadas para histopatologia, principalmente diante de poucas células suspeitas. Essa combinação pode aumentar a precisão do diagnóstico, desmascarando padrões e morfologias obscuras (GOYAL et al., 2014).

A citologia aspirativa foi reconhecida como mais sensível na detecção de anemias de origem nutricional e boa correlação com a biopsia em pacientes pancitopênicos (MAHAJAN et al., 2013; SINDHU et al., 2016). Pandya et al (2012) reconheceram que 70% dos casos investigados por eles foram diagnosticados somente com material obtido pela citologia aspirativa.

Estudos que compararam a biopsia à citologia da medula óssea para investigação de agentes infecciosos, especialmente a leishmania, são

escassos ou com um número muito reduzido de indivíduos (BASKOTA et al., 2015). Nestes casos, o uso da citologia aspirativa é mais habitual e a biopsia é empregada apenas para a busca de alterações celulares que indiquem a presença de infecção (MILLER e BAIN, 2015). Apesar disso, vários pesquisadores concordam que a decisão pela biopsia ou aspiração da medula óssea depende da situação clínica e que os procedimentos aplicados simultaneamente são complementares e aumentam a acurácia diagnóstica (TOI et al., 2010; CHANDRA e CHANDRA, 2011; PANDYA et al., 2012; METIKURKE et al., 2013; PARAJULI e TULADHAR, 2014; MANJU et al., 2016; SINDHU et al., 2016).

A técnica do citobloco é reconhecida como uma importante alternativa na rotina citológica de investigação em material líquido. A concentração celular e a obtenção de várias lâminas histológicas, que possibilita a aplicação de diferentes técnicas de coloração, amplia a capacidade diagnóstica nestes materiais (ZANONI et al., 2012).

Em seres humanos o citobloco demonstrou mais acurácia e sensibilidade que o esfregaço direto no diagnóstico de diferentes amostras teciduais obtidas por aspiração por agulha fina guiada por ultrassom. Os pesquisadores também atestaram maior facilidade em diferenciar condições malignas de benignas quando o citobloco foi aplicado (NODA et al., 2010).

Taylor et al. (2013) admitiram um incremento na capacidade de detecção de micrometastase em medula óssea de cães utilizando o citobloco, associado a IHQ, quando comparado ao esfregaço direto obtido por citologia aspirativa.

A utilização do citobloco na concentração de células medulares para a busca de formas amastigotas de leishmania é recente e merece mais investigações. Até o momento, a aplicação da técnica tem demonstrado melhorar a sensibilidade do exame parasitológico quando associada à marcação IHQ (FERNANDES et al., 2015; ABRANTES et al., 2016).

A combinação da citologia aspirativa e citobloco de medula óssea é considerada vantajosa já que permite estudar simultaneamente a citomorfologia e o arranjo celular na ausência de biopsia tecidual (UNIYA et al., 2016).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Comparar a citologia aspirativa, biopsia e citobloco para investigação diagnóstica e quantificação parasitária de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* na medula óssea de cães infectados naturalmente.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o número de campos microscópicos necessários, em cada técnica, para identificação da primeira forma amastigota de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em amostras de medula óssea.
- ✓ Comparar as três técnicas para determinação da intensidade parasitária em tecido medular de cães com leishmaniose visceral.

4. METODOLOGIA

4.1. Aspectos éticos

O presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS) sob o protocolo de número 669/2015 (Anexo 1).

4.2. Animais utilizados

Foram estudados 26 cães com leishmaniose visceral, atendidos em um hospital escola de Campo Grande – MS.

4.3. Critérios de inclusão e exclusão

Como critério de inclusão foram selecionados cães parasitologicamente positivos para leishmaniose visceral no exame citológico de linfonodo, independente de sexo, raça, idade e peso corporal.

Animais coinfectados com *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp., *Babesia* sp., *Hepatozoon* sp. e/ou *Mycoplasma* sp., identificados por meio de PCR, foram excluídos do estudo. Os cães foram considerados negativos para a infecção por *Trypanosoma cruzi* e *Dirofilaria immitis* visto que Campo Grande é área não endêmica para estes agentes.

4.4. Confirmação diagnóstica da leishmaniose visceral canina

O exame parasitológico por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) dos linfonodos foi realizado para confirmação da presença de formas amastigotas. As lâminas foram fixadas em metanol, coradas pela

técnica de coloração rápida¹ com corante do tipo Romanowsky e analisadas em microscopia de luz com objetiva de imersão (100x).

A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), realizada conforme o protocolo descrito por Cortes et al. (2004), confirmou a presença do agente no tecido medular e identificação da espécie.

4.5. Informações clínicas

As informações clínicas foram obtidas por meio da anamnese e exame físico criterioso dos cães, seguindo o protocolo para colheita de informações (Anexo 1).

4.6. Exames laboratoriais

Para realização dos exames laboratoriais foram colhidos aproximadamente 10 mL de sangue por punção da veia cefálica ou jugular, posteriormente acondicionado em tubos estéreis contendo anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e ativador de coágulo, para realização de hemogramas e análises bioquímicas, respectivamente. As amostras de soro, obtidas após centrifugação a 5.000 rpm por 5 minutos, foram armazenadas à -80°C até a realização dos ensaios. Cistocentese para colheita de urina foi efetuada, com processamento imediato do material.

As informações hematológicas foram obtidas por impedância em aparelho automático². O diferencial leucocitário, pesquisa de hemoparasitas e análise morfológica foram realizados a partir da leitura de esfregaços sanguíneos fixados em metanol corados pelo método de coloração rápida¹. Os resultados foram comparados aos valores de normalidade descritos por Weiss e Wardrop (2010).

¹ Panótico®

² Sysmex poch-100iV™

As mensurações das concentrações de creatinina urinária e séricas de albumina, alaninaminotransferase (ALT), aspartatoaminotransferase (AST), cálcio total, creatina quinase fração MB (CK-MB), colesterol total (CHO), creatinina, fosfatase alcalina (FA), fósforo, gama glutariltransferase (GGT), glicose (GLU), proteínas totais (PT), triglicerídeos (TRIG) e ureia foram realizadas em analisador automático³. Os valores de proteína e GGT urinárias foram determinados a partir de aparelho semiautomático⁴. Todas as análises bioquímicas seguiram as instruções e metodologias dos fabricantes dos kits reagentes. Os valores de cálcio iônico, globulinas, razão albumina:globulinas (A:G) e razão proteína:creatinina urinária (P_u/C_u) foram obtidas por meio de cálculo matemático. Os resultados das concentrações séricas e urinárias foram comparados aos valores de normalidade utilizados como referência estabelecidos por Kaneko et al. (2008) e pela IRIS – *International Renal Interest Society* (2015).

4.7. Formação dos grupos clínico-laboratoriais

Os animais foram agrupados, de acordo com os sinais clínicos e dados laboratoriais, utilizando-se adaptação da classificação realizada por Solano-Gallego et al. (2011), em: estágio 1 ou doença leve (sinais clínicos leves, como linfadenomegalia periférica ou dermatite papular com ausência de alterações laboratoriais); estágio 2 ou doença moderada (sinais clínicos do estágio 1, além de lesões cutâneas simétricas ou difusas, onicogribose, anorexia, perda de peso, febre e epistaxe associadas a alterações laboratoriais, como anemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, entre outros, e perfil renal normal); estágio 3 ou doença grave (alterações laboratoriais e sinais clínicos dos estádios 1 e 2, além de sinais provenientes de lesões por imunocomplexos, tromboembolismo

³ Cobbas c 111

⁴ Spectrum

pulmonar, síndrome nefrótica, doença renal crônica por estadiamento da IRIS ou fim de doença renal).

4.8. Eutanásia dos cães

Os cães identificados como positivos, após os procedimentos ambulatoriais e consentimento livre e esclarecido dos proprietários, foram eutanasiados de acordo com a Resolução 714/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária, obedecendo a Portaria Interministerial número 1.426 de 11 de julho de 2008 que dispõe sobre as normas técnicas para o combate às leishmanioses no País.

4.9. Colheita e processamento das amostras de medula óssea

A colheita do material para a avaliação da medula óssea foi realizada imediatamente após a eutanásia. Em todos os cães, as amostras foram obtidas de acordo com o preconizado por Grindem et al. (2009).

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito para punção do úmero proximal com o auxílio de agulha pediátrica do tipo *Jamshid*⁵. Tricotomia com margem ampla e antissepsia foram realizadas antes do procedimento, bem como proteção do local com panos de campo para evitar contaminação. Uma pequena incisão com lâmina de bisturi estéril foi realizada no sítio de coleta para facilitar a passagem da agulha.

Para citologia aspirativa, o membro torácico esquerdo foi estabilizado e a agulha inserida na superfície craniolateral do úmero proximal, distal ao tubérculo maior, evitando a cartilagem articular, por meio de utilização de movimentos rotatórios para facilitar a penetração no osso. Quando a cavidade medular foi alcançada, detectado pela firme fixação da agulha, o madril foi removido e seringa de 20 mL contendo 0,3 mL de EDTA à 2%, para evitar a coagulação da amostra, foi conectada à

⁵ Cânula para biopsia de medula óssea - Biomedical®

agulha. Em seguida, aplicou-se forte pressão negativa puxando o êmbolo rapidamente e o máximo possível. Após a aspiração de 2mL de tecido medular, encerrou-se a aplicação da pressão negativa, desacoplou-se a seringa e o mandril foi novamente posicionado na agulha para evitar a contaminação do osso. Homogeneização, por inversão, do material aspirado com o anticoagulante foi realizada.

Após a colheita, 1 mL do aspirado medular foi expelido em lâminas dispostas verticalmente sobre uma placa de petri, em ângulo de 45° a 75°. Em seguida, a extensão (“*squash*”) foi realizada a partir do posicionamento de outra lâmina perpendicularmente sobre os grumos de medula aderidos. As duas lâminas foram gentilmente deslizadas e separadas em plano horizontal, dispersando os grumos. Os esfregaços foram fixados com metanol e corados pelo método de coloração rápida¹.

O material aspirado resultante foi distribuído em dois microtubos tipo *ependorf*, cada um contendo 0,5 mL de amostra, sendo destinados para realização do PCR e confecção do citobloco. Para o teste molecular, um microtubo foi armazenado a -80°C até o processamento da amostra. Para a confecção do citobloco, após centrifugação à 3.000 rpm por 5 minutos e retirada do sobrenadante, solução de formalina neutra tamponada à 10% foi adicionada ao segundo microtubo para fixação do material durante 24 horas.

Para a colheita do fragmento de biopsia, o mandril foi novamente retirado da agulha e a empunhadura anatômica sem mandril acoplada. Realizou-se moderada pressão, com rotação da agulha em movimentos alternados em sentido horário e anti-horário, seguindo o eixo paralelo do osso, padronizando-se 1,5 cm de tamanho por meio de controle da profundidade de inserção da agulha. Em seguida, removeu-se a agulha do animal e, com auxílio do mandril, o fragmento tecidual foi retirado de dentro da agulha, empurrando-o em sentido contrário (da ponta em direção a região de conexão), para evitar esmagamento. Rolamento sobre lâminas de microscopia da porção tecidual medular extraída foi realizada para

rápida confirmação da qualidade da amostra de biopsia obtida. As lâminas de *imprinting* foram fixadas e coradas pelo mesmo método descrito para os esfregaços diretos. O fragmento de biopsia foi mantido durante 24 horas em tubo contendo solução de formalina neutra tamponada à 10% para fixação.

Após o período de fixação, confeccionou-se o citobloco pelo método do gel de agarose (adaptado de Grefte et al., 2008). O microtubo foi submetido à centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos para retirada do sobrenadante, contendo o excesso de material fixador e obtenção do coágulo de amostra da medula. Adicionou-se gel de agarose a 3% aquecido e o tubo foi novamente centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos para promover homogeneização e garantir completa aderência do gel ao coágulo. Para rápida solidificação, após a centrifugação o microtubo foi mantido em temperatura de refrigeração (4° a 8° C) entre 15 e 20 minutos. O citobloco foi retirado do *ependorf* com auxílio de espátula e o excesso de ágar removido por meio do corte com lâmina de bisturi estéril.

O citobloco em gel agarose e o fragmento de biopsia já fixado por 24 horas foram colocados em cassetes histopatológicos e submetidos em processador automático de tecidos⁶. Após a inclusão em parafina, os materiais foram seccionados à 3µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE).

4.10. Análise das lâminas

Os mesmos critérios foram obedecidos na avaliação das lâminas obtidas a partir das técnicas de citologia aspirativa, de biopsia e de citobloco. A análise foi realizada em microscópio óptico com campo de grande aumento (cga) em objetiva de imersão (100x). A intensidade parasitária das amostras foi classificada de acordo com a adaptação do protocolo descrito por Chulay e Bryceson (1983) (Tab.1).

⁶ Lupetec PT 05

Tabela 1. Metodologia para classificação, em escores, do nível de intensidade parasitária de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em amostras de medula óssea de cães.

Escore	Número de amastigotas	Número de campos examinados*
Grau zero	Ausentes	1.000
Grau 1+	1 - 10	501 – 1.000
Grau 2+	1 - 10	101 - 500
Grau 3+	1 - 10	11 - 100
Grau 4+	1 - 10	2 - 10
Grau 5+	1 - 10	1
Grau 6+	> 10 - 100	1
Grau 7+	> 100	1

*Objetiva de imersão (100x).

4.11. Análises estatísticas

O número de campos examinados para detecção da primeira forma amastigota do agente foi comparado entre as técnicas com o teste de Friedman. Para avaliar a concordância entre os métodos aplicou-se o índice Kappa (k) simples baseado nos critérios de Landis e Koch (1977). A comparação entre os grupos clínico-laboratoriais nas três técnicas estudadas, em relação ao número de campos percorridos para a primeira observação do agente, foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn, quando necessário. O teste de Friedman foi utilizado para comparar, entre as técnicas, os graus de intensidade parasitária. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. REFERÊNCIAS

- ABRANTES, T.R.; MADEIRA, M.F.; SILVA, D.A.; PERIÉ, C.S.F.S.; MENDES JÚNIOR, A.A.V.; MENEZES, R.C.; SILVA, V.L.; FIGUEIREDO, F.B. Identification of canine visceral leishmaniasis in a previously unaffected area by conventional diagnostic techniques and cell-block fixation. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.58, n.3, p.1-5, 2016. DOI: 10.1590/S1678-9946201658003
- ALVAR, J.; CAÑAVATE, C.; MOLINA, R.; MORENO J.; NIETO J. Canine leishmaniasis. **Adv. Parasitol.**, v. 57, n.1, p.88, 2004. DOI: 10.1016/S0065-308X (04) 57001-X
- ALVES, G.B.B.; PINHO, F.A.; SILVA, S.M.M.S.; CRUZ, M.S.P.; COSTA, F.A.L. Cardiac and pulmonary alterations in symptomatic and asymptomatic dogs infected naturally with *Leishmania Leishmania chagasi*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.43, n.3, p. 310-315, 2010. DOI: 10.1590/S0100-879X2009007500037
- ANSARI, N.A.; DERIAS, N.W. Fine needle aspiration cytology. **J. Clin. Pathol.**, v.50, n.7, p.541-543, 1997. PMID: PMC500043
- ASHFORD, R.W. Leishmaniasis reservoirs and their significance in control. **Clin. Dermatol.**, v.14, n.5, p.523-532, 1996. PMID: 8889331
- BAIN, B.J. Bone marrow trephine biopsy. **J. Clin. Pathol.**, v.54, n.10, p.737-742, 2001. PMID: PMC1731298
- BAIN, B.J.; CLARK, D.M.; LAMPERT, I.A.; WILKINS, B.S. **Bone Marrow Pathology, 3rd Edition**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2008. 512p.
- BAHRENBURG, L.P.H. On the diagnostic results of the microscopical examination of the ascitic fluid in two cases of carcinoma involving the peritoneum. **Cleveland M. Gaz.**, v. 11, p.274-278, 1896.
- BASKOTA, S.U.; JOSHI, A.R.; SINGH, S.K. Bone marrow touch imprint smears as an adjunct to bone marrow aspiration smears in hematological disorders. **J. Pathol. Nepal**, v.5, n.9, p.739-746, 2015. DOI: 10.3126/jpn.v5i9.13783
- BERZINA, I.; SHARKEY, L.C.; MATISE, I.; KRAMEK, B. Correlation between cytologic and histopathologic diagnoses of bone lesions in dogs: a study of the diagnostic accuracy of bone cytology. **Vet. Clin. Pathol.**, v.37, n.3, p.332-338, 2008. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2008.00050.x
- BIBAS, M.; DEL NONNO, F. Leishman-Donovan bodies in the bone marrow biopsy. **Blood**, v.118, n.1, p.8, 2011. DOI: 10.1182/blood-2010-08-299354
- BRACARENSE, A.P.F.R.L.; REIS, A.C.F. Citologia aspirativa em animais domésticos: estudo retrospectivo. **Semina: Ci. Agr.**, v.18, n.1, p.27-32, 1997. DOI: 10.5433/1679-0359.1997v18n1p27
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e**

controle da leishmaniose visceral. 1ed., 5 reimpr., Brasília: Ministério da Saúde, p.120, 2014.

BUKHARI, M.H.; AKHTAR, Z.M. Comparison of accuracy of diagnostic modalities for evaluation of breast cancer with review of literature. **Diagn. Cytopathol.**, v.37, n.6, p. 416-424, 2009. DOI: 10.1002/dc.21000

ÇAKIR, L.; ÇOLAKOĞLU, E.Ç.; TUNÇ, A.S.; KUTSAL, O. Cytological evaluation of pleural effusion with cell block technique in a dog. **Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.**, v.61, p.73-77, 2014. DOI: 10.1501/Vetfak_0000002608

CAMARGO-NEVES, V.L.F.; KATZ, G. RODAS, L.A.C.; POLETTO, D.W.; LAGES, L.C.; SPINOLA, R.M.F.; CRUZ, O.G. Use of spacial analysis tools in the epidemiological surveillance of American visceral leishmaniasis, Araçatuba, São Paulo, Brazil, 1998 – 1999. **Cad. Saúde Pública**, v.17, n.5, p.1263-126, 2001. doi.org/10.1590/S0102-311X2001000500026

CHANDRA, S.; CHANDRA, H. Comparison of bone marrow aspirate cytology, touch imprint cytology and trephine biopsy for bone marrow evaluation. **Hematol. Rep.**, v.3, n.3, p.65-68, 2011. DOI: 10.4081/hr.2011.e22

CHULAY, J. D.; BRYCESON, A.D.M. Quantification of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, n. 3, p. 475-479, may 1983. PMID: 6859397

CLEMENT, C.G.; WILLIAMS-BOUYER, N.M.; NAWGIRI, R.S.; SCHNADIG, V.J. Correlation of microbiologic culture and fine-needle aspiration cytology: A 14-year experience at a single institution. **Cancer Cytopathol.**, v.123, n.10, p.612-619, 2015. DOI: 10.1002/cncy.21590

COLLINS, G.R.; THOMAS, J.; JOSHI, N.; ZHANG, S. The diagnostic value of cellblock as an adjunct to liquid-based cytology of bronchial washing specimens in the diagnosis and subclassification of pulmonary neoplasms. **Cancer Cytopathol.**, v.120, n.2, p.134-141, 2012. DOI: 10.1002/cncy.20181

CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.98, n.1, p.12-17, 2004. PMID: 14702834

COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. **Blood.**, v.95, n.5., p.1642-1651, 2000. PMID: 10688819

CURY, P.M. Biópsia de medula óssea e sua interpretação – o papel do hematopatologista. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.25, n.2, p. 79-80, 2003. DOI: 10.1590/S1516-84842003000200002

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P. Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. **Rev. Inst. Med.**

Trop. S. Paulo., v.48, n.3, p.151-156, 2006. DOI: 10.1590/S0036-46652006000300007

DEE, J.W.; VALDIVIESO, M.; DREWINKO, B. Comparison of the efficacies of closed trephine needle biopsy, aspirated paraffin-embedded clot section, and smear preparation in the diagnosis of bone-marrow involvement by lymphoma. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.65, n.2, p.183-194, 1976. PMID: 766606

DEFARGES, A.; ABRAMS-OGG, A.; FOSTER, R. A.; BIENZLE, D. Comparison of sternal, iliac, and humeral bone marrow aspiration in beagle dogs. **Vet. Clin. Pathol.**, v.42, n.2, p.170-176, 2013. DOI: 10.1111/vcp.12036

DIEBOLD, J.; MOLINA, T.; CAMILLERI-BROËT, S.; LE TOURNEAU, A.; AUDOUIN, J. Bone marrow manifestations of infections and systemic diseases observed in bone marrow trephine biopsy review. **Histopathol.**, v. 37, n.3, p.199-211, 2000. PMID: 10971695

FEITOSA, F.L.F. Introdução à semiologia. In: FEITOSA, F.L.F. **Semiologia Veterinária – A Arte do Diagnóstico**. São Paulo: Roca, p.1-28, 2004.

FERNANDES, N.C.C.A.; GUERRA, J.M.; RÉSSIO, R.A.; WASQUES, D.G.; ETLINGER-COLONELLI, D.; LORENTE, S.; NOGUEIRA, E.; DAGLI, M.L.Z. Liquid-based cytology and cell block immunocytochemistry in veterinary medicine: comparison with standard cytology for the evaluation of canine lymphoid samples. **Vet. Comp. Oncol.**, v.1, p.107-116, 2015. DOI: 10.1111/vco.12137

FIELD, A.S.; GEDDIE, W.R. Role of fine needle aspiration biopsy cytology in the diagnosis of infections. **Diagn. Cytopathol.**, v.0, n.0, p.1-15, 2016. DOI: 10.1002/dc.23568

FURLAN, M.B.G. Epidemia de leishmaniose visceral no município de Campo Grande – MS, 2002 a 2006. **Epidemiol. Serv. Saúde.**, v.19, n.1, p.15-24, 2010. DOI: 10.5123/S1679-49742010000100003

GEORGIADOU, S.P.; MAKARITSIS, K.P.; DALEKOS, G.N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. **J. Transl. Int. Med.**, v.3, n.2, p.43-50, 2015. DOI: 10.1515/jtim-2015-0002

GIUDICE, E.; PASSANTINO, A. Detection of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood from four dogs – short communication. **Acta. Vet. Hung.**, v.59, n.2, p.205-213, 2011. DOI: 10.1556/AVet.2011.003

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v.7, n.3, p.338-349, 2004. DOI: 10.1590/S1415-790X2004000300011

GOYAL, S.; SINGH, U.R.; RUSIA, U. Comparative evaluation of bone marrow aspirate with trephine biopsy in hematological disorders and determination of optimum trephine length in lymphoma infiltration. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, v.6, n.1, p.1-10, 2014. DOI: 10.4084/MJHID.2014.002

- GRAMICIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. **Int. J. Parasitol.**, v.35, n.11-12, p.1169-1180, 2005. DOI: 10.1016 / j.ijpara.2005.07.001
- GREFFE, J.M.M.; DE WILD, P.C.; SALET-VAN DE POL, M.R.J.; TOMASSEN, M.; RAAJMAKERS-VAN GELOOF, W.L., BULTEN, J. Improved identification of malignant cells in serous effusions using a small, robust panel of antibodies on paraffin-embedded cell suspensions. **Acta Cytol.**, v.54, n.1, p.35-44, 2008. DOI: 10.1159/000325432
- GRINDEM, C.B.; TYLER, R.D.; COWELL, R.L. A medula óssea. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. **Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos, terceira edição.** São Paulo: Med.Vet, p. 423-451, 2009.
- GUPTA, R.; SETIA, N.; ARORA, P.; SINGH, S.; SINGH, T. Hematological profile in pyrexia of unknown origin: role of bone marrow trephine biopsy vis-à-vis aspiration. **Hematol.**, v.13, n.5, p.307-312, 2008. DOI: 10.1179/102453308X343446
- HASNAIN, G.; BASHER, A.; NATH, P.; GHOSH, P.; HOSSAIN, F.; HOSSAIN, S.; MONDAL, D. Polymerase chain reaction in the diagnosis of visceral leishmaniasis recurrence in the setting of negative splenic smears. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.94, n.1, p.99-101, 2016. DOI: 10,4269 / ajtmh.15-0136
- IRIS – International Renal Interest Society.** Staging Chronic Kidney Disease (CKD) revised. 2015. Disponível em: <http://www.iris-kidney.com/guidelines/staging.html>. Acesso em 20 de maio de 2015
- KANEKO J. J., HARVEY J. W., BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals.** 6rd ed. San Diego California: Academic Press, 2008. 916p.
- KASE, S.; NAMBA, K.; IWATA, D.; MIZUUCHI, K.; KITAICHI, N.; TAGAWA, Y.; OKADA-KANNO, H.; MATSUNO, Y.; ISHIDA, S. Diagnostic efficacy of cell block method for vitreoretinal lymphoma. **Diagn. Pathol.**, v.11, n.29, 2016. DOI 10.1186/s13000-016-0479-1
- KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Med.Vet. Entomol.**, v.4, n.1, p. 1-24, 1990. PMID: 2132963
- KOZIKOWSKI, M.; NYK, L.; CIEMERYCH, M.; KAWECKI, S.Z.; PIOTROWICZ, S.; MUŚKO, N.; POWROŹNIK, J.; SZOSTEK, P.; SUJECKI, D.; SKRZYPCZYK, M.; SZEMPLIŃSKI, S.; DOBRUCH, J.; BORÓWKA, A. Kidney tumor biopsy accuracy. **Eur. Urol. Suppl.**, v. 14, n.6, p.1272, 2015. DOI10.1016 / S1569-905630309-2
- KUMAR, P.V.; VASEI, M.; SADEGHIPOUR, A. et al. Visceral Leishmaniasis: Bone marrow biopsy findings. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v.29, n.2, p.77-80, 2007. DOI: 10.1097/MPH.0b013e31803076a8
- LAISON, R.; RANGEL, E.F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference

- to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.811-827, 2005. DOI: /S0074-02762005000800001
- LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. **Biometr.**, v. 33, n. 2, p.363-374, 1977.
- LAURENTI, M.D.; ROSSI, C.N.; MATTA, V.L.; TOMOKANE, T.Y.; CORBETT, C.E.; SECUNDINO, N.F.; PIMENTA, P.F.; MARCONDES, M. Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector. **Vet. Parasitol.**, v.23, n.196, p.296-300. DOI: 10.1016/j.vetpar.2013.03.017
- LEVER, J.V.; TROTT, P.A.; WEBB, A.J. Fine needle aspiration cytology. **J. Clin. Pathol.**, v.38, n.1, p.1-11, 1985. PMC499065
- MAHAJAN, V.; KAUSHAL, V.; THAKUR, S.; KAUSHIK, R. A comparative study of bone marrow aspiration and bone marrow biopsy in haematological and non haematological disorders – An institutional experience. **J. Indian. Acad. Clin. Med.**, v.14, n.2, p.133-135, 2013.
- MANCIANTI, F.; GRAMICCIA, M.; GRADONI, L.; PIERI, S. Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.82, n.4, p. 566-7.1988. PMID: 3076714
- MANJU, B.; KUMAR, V.; GUPTA, N.; KAPOOR, A.; KUMAR, H.S. Role of bone marrow aspiration and biopsy in diagnosis of hematological disorders: a prospective study. **J. Pharm. Biomed. Sci.**, v.6, n.3, p.150-154, 2016. DOI: 10.20936/jpbms/160214
- MANSY, S.S. Agarose cell block: innovated technique for the processing of urine cytology for electron microscopy examination. **Ultrastruct. Pathol.**, v.28, n.1, p.15-21, 2004. DOI: 10.1080/01913120490275213
- MENEZES, R.C.; MADEIRA, M.F.; FERREIRA, L.C. Cell-block immunohistochemistry of bone marrow aspirates: a novel tool to improve the diagnosis of leishmania infection in dogs. **J. Comp. Pathol.**, v.154, n.2-3, p.157-160, 2016. DOI: 10.1016/j.jcpa.2015.12.005
- METIKURKE, S.H.; RASHMI, K.; BHAVIKA, R. Correlation of bone marrow aspirate, biopsies and touch imprint findings in pancytopenia. **J. Hematol.**, v.2, n.1, p.8-13, 2013. DOI: 10.4021/jh76w
- MILLER, C.E.; BAIN, B.J. The utility of blood and bone marrow films and trephine biopsy sections in the diagnosis of parasitic infections. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.**, v.7, n.1, 2015. DOI: 10.4084/MJHID.2015.039
- NICOLATO, R.; ABREU, R.; ROATT, B.; AGUIAR-SOARES, R.; REIS, L.; CARVALHO, M.G.; CARNEIRO, C.M.; GIUNCHETTI, R.C.; BOUILLET, L.E.M.; LEMOS, D.S.; COURA-VITAL, W.; REI, A.B. Clinical forms of canine visceral leishmaniasis in naturally *Leishmania infantum* – infected dogs and related myelogram and hemogram changes. **Plos One**, v.8, n.12, p. ,2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0082947

NODA, Y.; FUJITA, N.; KOBAYASHI, G.; ITOH, K.; HORAGUCHI, J.; TAKASAWA, O.; OBANA, T.; KOSHITA, S.; KANNO, Y.; SUZUKI, T.; HIRASAWA, D.; SUGAWARA, T.; OHIRA, T.; HARADA, Y.; TSUCHIYA, T.; SAWAI, T.; UZUKI, M.; KUROSE, A. Diagnostic efficacy of the cell block method in comparison with smear cytology of tissue samples obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. **J. Gastroenterol.**, v.45, n.8, p.868-875, 210. DOI: 10.1007/s00535-010-0217-5

ONG, M.G.; LOWERY-NORDBERG, M.; PILLARISSETTI, S.; VEILLON, D.; COTELINGAM, J. Maximizing the diagnostic yield from bone marrow aspirate material using the cell block technique on clot sections. **Lab. Med.**, v.46, n.1, p.24-27, 2015. DOI: 10.1309/LM1FRVTIKXP3TDRT

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Informe Leishmaniasis. n.4, 2016. Disponível em: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754. Acesso em 10 de setembro de 2016

PAIVA, M.B.; GOUVEIA, G.M.; FIORAVANTI, H.; LUVIZOTTO, M.C.R. Citoinclusão de capa leucocitária e medula óssea de cães: padronização da técnica. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, n.2, p.439-444, 2014. DOI: 10.1590/1678-41626125

PALATNIK-DE-SOUSA, C.B.; SANTOS, W.R.; FRANÇA-SILVA, J.C.; COSTA, R.T.; REIS, A.B.; PALATNIK, M.; MAYRINK, W.; GENARO, O. Impact of canine control on the epidemiology of canine and human visceral leishmaniasis in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.65, n.5, p.510-517, 2001. PMID: 11716106

PANDYA, A.; PATEL, T.; SHAH, N. Comparative utility of bone marrow aspiration and bone marrow biopsy. **J. Med. Dent. Sci.**, v.1, n.6, p.987-993, 2012. DOI: 10.14260/jemds/161

PAPARCONI, R.; FIORENTINO, E.; CAPPIELLO, S.; GIZZARELLI, M.; GRADONI, L.; OLIVA, G.; MANZILLO, V.F. Sternal aspiration of bone marrow in dogs: a practical approach for canine leishmaniasis diagnosis and monitoring. **J. Vet. Med.**, v.2013, p.1-4, 2013. DOI: 10.1155/2013/217314

PARAJULI, S.; TULADHAR, A. Correlation of bone marrow aspiration and biopsy findings in diagnosing hematological disorders – a study of 89 cases. **J. Pathol. Nepal**, v.4, n.7, 2014. DOI: 10.3126/jpn.v4i7.10294

PARAPIA, L.A. Trepanning or trephines: a history of bone marrow biopsy. **Br. J. Haematol.**, v. 139, n.1, p.14-19, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06749.x

PEÑA, M.T.; ROURA, X.; DAVIDSON, M.G. Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993–1998). **Vet. Ophthalmol.**, v.3, n.1, p.35–41, 2000. PMID: 11397281

RASKIN, R.E.; MESSIK, J.B. Bone marrow cytologic and histologic biopsies: indications, technique, and evaluation. **Vet. Clin. North. Am.**

- Small. Anim. Pract.**, v.42, n.1, p.23-42, 2012. DOI: 10.1016/j.cvsm.2011.10.001
- REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. **Res. Vet. Sci.**, v.81, n.1, p.68-75, 2006. DOI: 10.1016/j.rvsc.2005.09.011
- RIGO, R.S.; CARVALHO, C.M.E.; HONER, M.R.; ANDRADE, G.B.; SILVA, I.S.; RIGO, L.; FIGUEIREDO, H.R.; BARRETO, W.T.G. Achados histopatológicos renais em cães com leishmaniose visceral. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.**, v.55, n.2, p.113-116, 2013. DOI: 10.1590/S0036-46652013000200008
- RILEY, R.S.; HOGAN, T.F.; PAVOT, D.R.; FORYSTHE, R.; MASSEY, D.; SMITH, E.; WRIGHT JR, L.; BEN-EZRA, J.M. A pathologist's perspective on bone marrow aspiration and biopsy: I. Performing a bone marrow examination. **J. Clin. Lab. Anal.**, v.18, n.2, p.70-90, 2004. DOI: 10.1002/jcla.20008
- ROSA, F.A.; LEITE, J. H.; BRAGA, E. T.; MOREIRA, P.R.; BALTAZAR, F. H.; BIONDO, A.W.; PADUA, P.P.; VASCONCELOS, R.O.; CAMACHO, A. A.; FERREIRA, W.L.; MACHADO, G.F.; MARCONDES, M. Cardiac lesions in 30 dogs naturally infected with *Leishmania infantum chagasi*. **Vet. Pathol.**, v.51, n.3, p.603-606, 2014. DOI: 10.1177 / 0300985813493914
- SAJID, R.; QURESHI, A. Overwhelming bone marrow Leishmaniasis. **Turk. J. Haematol.**, v.28, n.4, p.357-358, 2011. DOI: 10.5152/tjh.2011.97
- SANTOSH, T.; PATRO, M.K.; BAL, A.K.; CHOUDHURY, A. Extensive marrow necrosis due to miliary tuberculosis: A case report. **Ann. Trop. Med. Public Health.**, v.8, n.6, p.293-295, 2015. DOI: 10.4103/1755-6783.162657
- SANTOSH, T.; PATRO, M.K.; BAL, A.K.; CHOUDHURY, A. Microfilariae in a bone marrow aspirate. **B.M.C. Res. Notes.**, v.9, p.3-4, 2016. DOI: 10.1186/s13104-016-2051-1
- SARIDOMICHELAKIS, M.N.; MYLONAKIS, M.E.; LEONTIDES, L.S.; KOUTINAS, A.F.; BILLINIS, C.; KONTOS, V.I. Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 1, p. 82-86, 2005. PMID: 16014839
- SCHMITT, F.C. Citologia aspirativa em doenças infecciosas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, n.3, p.177-179, 1997. DOI: 10.1590/S0037-86821997000300001
- SHARKEY, L.C.; WELLMAN, M.L. Diagnostic cytology in veterinary medicine: a comparative and evidence-based approach. **Clin. Lab. Med.**, v.31, n.1, p.1-19, 2011. DOI: 10.1016 / j.cll.2010.10.005.
- SILVA, E.S.; VAN DER MEIDE, W.F.; SCHOONE, G.J.; Gontijo, C.M.; Schallig, H.D.; Brazil, R.P. Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody

and DNA detection assays. **Vet. Res. Commun.**, v.30, n.6, p.637-643, 2006.

SINDHU, R.; SAHU, P.; MISHRA, D.P.; BEHERA, S.K. Correlation of bone marrow aspiration, touch imprint findings and bone marrow biopsy findings in pancytopenia. **Ann. Pathol. Lab. Med.**, v.3, n.2, p.87-93, 2016.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniasis. **Par. & Vect.**, v. 4, n.86, p.1-16, 2011. DOI: 10.1186/1756-3305-4-86

TAYLOR, B.E.; LEIBMAN, N.F.; LUONG, R.; LOAR, A.S.; CRAFT, D.M. Detection of carcinoma micrometastases in bone marrow of dogs and cats using conventional and cell block cytology. **Vet. Clin. Pathol.**, v.42, n.1, p.85-91, 2013. DOI: 10.1111/vcp.12011

TLAMCANI, Z. Visceral leishmaniasis: an update of laboratory diagnosis. **Asian Pac. J. Trop. Dis.**, v.6, n.7, p.505–508, 2016. DOI: 10.1016/S2222-1808(16)61077-0

TOI, P.C.; VARGHESE, R.B.; RAI, R. Comparative Evaluation of Simultaneous Bone Marrow Aspiration and Bone Marrow Biopsy: An Institutional Experience. **Indian. J. Hematol. Blood. Transfus.**, v.26, n.2, p.41-44, 2010. DOI: 10.1007/s12288-010-0010-x

TREVISAN, D.A.; LONARDONI, M.V.; DEMARCHI, I.G. Diagnostic methods to cutaneous leishmaniasis detection in domestic dogs and cats. **An. Bras. Dermatol.**, v.90, n.6, p.868-872, 2015. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20153716.

UNIYA, U.; LIKHAR, K.; NIGAM, R. A comparative study of bone marrow aspiration smear and cell block using romanwasky and hematoxylin and eosin stain. **The Intern. J. of Pathol.**, v.13, n.3, p.1-7, 2012.

UNIYA, U.; PATLE, Y.; JAIN, H. Comparative study of bone marrow aspiration and bone marrow clot sections in various haematological disorders. **Intern. J. Rec. Trends in Scic. Techn.**, v.19, n.1, p.17-20, 2016.

WASHABAU, R.J.; DIA, M.J.; WILLARD, M.D.; HALL, E.J.; JERGENS, A.E.; MANSELL, J.; BILZER, T.W. Endoscopic, biopsy, and histopathologic guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 24, n. 1, p. 10-26, 2010. PMID: 20391635

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. **Schalm's Veterinary Hematology**. 6st Ed. Iowa: Wiley-Blackwell; 2010, 1206p.

XAVIER, S.C.; CHIARELLI, I.M.; LIMA, W.G.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W.L. Canine visceral leishmaniasis: a remarkable histopathological picture of one asymptomatic animal reported from Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.6, p. 994-1000, 2006. DOI: 10.1590/S0102-09352006000600004

ZACHARY, J.F.; McGAVIN, M.D. **Bases da Patologia Veterinária**. 5ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 1324p.

ZANONI, D.S.; GRANDI, F.; ROCHA, N.S. Use of the agarose cell block technique in veterinary diagnostic cytopathology: an “old and forgotten” method. **Vet. Clin. Pathol.**, v.41, n.3, p.307-308, 2012. DOI: 10.1111/j.1939-165X.2012.00456.

6. ARTIGO

Normalizado segundo o periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)
http://cpro4576.publiccloud.com.br:8080/editora/downloads/normas_de_publicacao_da_revista_ABMVZ_pt.pdf

Técnicas de citologia aspirativa, biopsia e citobloco de medula óssea para identificação e determinação de intensidade parasitária na Leishmaniose Visceral Canina

[Techniques of aspiration cytology, biopsy and cell block of the bone marrow for the diagnosis and determination of parasite intensity in Canine Visceral Leishmaniasis]

T.R. Antunes^{1*}, K.C.S. Godoy¹, G.G. Oliveira¹, A.W. Silveira¹, C.A.N.R. Ramos¹, A.I. Souza¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - FAMEZ-UFMS, Campo Grande, MS

*tamires_ramborger_antunes@hotmail.com

RESUMO

O objetivo com este estudo foi comparar as técnicas de citologia aspirativa, biopsia e citobloco para identificação e quantificação parasitológica de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* em medula óssea de cães. Amostras de tecido medular de 26 animais, em diferentes estágios clínico-laboratorial da doença, foram estudadas obedecendo os mesmos critérios de investigação nas técnicas de citologia aspirativa, biopsia e citobloco. O menor número de campos para a confirmação parasitológica foi constatado no esfregaço direto obtido por citologia aspirativa. O estágio clínico-laboratorial não influenciou no número de campos necessários para a primeira visualização do agente em nenhuma das técnicas ($p > 0,05$) e menor intensidade parasitária foi observada nas lâminas de citobloco. As técnicas de citologia aspirativa e biopsia concordaram na estimativa do coeficiente de infectividade no tecido estudado ($p < 0,05$). Apesar da técnica de citobloco permitir a concentração de células e melhor reaproveitamento de amostras, não demonstrou ser um método adequado para rápida identificação e quantificação parasitológica na leishmaniose visceral canina. Considerando suas

vantagens, a citologia aspirativa foi o melhor método para detecção microscópica do parasito e determinação do nível de intensidade parasitária no tecido estudado.

Palavras-chave: cão, diagnóstico parasitológico, *Leishmania*

ABSTRACT

The aim of the present study was to compare the aspiration cytology, biopsy and cell block techniques for identification and parasitological quantification of Leishmania (Leishmania) infantum chagasi in dogs bone marrow. Bone marrow tissue samples from 26 animals, in different clinical-laboratory stages of the disease, were studied according to the same criteria of investigation in the aspiration cytology, biopsy and cell block techniques. The lowest number of fields for the parasitological confirmation was found in the direct smear obtained by aspiration cytology. The clinical-laboratory stage did not influence the number of fields required for the first visualization of the agent in any of the techniques ($p>0.05$) and less parasitic intensity was observed in the cell block slides. The aspiration cytology and biopsy techniques agreed on the estimation of infectivity coefficient in the tissue studied ($p<0.05$). Although the cell block technique allows the concentration of cells and better reutilization of samples, it has not been shown to be an adequate method for rapid identification and parasitological quantification in canine visceral leishmaniasis. Considering its advantages, aspiration cytology was the best method for microscopic detection of the parasite and determination of the level of parasite intensity in the tissue studied.

Keywords: dog, parasitological diagnosis, Leishmania

INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença endêmica, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete mamíferos, inclusive o homem. Sua epidemiologia é complexa, com variações tanto no ciclo de transmissão como nos hospedeiros reservatórios, vetores e manifestações clínicas. Diferentes espécies de *Leishmania* circulam em uma mesma área geográfica e a *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* é considerada o principal agente da LV no Brasil, destacando-se os caninos domésticos como reservatórios urbanos da enfermidade (Solano-Gallego *et al.*, 2011; Brasil, 2014).

Devido a inespecificidade dos sinais clínicos da doença, tanto nos seres humanos quanto nos animais, o diagnóstico da LV constitui muitas vezes um desafio (Gontijo e Melo, 2004; Silva *et al.*, 2006; Brasil, 2014). O método parasitológico ainda é o meio mais específico para a detecção do agente, porém de sensibilidade variável uma vez que depende da intensidade parasitária, do tipo de material biológico examinado e do número de campos observados ao microscópio (Giudice e Passantino, 2011; Solano-Gallego *et al.*, 2011; Brasil, 2014).

A avaliação do tecido medular pode ser considerada ideal para a busca do agente e monitoramento do tratamento. Estudo demonstrou que a medula óssea apresenta parasitismo persistente e sofre rápido acúmulo de amastigotas (Cotterell *et al.*, 2000), além de ser um sítio de colheita mais seguro por oferecer menor risco de ocorrência de hemorragias quando comparado à aspiração esplênica (Brasil, 2014; Georgiadou *et al.*, 2015).

Apesar de apresentar alta especificidade, a análise parasitológica é exaustiva e demorada. A avaliação de 1.000 campos, em objetiva de grande aumento, de amostras obtidas por meio de aspiração esplênica foi descrita por Chulay e Bryceson (1983) e tem sido aplicada até hoje (Ciaramella *et al.*, 1997; Cardoso, 2010; Salam *et al.*, 2012; Sundar *et al.*, 2015). Assim, a investigação de métodos que possam otimizar a detecção e acompanhamento clínico-laboratorial, utilizando o tecido medular, em diferentes estágios da LVC é de grande importância.

Portanto, o objetivo com este estudo foi comparar as técnicas de citologia aspirativa, biópsia e citobloco para identificação e quantificação parasitológica de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* em amostras de medula óssea de cães.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CEUA/UFMS) sob o protocolo de número 669/2015.

Foram utilizados 26 cães sem restrição de sexo, raça, idade e peso corporal, que apresentaram formas amastigotas de *Leishmania* sp. no exame parasitológico de linfonodo. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), realizada conforme o protocolo

descrito por Cortes *et al.* (2004), confirmou a presença e identificação da espécie *Leishmania (L.) infantum chagasi* no tecido medular.

A partir da avaliação dos sinais clínicos e dados laboratoriais os animais foram agrupados, utilizando-se adaptação da classificação de Solano-Gallego *et al.* (2011) em: estágio 1 ou doença leve (sinais clínicos leves, como linfadenomegalia periférica ou dermatite papular com ausência de alterações laboratoriais); estágio 2 ou doença moderada (sinais clínicos do estágio 1, além de lesões cutâneas simétricas ou difusas, onicogribose, anorexia, perda de peso, febre e epistaxe associadas a alterações laboratoriais, como anemia, hiperglobulinemia e hipoalbuminemia, entre outros, e perfil renal normal); estágio 3 ou doença grave (alterações laboratoriais e sinais clínicos dos estágios 1 e 2, além de sinais provenientes de lesões por imunocomplexos, tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótica e doença renal crônica por estadiamento do IRIS - *International Renal Interest Society*).

Obedecendo a Portaria Interministerial número 1.426 de 11 de julho de 2008 que dispõe sobre as normas técnicas para o combate as leishmanioses no país e após consentimento livre e esclarecido dos proprietários, os animais foram eutanasiados de acordo com a Resolução 714/2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. A colheita do material para a avaliação da medula óssea foi realizada imediatamente após a eutanásia. Em todos os cães, as amostras foram colhidas por punção do úmero proximal com o auxílio de agulha pediátrica do tipo *Jamshidi* seguindo os métodos preconizados por Grindem *et al.* (2009), padronizando-se a obtenção de 2mL e aproximadamente 1,5 cm para volume e fragmento de tecido medular, respectivamente. As amostras obtidas por aspiração foram utilizadas para realização dos esfregaços diretos e confecção dos citoblocos.

Os esfregaços foram confeccionados de acordo com Grindem *et al.* (2009) e corados com corantes do tipo Romanowsky. Os citoblocos foram processados pelo método de gel de agarose (Grefte *et al.*, 2008) e os fragmentos de biopsia de acordo com a técnica histopatológica de rotina (Gartner e Hiatt, 2007). Ambos foram corados com Hematoxilina e Eosina (HE).

Os mesmos critérios foram obedecidos na avaliação das lâminas obtidas a partir das técnicas de citologia aspirativa, de biopsia e de citobloco. A análise das lâminas foi realizada em microscópico óptico com campo de grande aumento (cga) em objetiva de

imersão (100x). A intensidade parasitária das amostras foi classificada de acordo com a adaptação do protocolo descrito por Chulay e Bryceson (1983) (Tab. 1).

Tabela 1. Metodologia para classificação, em escores, do nível de intensidade parasitária de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em amostras de medula óssea de cães.

ESCORE	Número de amastigotas	Número de campos examinados*
Grau zero	Ausentes	1.000
Grau 1+	1 - 10	501 – 1.000
Grau 2+	1 - 10	101 - 500
Grau 3+	1 - 10	11 - 100
Grau 4+	1 - 10	2 - 10
Grau 5+	1 - 10	1
Grau 6+	> 10 - 100	1
Grau 7+	> 100	1

*Objetiva de imersão (100x).

O número de campos examinados para detecção da primeira forma amastigota do agente foi comparado entre as técnicas com o teste de Friedman. Para avaliar a concordância entre os métodos aplicou-se o índice Kappa (k) simples baseado nos critérios de Landis e Koch (1977). A comparação entre os grupos clínico-laboratoriais nas três técnicas estudadas, em relação ao número de campos percorridos para a primeira observação do agente, foi realizada com o teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste Dunn, quando necessário. O teste de Friedman foi utilizado para comparar, entre as técnicas, os graus de intensidade parasitária. Para todas as análises, as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A alta especificidade do exame parasitológico e as características comportamentais do tecido medular, frente à infecção pelo agente da leishmaniose, faz com que a avaliação da medula óssea seja utilizada para o diagnóstico definitivo e monitoramento da doença (Cotterell *et al.*, 2000; Brasil, 2014; Georgiadou *et al.*, 2015).

Rotineiramente, a avaliação microscópica e confirmação da LV é realizada a partir da observação do esfregaço colhido por punção aspirativa da medula óssea (Brasil, 2014) e a análise de amostras obtidas por biopsia do tecido medular já foi empregada (Kumar *et al.*, 2007). Recentes estudos admitiram a utilização do citobloco como incremento à

investigação (Abrantes *et al.*, 2016; Menezes *et al.*, 2016), entretanto ainda não foi estabelecido qual dos três métodos apresenta mais benefícios.

Ao realizar-se a busca do parasito em cada uma das técnicas, independente do estágio clínico-laboratorial da doença, foi possível observar que houve diferença no número de campos examinados para a identificação da primeira forma amastigota. O menor número de campos para a confirmação parasitológica e, conseqüentemente, maior rapidez na determinação da positividade foi constatada no esfregaço direto (Fig. 1). Entretanto, quando as técnicas foram comparadas, não houve diferença estatística significativa entre citologia aspirativa e biopsia ($p > 0,05$) (Fig. 1).

De acordo com o Ministério da Saúde (MS), uma amostra é considerada negativa após a análise de 200 campos microscópicos em objetiva de imersão (Brasil, 2014). Contudo, no presente trabalho, a aplicação desse critério acarretaria diagnósticos falsos-negativos em 3,85% (1/26) das amostras de esfregaço direto, 3,85% (1/26) de biopsia e 11,54% (3/26) de citobloco (Fig. 1) corroborando as observações de Cardoso (2010).

Os dados também demonstraram que a investigação em 1.000 campos, empregada por vários autores na citologia aspirativa (Chulay e Bryceson, 1983; Ciaramella *et al.*, 1997; Cardoso, 2010; Salam *et al.*, 2012; Sundar *et al.*, 2015) além de exaustiva é desnecessária, já que o máximo de campos (476 cga) para a visualização da primeira forma amastigota ocorreu na técnica de citobloco.

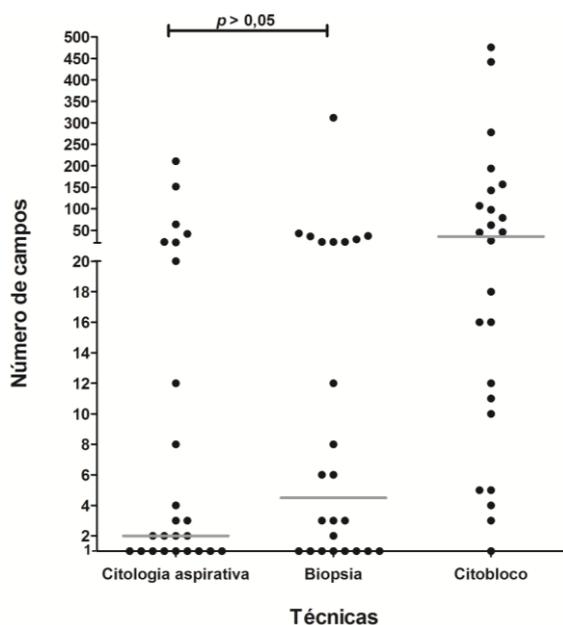


Figura 1. Número de campos avaliados para identificar a primeira forma amastigota de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em tecido medular de cães. Os resultados são expressos de acordo com a mediana

(barra) e número de campos analisados em cada técnica. A linha de bar na horizontal representa ausência de diferença estatística significativa pelo teste Friedman no nível de 5% de significância.

Independente do estágio clínico-laboratorial da doença foi possível observar discordância entre os dados obtidos por meio da citologia aspirativa com as outras técnicas investigadas ($p > 0,05$) e concordância moderada ($Kappa = 0,4583$; $p < 0,05$) entre biopsia e citobloco (Tab. 2). Esses resultados podem estar associados a frequência de falsos-negativos na biopsia (7,69%) e citobloco (7,69%).

Tabela 2. Avaliação de concordância entre as técnicas de citologia aspirativa, biopsia e citobloco de medula óssea para o diagnóstico parasitológico de leishmaniose visceral canina.

	TÉCNICAS		
	CA x B	CA x CB	B x CB
Concordância observada (%)	88,46	88,46	92,31
Kappa	- 0,05	- 0,05	0,4583
Conclusão da replicabilidade**	Pobre	Pobre	Moderada
p-value	0,3842	0,3842	0,0097*

Abreviações: CA: Citologia Aspirativa; B: Biopsia; CB: Citobloco. * $p < 0,05$. ** Landis e Koch (1977).

Na classificação clínico-laboratorial, 30,77% (8/26) dos cães apresentaram doença leve, 38,46% (10/26) moderada e 30,77% (8/26) grave. Diferença estatística significativa não foi constatada ($p > 0,05$) ao comparar esses grupos, em cada uma das técnicas, em relação ao número de campos percorridos, indicando que o estágio da enfermidade não influenciou para a primeira visualização do agente (Tab. 3).

Nas amostras dos animais no estágio 1 não foi observado diferença estatística significativa ($p > 0,05$) ao comparar, entre as técnicas, o número de campos percorridos para confirmação parasitológica. Nos estágios 2 e 3, o número de campos visualizados no esfregaço direto e nas lâminas confeccionadas a partir da biopsia foi inferior quando comparado ao citobloco (Tab. 3).

Estudo comparando citologia aspirativa e biopsia da medula óssea, para identificação de diferentes enfermidades infecciosas e não infecciosas, demonstrou que ambas as técnicas executadas na mesma área pode acarretar hipocelularidade local e promover discrepância diagnóstica entre estes métodos (Toi *et al.*, 2010). Contudo, no presente trabalho, a ausência de diferença estatística entre essas técnicas ($p > 0,05$) indicou que o

mesmo sítio de coleta não interferiu no diagnóstico parasitológico. A variabilidade observada entre o número de campos percorridos para a primeira identificação do agente pode estar associada à heterogeneidade do tecido medular na LVC (Gontijo e Melo, 2004; Honse, 2014).

A técnica do citobloco, embora tenha ratificado a positividade, exigiu maior número de campos para a primeira identificação do agente (Tab. 3) e formas amastigotas extracelulares não foram observadas durante a leitura das lâminas. Na confecção do citobloco a amostra é centrifugada e apenas o *pellet* é processado para análise (Ong *et al.*, 2015). Estudos demonstraram que a formação de uma camada de leucócitos parasitados, após a centrifugação, facilitou a detecção do agente (Abrantes *et al.*, 2016; Menezes *et al.*, 2016). Contudo, no presente trabalho, o descarte do sobrenadante pode ter provocado a eliminação de amastigotas livres e justificar a obrigatoriedade de maior número de campos para a confirmação de LVC. Menezes *et al.* (2016) admitiram a necessidade de investigações complementares para o emprego desta técnica como meio de triagem epidemiológica de rotina na doença.

Tabela 3. Mediana e quartis do número de campos examinados, em diferentes técnicas de avaliação da medula óssea, para detecção parasitológica da primeira forma amastigota de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em cães, de acordo com os diferentes estágios clínico-laboratoriais.

GRUPOS	TÉCNICAS		
	Citologia Aspirativa	Biopsia	Citobloco
	Md (1°Q; 3°Q)	Md (1°Q; 3°Q)	Md (1°Q; 3°Q)
Estágio 1	2 ^{Aa} (1;7)	15 ^{Aa} (3;37)	63 ^{Aa} (10; 191)
Estágio 2	4 ^{Aa} (2;17)	3 ^{ABa} (1; 23)	16 ^{Ba} (9; 44)
Estágio 3	2 ^{ABa} (1;28)	2 ^{Aa} (1;8)	54 ^{Ba} (17;147)

Abreviações: Md: mediana; 1°Q: primeiro quartil; 3°Q: terceiro quartil. Medianas seguidas de letras maiúsculas diferentes nas linhas diferem estatisticamente pelo teste de Friedman ($p < 0,05$) e medianas seguidas das mesmas letras minúsculas nas colunas não diferem estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis ($p > 0,05$).

A determinação da intensidade parasitária por microscopia óptica é considerada um método barato e confiável que pode ser utilizada para avaliar o grau da resposta do paciente ao tratamento e determinar a correlação entre infectividade e alterações clínico-laboratoriais (Chulay e Bryceson, 1983; Cardoso, 2010; Singh *et al.*, 2010). Reis *et al.*

(2006) destacaram a utilização da quantificação parasitológica na medula óssea como um marcador auxiliar confiável na investigação do estágio clínico-infeccioso na LVC.

No presente estudo, independente do estágio clínico-laboratorial da doença, observou-se menor intensidade parasitária nas lâminas de citobloco (Fig. 2). Os efeitos causados pelo processamento do material, como apontado anteriormente, podem ter subestimado esses valores.

Após a investigação de 1.000 campos foi possível classificar em grau zero 3,85% (1/26) dos esfregaços diretos, 7,69% (2/26) das biopsias e 7,69% (2/26) dos citoblocos (Fig. 2), com ausência de coincidência de negatividade das amostras nas três técnicas, corroborando a capacidade diagnóstica da investigação no esfregaço direto. Em relação à estratificação em diferentes graus de parasitismo não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre amostras obtidas por citologia aspirativa e biopsia (Fig. 2), indicando que ambas as técnicas concordaram na estimativa do coeficiente de infectividade no tecido estudado. Entretanto, cabe destacar a facilidade de obtenção, processamento e custo da técnica de citologia aspirativa (Grindem *et al.*, 2009). Contudo, ressalta-se a necessidade de estudos que permitam a validação deste teste em relação à quantificação parasitária na medula óssea.

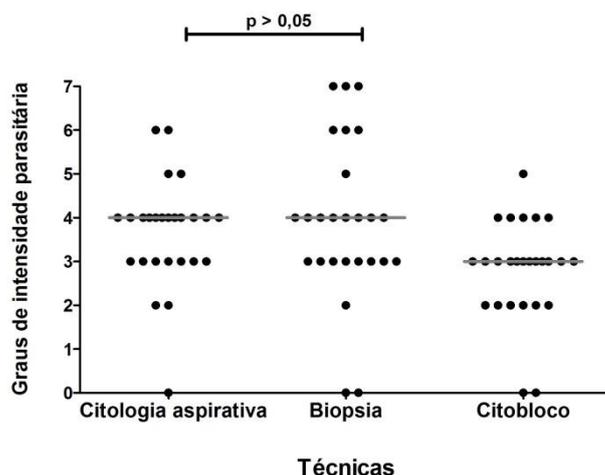


Figura 2. Comparação entre as técnicas de avaliação parasitológica da medula óssea para determinação da intensidade parasitária de amastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* em tecido medular de cães. Os resultados são expressos de acordo com a mediana (barra) e número de amostras classificadas nos diferentes graus de intensidade parasitária em cada técnica. A linha de bar na horizontal representa ausência de diferença estatística significativa pelo teste Friedman no nível de 5% de significância.

CONCLUSÕES

Apesar da técnica de citobloco permitir a concentração de células e melhor reaproveitamento de amostras, não demonstrou ser um método adequado para identificação rápida e quantificação parasitológica na LVC. Considerando suas vantagens, a citologia aspirativa foi a melhor técnica para detecção microscópica do parasito e determinação do nível de intensidade parasitária no tecido estudado.

AGRADECIMENTOS

A Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT) pelas bolsas de estudos concedidas.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, T.R.; MADEIRA, M.F.; SILVA, D.A. *et al.* Identification of canine visceral leishmaniasis in a previously unaffected area by conventional diagnostic techniques and cell-block fixation. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.58, n.3, p.1-5, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 1ed., 5 reimpr., Brasília: Ministério da Saúde, p.120, 2014.
- CARDOSO, A.I.Q. *Densidade parasitária em medula óssea de crianças com Leishmaniose Visceral e sua relação com os aspectos clínicos, laboratoriais e do tratamento.* 2010. 61f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.
- CIARAMELLA, P.; OLIVA, G.; DE LUNA, R. *et al.* A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.*, v.141, n.21, p.539-343, 1997.
- CHULAY, J. D.; BRYCESON, A.D.M. Quantification of amastigotes of *Leishmania donovani* in smears of splenic aspirates from patients with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 32, n. 3, p. 475-479, 1983.
- CORTES, S.; ROLÃO, N.; RAMADA, J.; CAMPINO, L. PCR as a rapid and sensitive tool in the diagnosis of human and canine leishmaniasis using *Leishmania donovani* s.l.-specific kinetoplastid primers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.98, n.1, p.12-17, 2004.

- COTTERELL, S.E.; ENGWERDA, C.R.; KAYE, P.M. *Leishmania donovani* infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. *Blood.*, v.95, n.5., p.1642-1651, 2000.
- GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. *Tratado de histologia em cores, tradução da 3ª edição*. Rio de Janeiro: Elsevier, 592 p., 2007.
- GEORGIADOU, S.P.; MAKARITSIS, K.P.; DALEKOS, G.N. Leishmaniasis revisited: Current aspects on epidemiology, diagnosis and treatment. *J. of Translat. Intern. Med.*, v.3, n.2, p.43-50, 2015.
- GIUDICE, E.; PASSANTINO, A. Detection of *Leishmania* amastigotes in peripheral blood from four dogs – short communication. *Acta Vet. Hung.*,v.59, n.2, p.205-213, 2011.
- GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.7,n.3, p.338-349, 2004.
- GREFTE, J.M.M.; DE WILD, P.C.; SALET-VAN DE POL, M.R.J. *et al.* Improved Identification of Malignant Cells in Serous Effusions Using a Small, Robust Panel of Antibodies on Paraffin-Embedded Cell Suspensions. *Acta Cytol.*, v. 54, n.1, p.35-44, 2008.
- GRINDEM, C.B.; TYLER, R.D.; COWELL, R.L. A medula óssea. In: COWELL, R.L.; TYLER, R.D.; MEINKOTH, J.H.; DENICOLA, D.B. (Ed). Diagnóstico citológico e hematologia de cães e gatos.3.ed. São Paulo: Med.Vet, p. 423-451, 2009.
- HONSE, C. O. *Avaliação citopatológica da medula óssea e perfil hematológico de cães naturalmente infectados por Leishmania (Leishmania) chagasi*. 2014. 81f. Tese (Doutorado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Rio de Janeiro.
- KUMAR, P.V.; VASEI, M.; SADEGHIPOUR, A. *et al.* Visceral Leishmaniasis: Bone Marrow Biopsy Findings. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, v.29, n.2, p.77-80, 2007.
- LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometr.*, v. 33, n. 2, p.363-374, 1977.
- MENEZES, R.C.; MADEIRA, M.F.; FERREIRA, L.C. Cell-block Immunohistochemistry of Bone Marrow Aspirates: a Novel Tool to Improve the

Diagnosis of Leishmania Infection in Dogs. *J. Comp. Pathol.*, v.154, n. 2-3, p.157-160, 2016.

ONG, M.G.; LOWERY-NORDBERG, M.; PILLARISSETTI, S. *et al.* Maximizing the diagnostic yield from bone marrow aspirate material using the cell block technique on clot sections. *Lab. Med.*, v.46, n.1, p.24-27, 2015.

REIS, A.B.; MARTINS-FILHO, O.A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. *et al.* Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.*, v.81, n.1, p.68-75, 2006.

SALAM, M.A.; KHAN, M.G.M.; BHASKAR, K.R.H. *et al.* Peripheral Blood Buffy Coat Smear: a Promising Tool for Diagnosis of Visceral Leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, v.50, n.3, p.837-840, 2012.

SILVA, E.S.; VAN DER MEIDE, W.F.; SCHOONE, G.J. *et al.* Diagnosis of canine leishmaniasis in the endemic area of Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil by parasite, antibody and DNA detection assays. *Vet. Res. Commun.*, v.30, n.6, p.637-643, 2006.

SINGH, U.K.; PRASAD, R.; JAISWAL, B.P. *et al.* Amphotericin B therapy in children with visceral leishmaniasis: daily vs. alternate day, a randomized trial. *J Trop. Pediatr.*, v.56, n.5, p.321-324, 2010.

SOLANO-GALLEGO, L.; MIRÓ, G.; KOUTINAS, A. *et al.* LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Par. & Vect.*, v. 4, n.86, p.1-16, 2011.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; CHAKRAVARTY, J. Single-dose indigenous liposomal amphotericin B in the treatment of Indian visceral leishmaniasis: a phase 2 study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.92, n.3, p.513-517, 2015.

TOI, P.C.; VARGHESE, R.B.; RAI, R. Comparative Evaluation of Simultaneous Bone Marrow Aspiration and Bone Marrow Biopsy: An Institutional Experience. *Indian. J. Hematol. Blood. Transfus.*, v.26, n.2, p.41-44, 2010.

7. ANEXOS

7.1. Anexo 1 - Ficha para análise clínica

Identificação: _____ Idade: _____ Sexo: _____ Raça: _____ Peso: _____

Temp.: _____ °C FC: _____ bpm FR: _____ mpm TPC: _____ segundos Hidratação: _____

Pulso arterial:

Regular Irregular Filiforme Fraco Normal Outro:

Mucosas:

Rosadas Congestas Hiperêmicas Cianóticas Ictéricas Pálidas

Nível de consc.:

Alerta Deprimido Estupor Coma

Estado

nutricional:

Caquético Magro Normal Obeso Muito obeso

Ectoparasitas:

Não Sim. Qual? _____

Linfadenopatia:

Ausente Presente
 Local Generalizada

Perda de Peso:

Ausente Presente

Fraqueza:

Ausente Presente

Onicogrífose:

Ausente Presente

Anorexia:

Ausente Presente

Hiporexia:

Ausente Presente

Vômito:

Ausente Presente

Diarreia:

Ausente Presente

Melena:

Ausente Presente

Hematoquezia:

Ausente Presente

Epistaxe:

Ausente Presente

Petéquias:

Ausente Presente

Sufusões:

Ausente Presente

Hiperpigmentação:

Ausente Presente.

Eritema:

Ausente Presente. Localização:

Úlceras:

Ausente Presente. Localização:

Nódulos

Ausente Presente. Localização:

Pústulas:

Ausente Presente. Localização:

Alopecia:

Ausente Presente. Localização:

Descamação:

Ausente Presente. Localização:

Lesão de pina:

Ausente Presente

Uveíte:

Ausente Presente

Blefarite:

Ausente Presente

Conjuntivite:

Ausente Presente

Polidipsia:

Ausente Presente

Outras alterações: N (normal) A (Anormal)

Olhos: N A Descrição: _____

Orelhas: N A Descrição: _____

Pele e anexos: N A Descrição: _____

Respiratório: N A Descrição: _____

Circulatório: N A Descrição: _____

Abdome: N A Descrição: _____

Digestório: N A Descrição: _____

Urinário: N A Descrição: _____

Genital: N A Descrição: _____

Postura e movimentação: N A Descrição: _____

Músculo-esquelético: N A Descrição: _____

Nervoso: N A Descrição: _____

Hemolinfático: N A Descrição: _____

Cavidade oral: N A Descrição: _____

Outros: _____