

A Transformação da Agronomia e o Perfil do Novo Profissional



Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos
Analya Roberta Fernandes Oliveira
Kleber Veras Cordeiro
(Organizadores)

A Transformação da Agronomia e o Perfil do Novo Profissional



Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos
Analya Roberta Fernandes Oliveira
Kleber Veras Cordeiro
(Organizadores)

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação: Karine de Lima

Edição de Arte: Lorena Prestes

Revisão: Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais

Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília

Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa

Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia

Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá

Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima

Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões

Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dr. Gustavo Henrique Cepolini Ferreira – Universidade Estadual de Montes Claros

Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice

Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense

Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso

Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins

Prof. Dr. Luis Ricardo Fernandes da Costa – Universidade Estadual de Montes Claros

Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte

Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará

Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa

Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste

Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia

Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador

Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará

Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás
Prof. Dr. Cleberton Correia Santos – Universidade Federal da Grande Dourados
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Profª Drª Eysler Gonçalves Maia Brasil – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Fernando José Guedes da Silva Júnior – Universidade Federal do Piauí
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Luís Paulo Souza e Souza – Universidade Federal do Amazonas
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Marcus Fernando da Silva Praxedes – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto

Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás
Prof^a Dr^a Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande
Prof^a Dr^a Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá
Prof^a Dr^a Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza
Prof. Me. Adalto Moreira Braz – Universidade Federal de Goiás
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof^a Dr^a Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof^a Dr^a Andrezza Miguel da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais
Prof^a Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar
Prof^a Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos
Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo
Prof^a Dr^a Cláudia Taís Siqueira Cagliari – Centro Universitário Dinâmica das Cataratas
Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará
Prof^a Ma. Daniela da Silva Rodrigues – Universidade de Brasília
Prof^a Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco
Prof. Me. Douglas Santos Mezacas – Universidade Estadual de Goiás
Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil
Prof. Me. Eduardo Gomes de Oliveira – Faculdades Unificadas Doctum de Cataguases
Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Prof. Me. Euvaldo de Sousa Costa Junior – Prefeitura Municipal de São João do Piauí
Prof^a Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora
Prof. Dr. Fabiano Lemos Pereira – Prefeitura Municipal de Macaé
Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas
Prof^a Dr^a Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo
Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária
Prof. Dr. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná
Prof. Me. Gustavo Krahl – Universidade do Oeste de Santa Catarina
Prof. Me. Helton Rangel Coutinho Junior – Tribunal de Justiça do Estado do Rio de Janeiro
Prof^a Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College
Prof^a Ma. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Prof. Me. Jhonatan da Silva Lima – Universidade Federal do Pará
Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay
Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco

Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Kamilly Souza do Vale – Núcleo de Pesquisas Fenomenológicas/UFPA
 Profª Drª Karina de Araújo Dias – Prefeitura Municipal de Florianópolis
 Prof. Dr. Lázaro Castro Silva Nascimento – Laboratório de Fenomenologia & Subjetividade/UFPR
 Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará
 Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ
 Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás
 Prof. Me. Lucio Marques Vieira Souza – Secretaria de Estado da Educação, do Esporte e da Cultura de Sergipe
 Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados
 Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual do Paraná
 Prof. Dr. Michel da Costa – Universidade Metropolitana de Santos
 Prof. Dr. Marcelo Máximo Purificação – Fundação Integrada Municipal de Ensino Superior
 Prof. Me. Marcos Aurelio Alves e Silva – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de São Paulo
 Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
 Prof. Me. Ricardo Sérgio da Silva – Universidade Federal de Pernambuco
 Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados
 Profª Ma. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
 Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo
 Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana
 Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
T772	<p>A transformação da agronomia e o perfil do novo profissional [recurso eletrônico] / Organizadores Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos, Analya Roberta Fernandes Oliveira, Kleber Veras Cordeiro. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.</p> <p>Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-65-5706-106-0 DOI 10.22533/at.ed.060201606</p> <p>1. Agronomia – Pesquisa – Brasil. I. Silva-Matos, Raissa Rachel Salustriano da. II. Oliveira, Analya Roberta Fernandes. III. Cordeiro, Kleber Veras.</p> <p style="text-align: right;">CDD 630</p>
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
 Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
 contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

Ao longo dos anos, o perfil do profissional das agrárias vem sofrendo mudanças contínuas e dinâmicas, associada as crescentes modificações no campo e mercado. Dessa forma, o profissional necessita ser mais versátil para acompanhar as transformações sofridas pelo setor agrário, de maneira a empregar os conhecimentos adquiridos na academia, de uma forma mais proativa possível, para estreitar uma boa relação de serviços prestados, promovendo um melhor desenvolvimento rural, priorizando fortalecer o cenário agrícola.

Dessa forma, o novo perfil de profissional tem que ser aquele voltado para a pluridisciplinaridade. Envolvendo tecnologias, sejam elas de precisão, inovadoras, sustentáveis, mercadológicas, empreendedoras, entre outras, associadas com a tecnologia da informação e comunicação, visando agregar valor às cadeias produtivas. Sendo o papel do engenheiro agrônomo prestar serviços, apresentar propostas e respostas para os problemas presentes no campo, como também orientar os produtores sobre as práticas mais adequadas de acordo com suas necessidades, visando produção responsável, rentável e sustentável, afim de suprir a demanda por alimentos no mundo.

De acordo com essas modificações crescentes do quadro das agrárias e as necessidades por profissionais mais capacitados para suprir as dificuldades presentes no campo, o livro “A Transformação da Agronomia e o Perfil do Novo Profissional” aborda artigos com conteúdo amplos que visam elucidar essas lacunas presentes no meio agrícola. A obra apresenta 14 trabalhos sobre análises, técnicas, práticas e inovações que são fundamentais para o acompanhamento do desenvolvimento agrícola. Nesse contexto, busca-se proporcionar ao leitor materiais técnicos e científicos que contribuam para o desenvolvimento, formação e entendimentos, visando melhorias para a agricultura. Desejamos uma excelente leitura!

Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos
Analya Roberta Fernandes Oliveira
Kleber Veras Cordeiro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE EM LINHAGENS DE FEIJÃO-CAUPI	
Edjane Mayara Ferreira Cunha Thaise Kessiane Teixeira Freitas Érica Mendonça Pinheiro Maurisrael de Moura Rocha Marcos Antônio da Mota Araújo Regilda Saraiva dos Reis Moreira-Araújo	
DOI 10.22533/at.ed.0602016061	
CAPÍTULO 2	7
PRODUTIVIDADE FEIJÃO-CAUPI CULTIVADOS NO ÉCOTONO CERRADO – PANTANAL	
Taiciara Cleto Rodrigues Carla Medianeira Giroletta dos Santos Jeferson Antonio dos Santos Silva Mariele Trindade Silva Evani Ramos Menezes da Silva Gabriela Guedes Côrrea Hadassa Kathyuci Antunes de Abreu Denise Prevedel Capristo Ricardo Fachinelli Anderson Ramires Candido Agenor Martinho Correa	
DOI 10.22533/at.ed.0602016062	
CAPÍTULO 3	17
CULTIVO ORGÂNICO DE PIMENTÃO: EFEITO DA CAMA DE FRANGO E ESTERCO BOVINO NA PRODUTIVIDADE	
Andressa Caroline Foresti Lucas Coutinho Reis Edson Talarico Rodrigues Erika Santos Silva Cristiane Bezerra Ferrari Santos Cleberton Correia Santos Michele da Silva Gomes Valéria Surubi Barbosa Elinéia Rodrigues da Cruz Vânia Tomazelli de Lima	
DOI 10.22533/at.ed.0602016063	
CAPÍTULO 4	28
DETERMINAÇÃO DO COEFICIENTE DE CULTIVO DA CANA-DE-AÇÚCAR DE ANO	
Ana Laura Fialho de Araujo Jaqueline Silva Magalhães	
DOI 10.22533/at.ed.0602016064	
CAPÍTULO 5	33
EXTRATO AQUOSO DE <i>Styrax camporum</i> POHL. (STYRACACEAE) AFETA FASE LARVAL E PUPAL DE TRAÇA-DAS-CRUCÍFERAS	
Isabella Maria Pompeu Monteiro Padial Silvana Aparecida de Souza Eliana Aparecida Ferreira	

Natália Pereira de Melo
Gisele Silva de Oliveira
Munir Mauad
Rosilda Mara Mussury

DOI 10.22533/at.ed.0602016065

CAPÍTULO 6 43

INFLUÊNCIA DO ADJUVANTE ATUMUS NA APLICAÇÃO DE HERBICIDAS

Tatiane do Vale Matos
Ledenilson Izaias da Silva
Samuel Almeida da Silva Filho
Andrei Araújo Andrade
Fabricio da Silva Santos
Cácia Leila Tigre Pereira Viana
Mateus Luiz Secretti
Wesley Souza Prado

DOI 10.22533/at.ed.0602016066

CAPÍTULO 7 49

MANEJO NUTRICIONAL ALTERNATIVO PARA O CULTIVO DO TRIGO

Lucas Cardoso Nunes
Vanderson Henrique Borges Lacerda
Wellington Roberto Rambo
Andrei Corassini Williwoch
Andre Luna
Luca Weber Kinast
Lucas Henrique dos Santos
Mateus Felipe Pugens
Rafael Henrique Finkler
Vinicius de Barros Prodocimo
Bruno Frank
Felipe Ritter

DOI 10.22533/at.ed.0602016067

CAPÍTULO 8 63

RESPOSTAS MORFOFISIOLÓGICAS EM LINHAGENS DE FEIJÃO-CAUPI À SALINIDADE DA ÁGUA DE IRRIGAÇÃO

Antônio Aécio de Carvalho Bezerra
João Pedro Alves de Aquino
Francisco de Alcântara Neto
Carlos José Goncalves de Souza Lima
Romário Martins Costa

DOI 10.22533/at.ed.0602016068

CAPÍTULO 9 75

TECNOLOGIA PARA SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA FÍSICA DE SEMENTES DE *TURNERA SUBULATA*: UMA ESPÉCIE NATIVA COM POTENCIAL PARA PAISAGISMO EM ÁREAS DE RESTINGA

Anthony Côrtes Gomes
Rogério Gomes Pêgo
Michele Cagnin Vicente
Cyndi dos Santos Ferreira
Luana Teles Barroso

DOI 10.22533/at.ed.0602016069

CAPÍTULO 1085

ANÁLISE OPERACIONAL DA DERRUBADA DE ÁRVORES COM HARVESTER EM CORTE RASO DE POVOAMENTOS DE *Pinus taeda* L.

Luís Henrique Ferrari
Jean Alberto Sampietro
Vinicius Schappo Hillesheim
Erasmus Luis Tonett
Franciny Lieny Souza
Helen Michels Dacoregio
Daiane Alves de Vargas
Marcelo Bonazza
Natali de Oliveira Pitz

DOI 10.22533/at.ed.06020160610

CAPÍTULO 1194

DIAGNÓSTICO MOLECULAR QUALITATIVO POR PCR PARA DETECÇÃO DE *LEISHMANIA* SP. EM CÃES

Mariana Bibries Carvalho Silva
Natália Bilesky José
Andrea Cristina Higa Nakaghi
Renata de Lima

DOI 10.22533/at.ed.06020160611

CAPÍTULO 12108

ANÁLISE COPROPARASITOLÓGICA DE AVES SILVESTRES NO CAMPUS FERNANDO COSTA - USP PIRASSUNUNGA

Mayara de Melo
Laís Veríssimo da Silva
Maria Estela Gaglianone Moro

DOI 10.22533/at.ed.06020160612

CAPÍTULO 13116

USO DA CABERGOLINA E DO EFEITO MACHO PARA INDUÇÃO DO ESTRO EM CADELAS SHIH TZU

Bianca Gianola Belline Silva
Ana Carolina Rusca Correa Porto
José Nélio de Souza Sales
Lilian Mara Kirsch Dias

DOI 10.22533/at.ed.06020160613

CAPÍTULO 14126

ANÁLISE *IN VITRO* DA EFICÁCIA CARRAPATICIDA E DA ATIVIDADE REPELENTE DA ÁGUA DE MANIPUERIA SOBRE *Boophilus microplus* NO EXTREMO SUL DA BAHIA

Breno Meirelles Costa Brito Passos
Lívia Santos Lima Lemos
Gisele Lopes de Oliveira
Jeilly Vivianne Ribeiro da S. B. de Carvalho
Paulo Sérgio Onofre
Rita de Cassia Francisco Santos
Paulo Vitor Almeida Nascimento

DOI 10.22533/at.ed.06020160614

SOBRE OS ORGANIZADORES.....139

ÍNDICE REMISSIVO140

DIAGNÓSTICO MOLECULAR QUALITATIVO POR PCR PARA DETECÇÃO DE *Leishmania* sp. EM CÃES

Data de submissão: 05/03/2020

Data de aceite: 10/06/2020

Mariana Bibries Carvalho Silva

Universidade de Sorocaba, Graduanda em
Medicina Veterinária
Sorocaba – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/6031925338220840>

Natália Bilesky José

Universidade de Sorocaba, Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, Labiton.
Sorocaba – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/3706661482909113>

Andrea Cristina Higa Nakaghi

Universidade de Sorocaba, Graduação em
Medicina Veterinária
Sorocaba – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/5481790882198464>

Renata de Lima

Universidade de Sorocaba, Pós-graduação em
Ciências Farmacêuticas, Pós -graduação em
Processos Tecnológicos e Ambientais, Labiton.
Sorocaba – São Paulo
<http://lattes.cnpq.br/9121907190104646>

RESUMO: INTRODUÇÃO: A Leishmaniose é uma doença de caráter zoonótico causada por um protozoário intracelular e transmitida à mamíferos por um vetor invertebrado. O aumento da incidência desta enfermidade é vinculado a fatores como a dificuldade em eliminar

reservatórios, diversidade epidemiológica das regiões afetadas, altos custos financeiros para sustentação de ações de controle e alta capacidade de adaptação do vetor. Por este motivo, vem sendo necessário maiores estudos e pesquisas relacionados a esta doença. Em busca de um diagnóstico seguro e rápido, técnicas moleculares como a PCR vêm sendo estudadas já que os exames diagnósticos mais utilizados, entre eles a sorologia, comumente apresentam resultados falsos positivos devido sua alta sensibilidade. **OBJETIVOS:** Utilizar a técnica de PCR para detectar *Leishmania* sp. em amostras de mucosa ocular e linfonodo de cães participantes do inquérito sorológico das cidades de Sorocaba e Salto de Pirapora. **MÉTODOS:** Foram coletados aspirados de linfonodos reativos e fricção de um SWAB estéril na mucosa ocular, passando por extração de DNA seguido por análise em PCR, com seu produto corrido em eletroforese utilizando gel de agarose para a visualização dos resultados. **RESULTADOS:** Das 109 amostras conjuntivais analisadas, 22 apresentaram resultados positivos. Esta ocorrência se dá devido ao grande fluxo sanguíneo local que propicia a permanência da *Leishmania* dentro de macrófagos. Em relação as amostras de linfonodo, estas não apresentaram nenhum resultado positivo, mesmo sabendo-se que o protozoário possui tropismo por tecido linfóide.

A PCR como método diagnóstico é válida e pode ser associada a outros testes, assim como pode ser utilizada em pesquisas de campo de larga escala, visto que o teste proposto utiliza amostras de fácil e rápida coleta, além de não invasiva. Este teste também se mostra importante ao permitir o diagnóstico precoce de animais assintomáticos ou imunossuprimidos.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania sp.* PCR. Cães.

QUALITATIVE MOLECULAR DIAGNOSIS USING PCR TO DETECT VISCERAL LEISHMANIA IN DOGS

ABSTRACT: INTRODUCTION: Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by an intracellular protozoan and transmitted to mammals by an invertebrate vector. The increase in the incidence of this disease is linked to factors such as difficulty in eliminating reservoirs, epidemiological diversity in affected regions, high financial costs to support control actions and high capacity to adapt the vector. For this reason, further studies and research related to this disease have been necessary. In search of a safe and fast diagnosis, molecular techniques such as PCR have been studied since the most used diagnostic exams, including serology, false results are commonly found that affect their high sensitivity. **OBJECTIVES:** To use PCR technique to detect *Leishmania sp.* in samples of ocular mucosa and lymph node from dogs participating in the serological study in the cities of Sorocaba and Salto de Pirapora. **METHODS:** Reactive lymph node was aspirated, and the ocular mucosa was collected by rubbing a sterile SWAB, undergoing DNA extraction after PCR analysis, with its product corrected in electrophoresis using agarose gel to answer the results. **RESULTS:** Of the 109 samples analyzed, 22 obtained positive results. This occurrence is due to the large local blood flow that allows *Leishmania* to remain within macrophages. Regarding the lymph node samples, these did not present any positive results, even though they know that the protozoan has tropism by lymphoid tissue. A PCR as a diagnostic method is valid and can be associated with other tests, as well as it can be used in large-scale field research, since it is a test used using easy and fast collection applications, in addition to being non-invasive. This test also shows the importance of allowing the early diagnosis of asymptomatic or immunosuppressed animals.

KEYWORDS: *Leishmania sp.* PCR. Dogs.

1 | INTRODUÇÃO

A Leishmaniose canina é um problema atual, sendo necessário novas pesquisas sobre sua investigação e diagnóstico. A utilização de técnicas moleculares vem sendo estudada nos últimos anos na tentativa de se obter um diagnóstico mais seguro e rápido. Devido à falha de detecção de alguns métodos existentes, a utilização da técnica de PCR pode trazer uma contribuição na detecção mais precisa em inquéritos a serem realizados.

2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A Leishmaniose visceral (LV) é considerada uma das principais zoonoses potencialmente fatais distribuídas nas Américas (BANETH, et al., 2008), inicialmente caracterizada por ser uma doença de áreas rurais, e que nos últimos anos vem se alastrando por áreas urbanas em vários estados no Brasil (GUIMARÃES E SILVA, 2017). Tem sido considerada uma doença reemergente por possuir fatores epidemiológicos que auxiliam para o aumento da sua ocorrência, por exemplo, a urbanização constante, o convívio íntimo entre cães e o homem, a migração, desmatamento e ocupação de matas residuais, e no hospedeiro, as doenças imunossupressoras são os principais fatores de risco (ORYAN e AKBARI, 2016, ABRANTES et al., 2018).

Dados estatísticos mostram a ocorrência da doença em humanos em 73 municípios, com 505 casos e 40 óbitos do ano de 2014 a 2017 (Superintendência de Controle de Endemias – SUCEN). Dados epidemiológicos mostram a expansão geográfica da LV em cães nos vários estados brasileiros, que vem sendo atribuída a fatores como dificuldades em eliminar reservatórios, diversidade epidemiológica das regiões afetadas, altos custos financeiros para sustentação de ações de controle e alta capacidade de adaptação do vetor ao peridomicílio (OLIVEIRA et al., 2008).

A enfermidade é causada pelo protozoário intracelular, que inicialmente era denominado *Leishmania chagasi*, mas que foi reclassificado como *Leishmania infantum* com base na sua origem nas cepas do Velho Mundo (KUHLS et al., 2011). O ciclo deste parasita envolve hospedeiros mamíferos susceptíveis e um vetor. Este apresenta sua forma promastigota em desenvolvimento no interior do aparelho digestivo dos vetores e amastigota no sistema monocítico fagocitário dos hospedeiros (AWASTHI, 2004). A transmissão da *L. infantum* de cães domésticos pela picada de insetos foi mostrada por volta dos anos 30 e estudos posteriores mostram a alta prevalência de infecção e alta morbidade nos cães e sua importante participação como reservatório deste parasita (QUINNELL e COURTENAY, 2009).

No cão a Leishmaniose é uma doença sistêmica e pode acometer qualquer órgão, sistema ou fluídos orgânicos. Sinais dermatológicos são os mais comumente observados e podem estar acompanhados de outros sinais clínicos e de anormalidades clinicopatológicas (KASZAK et al., 2015), esta pode se apresentar de diversas formas, desde enfermidade subclínica ou manifestada apenas como uma doença auto-limitante; e em outros casos, como doença severa e até levado o animal ao óbito. A presença ou ausência de manifestações clínicas estão diretamente relacionadas ao tipo de resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro. O complexo quadro clínico e laboratorial da Leishmaniose Visceral Canina motivou o formação de um sistema de 4 estágios da enfermidade, muito utilizado para decisão da terapia e na determinação do prognóstico. O animal é considerado no estágio I se apresentar linfadenomegalia ou dermatite papular que sugerem leishmaniose e níveis baixos de anticorpos, já o animal que apresentar além desses sinais, lesões dermatológicas mais acentuadas, sinais inespecíficos como anorexia, perda de peso, febre e epistaxe, e

ainda discretas alterações hematológicas, pode estar no estágio II. Os estágios III e IV são estágios nos quais o animal apresenta sinais clínicos de lesões imuno-mediadas, como vasculite, uveíte, glomerulonefrite, além de alterações laboratoriais importantes, mostrando acometimento renal, e são diferenciados pela intensidade dos sinais e das alterações clinicopatológicas (SOLANO-GALLEGO et al, 2017).

As opções de diagnósticos laboratoriais da Leishmaniose nos cães incluem testes de detecção direta através da citologia, imunohistoquímica (FARIA e ANDRADE, 2012) e cultura da *Leishmania infantum*, xenodiagnóstico, testes moleculares como PCR; e de detecção indireta através de testes sorológicos (SRIVASTAVA et al., 2011; SINGH and SUNDAR, 2015; SOLANO-GALLEGO, et al., 2017). O teste sorológico por ELISA é o mais utilizado, em geral apresenta boa sensibilidade, porém alguns estudos mostraram que podem ocorrer reações cruzadas não sendo tão preciso como o esperado, muitas vezes não detectando casos subclínicos ou existindo casos de falso-negativos devido à supressão imunológica dos pacientes (CRUZ et al., 2006).

Desta forma nos últimos anos a técnica de PCR vem sendo cogitada como uma possível forma de diagnóstico, podendo ser realizada a análise molecular, podendo esta ser realizada com diferentes tecidos, como sangue, pele, medula óssea e linfonodos (MONDAL et al., 2010). Diferentes técnicas de PCR já foram utilizadas para amplificação do DNA de espécies do gênero *Leishmania*, e para tais reações sangue total, aspirados de linfonodo e de medula óssea (KHATUN et al., 2017), swab conjuntival (OLIVEIRA et al. 2015) e swab oral (ASCHAR et al., 2016) já foram utilizadas e mostraram-se viáveis para o diagnóstico da infecção nos cães. É um método de escolha para análises de amostras com pequena quantidade de parasitas como sangue e células conjuntivais (OLIVEIRA et al., 2015). Em áreas endêmicas, a interpretação dos resultados dos testes sorológicos para Leishmaniose é dificultada pela alta soroprevalência dos animais sub-clínicos, e muitos veterinários recorrem a PCR para a confirmação do diagnóstico (FRANCINO et al., 2006).

Minicirculos de DNA contidos no cinetoplasto (kDNA) da *Leishmania* tem sido utilizado como alvo da maioria dos testes moleculares desenvolvidos para detecção de indivíduos do gênero, apesar da descrição de outras regiões já testadas como *Internal Transcribed Spacer-1* (ITS-1), 18SrRNA e glicoproteína-63 (gp-63) (TRAVI et al. 2018).

Estudos comparando a PCR em diferentes amostras, mostrou que swabs orais podem detectar positividade em animais doentes ou até assintomáticos, porém para estes é indicada a associação de testes sorológicos (ASCHAR et al., 2016). Células epiteliais da conjuntiva também são viáveis para a detecção de DNA de *Leishmania*, com alta sensibilidade para o diagnóstico em cães sintomáticos (PILATTI et al., 2009) ou assintomáticos (ALMEIDA FERREIRA et al., 2012).

A desvantagem de se utilizar a PCR é a ocorrência de falsos positivos, obtidos por DNA contaminante, técnicas que são padronizadas realizadas de formas diferentes nos laboratórios de diagnóstico, não da informações sobre a imunidade do animal e portanto não pode ser utilizado de forma isolada no diagnóstico da doença (SOLANO-GALLEGO et al, 2017). Por ser um método muito utilizado para confirmar a infecção, seus resultados

são utilizados para confrontar com resultados de sorologia (QUEIROZ; 2010; FARIA et al., 2017; SOLANO-GALLEGO et al., 2017, TRAVI et al., 2018). Em 2017, a análise do impacto orçamentário dos testes diagnósticos para a Leishmaniose humana no Brasil mostraram vantagens econômicas e de sensibilidade em se utilizar a PCR em substituição a citologia da punção de medula em humanos, e a implantação do teste rápido imunocromatográfico (IT LEISH) em substituição ao teste ELISA (KALAZAR DETECT).

Resultados em estudos que comparam a PCR com o ELISA Teste com multiepítotos proteicos apresentaram concordância entre 80 e 100%, porém a sorologia apresenta vantagens no diagnóstico precoce da leishmaniose, além de ser de fácil execução e de custo acessível (FARIA et al., 2017). MEKUZAS et al. (2009), observaram alta positividade pela PCR quando comparada a sorologia em animais naturalmente expostos a *L. infantum*, e atribuiu a demorada, ou até mesmo ausência de soroconversão de alguns animais infectados. Entretanto, no Brasil, testes sorológicos são decisivos na determinação no diagnóstico de animais infectados (ARRUDA et al., 2016) e são empregados em inquéritos amostrais ou censitários em municípios com transmissão canina e/ou receptivos, ou seja onde já foi detectada a presença do flebotomíneo (COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS, SECRETARIA DA SAÚDE DO GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2006). A PCR com amostras de sangue total, medula óssea e linfonodos mostrou ser uma importante técnica de diagnóstico na rotina do atendimento da clínica veterinária. Entretanto, a coleta das amostras para o diagnóstico em larga escala, como nos casos de levantamento epidemiológico, deve ser facilitada, pois tem que ser rápida, simples e indolor, e técnicas não invasivas estão sendo cada vez mais procuradas. Mais estudos são necessários visando estabelecer a sensibilidade e especificidade da PCR em amostras colhidas pelos swab, técnica que apresenta vantagens principalmente quando realizada em áreas endêmicas onde frequentemente são necessários a realização de testes num grande número de animais para levantamento epidemiológico da infecção.

3 | OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar avaliação molecular qualitativa para *Leishmania* sp. em cães utilizando amostras de linfonodos e mucosas.

3.2 Objetivos específicos

Utilizar a técnica de PCR para a detecção de *Leishmania* sp. em cães, e se possível comparar os resultados obtidos com resultados de testes rápidos.

- Coletar material de cães em inquérito sorológico
- Fazer a extração de DNA
- Identificar amostras positivas para *Leishmania* sp. utilizando a técnica de PCR

4 | DELINEAMENTO DO ESTUDO

Neste trabalho foi realizado um estudo experimental utilizando amostras de material coletado em linfonodos e mucosas de cães para triagem de Leishmaniose. Foram realizadas as extrações de DNA das amostras obtidas seguido de análise simples de PCR para detecção do patógeno *Leishmania sp.*

5 | MÉTODOS

5.1 Coleta de material

O material foi coletado com a supervisão da prof. Dra. Andrea Cristina Higa Nakaghi nos Inquéritos Sorológicos nas cidades de Salto de Pirapora e Sorocaba. Para a coleta de mucosa, foi utilizado SWAB estéril que, após friccionado na mucosa ocular, foi acondicionado em Eppendorfs individuais com 600 microlitros de solução de NaCl 50mM. Para a coleta dos linfonodos reativos, foi feito o aspirado do mesmo e acondicionado em tubos tipo *Eppendorfs* com solução de EDTA.

5.2 Extração de DNA

A seguir para a extração do DNA genômico a partir de células de mucosa oral, o material contido em cada tubo tipo *epppendorf* foi submetido a agitação em alta rotação no vórtex por 10 segundos. Em seguida o material foi incubado a 95°C por 5 minutos, a swab foi retirada com auxílio de uma pinça e submetido novamente a uma agitação em alta rotação no vórtex por 10 segundos. Nesta solução foram adicionados 60 µl de Tris HCl pH 8,0 na concentração de 1M para que pudesse ocorrer a neutralização. A seguir uma nova agitação em alta rotação no vórtex por 10 segundos foi realizada e o DNA foi conservado a -20°C.

Já para a extração de DNA genômico a partir de células de aspirado de linfodo, submeteu-se cada tubo de *eppendorf* ao *kit Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit*, utilizando o protocolo fornecido pelo fabricante, sendo as amostras armazenadas a -20°C.

5.3 Realização da análise por PCR

Para a detecção baseada em PCR, três conjuntos de pares de iniciadores foram utilizados (Tabela 1). Os primers foram projetados por Srivastava et al.(2011) alinhando as sequências de DNA de minicírculo de kinetoplasto de duas Leishmanias, as espécies: *L. donovani* e *L. infantum* (acessos GenBank: AF169137.1, AF103739.1, AF190476.1, Y11401.1, X84844.1, e Z35273.1).

PCR TARGET	PRIMER	SEQUÊNCIA 5'-3'	Tam. pb	Temp °C
a Minicircles of kinetoplastic DNA of Leishmania	MK1F	CCC AAA CTT TTC TGG TCC TC	102	45
	MK1R	GAG CCG ATT TTT GGC ATT T		
b Minicircles of kinetoplastic DNA of Leishmania	LD1F	AAA TCG GCT CCG AGG CGG GAA AC	600	45
	LD1R	GGT ACA CTC TAT CAG TAG CAC		
c Nuclear rRNA gene of Leishmania	BHUL18SF	CGT AAC GCC TTT TCA ACT CAC	311	62
	BHUL 18SR	GCC GAA TAG AAA AGA TAC GTA AG		

a Khatun et al., 2017; b Maurya et al., 2005; c Srivastava et al., 2011.

Tabela 1: Primers utilizados para a detecção

Para as PCR utilizou-se mix com as seguintes concentrações: tampão de PCR 1X, MgCl 1,5 uM, 10 uM de cada um Primer, 2,5U de taq polimerase, 0,25mM de dNTP e em torno de 100 ng de DNA em volume final de de 25 uL. As temperaturas do ciclo utilizado foram: aquecimento a 95 ° C durante 7 min seguido por 40 ciclos, cada um consistindo de 45 s a 95°C, 45 s a 62°C e 1 min a 72°C e um passo de extensão final de 6 min a 72 ° C. Os produtos foram analisados por eletroforese utilizando gel de agarose 1,5% (p/v) e ao final do procedimento os géis foram fotografados em equipamento específico.

6 | RESULTADOS

6.1 Extração de DNA

Após a extração de DNA realizou-se uma corrida do material em gel para verificar a qualidade de extração. Em geral a extração realizada de material de mucosa não apresenta excelente qualidade, o que faz necessário ajustes de quantidade de material a ser utilizado na PCR. Os resultados desta análise de qualidade (Tabela 2) mostrou que seriam necessários ajustes de nas quantidades de material para análise de PCR. O material para análise da PCR foi ajustado para 10uL.

Qualidade da Amostra	Número das amostras	Total
Ruim	5; 6; 9; 10; 11; 16; 28; 29; 30; 31; 32; 33; 34; 35; 36; 37; 38; 39; 40; 41; 42; 43; 44; 45; 46; 47; 48; 299; 300; 301; 302; 303; 304; 305; 306; 307; 308; 309; 310; 311; 312; 313; 315; 316; 317; 318; 319; 320.	
Boa	1; 2; 3; 4; 7; 8; 12; 13; 14; 15; 17; 18; 19; 20; 21; 22; 23; 24; 25; 26; 27.	

Tabela 2: Comparação entre qualidade da banda e visualização de amostras.

6.2 Análise por PCR

A análises prévias de PCR foram realizadas para se avaliar o melhor primer a ser utilizado nas futuras análises. Dos diferentes primers propostos BHUL, MK1 e LD1, o que apresentou melhor resultado foi o BHUL com banda de 311pb (Figura 1). Este primer tem como alvo o gene nuclear rRNA da Leishmania (Srivastava et al, 2011). Como controle foi utilizado um material positivo doado pela Universidade Júlio de Mesquita filho UNESP/ Jaboticabal e o material coletado de um animal, onde foi comprovado a contaminação.



Figura 1: Análise de avaliação de primers utilizados para análise de PCR vistos em gel de agarose 1,5%. Uma amostra controle positivo foi utilizada com diferentes primers para escolha do melhor primer a ser utilizado.

Após a identificação do melhor primer a ser utilizado no estudo, foi realizada a PCR das 109 amostras, 100 amostras de DNA de mucosa e 9 amostras de linfonodos além dos controles positivos.

Para a visualização do produto da PCR, 5 μ l de cada produto foi colocado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídeo e sendo submetido à eletroforese em seguida (Figura 2).



Figura 2: Exemplo de visualização de produtos da PCR em gel de Agarose 1,5%. O ladder é utilizado para indicar o tamanho do fragmento amplificado. Controle é o material positivo contendo *Leishmania*. Amostra 36, 38 e 40 exemplos de amostras negativas e amostras 316, 296 e 294, amostras positivas.

Dentre as 109 amostras, 22 apresentaram banda de 311bp, correspondente ao fragmento característica do gene procurado, sendo que todas as amostras de DNA de aspirado de linfonodo foram negativas (Figura 3).

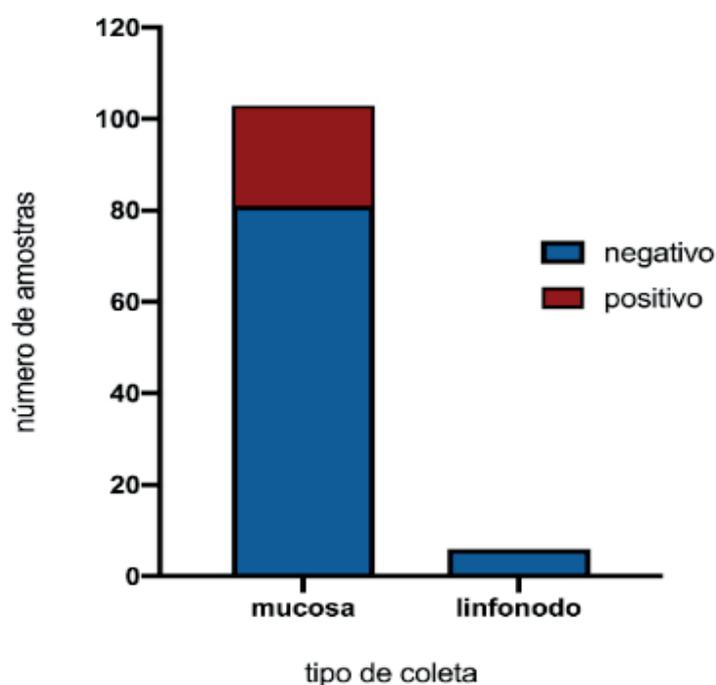


Figura 3: Resultados das análises de PCR de acordo com o tipo de amostra

Os resultados positivos da PCR do DNA foram organizados no Quadro 1. Não foram encontrados resultados positivos nas amostras coletadas de linfonodo. As amostras de mucosa de animais que possuíam também amostras de coleta de linfonodos foram todas com resultados negativos, concordando com os resultados obtidos nos linfonodos.

AMOSTRAS QUE APRESENTARAM BANDA
295, 296, 297, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317

Quadro 1: Amostras que forma positivas

7 | DISCUSSÃO

Considerada uma das principais zoonoses potencialmente fatais presente nas Américas (BANETH, et al., 2008), a Leishmaniose Visceral necessita de um diagnóstico preciso. Técnicas de diagnósticos moleculares vêm sido empregadas como uma ferramenta importante neste processo devido sua alta sensibilidade e especificidade além da possibilidade de uso de diversos tipos de amostras como aspirado de medula óssea, linfonodo, urina, sangue, swabs conjuntivais, nasais, orais e biópsias de pele (FERREIRA, et al. 2012). Visto isso, uma coleta de amostra não invasiva, simples e indolor é fundamental para o melhor aceitação do exame por parte do tutor e também para pesquisas em larga escala (LEITE, et al. 2010). No presente estudo foi utilizado amostras de células epiteliais da conjuntiva coletadas com swab que, em estudos anteriores, se mostraram viáveis para a detecção de DNA da *Leishmania*, com alta sensibilidade para o diagnóstico em cães sintomáticos (PILATTI et al., 2009; STRAUSS-AYALI, et al. 2004) ou assintomáticos (ALMEIDA FERREIRA et al., 2012; LEITE, et al. 2010).

A *Leishmania* alcança a região ocular através de disseminação hematogênica (REITHINGER R., et al. 2002) em sua forma amastigota que, infectando macrófagos, consegue permanecer no tecido epitelial da conjuntiva (STRAUSS-AYALI, et al. 2004; FERREIRA, et al. 2012). Apesar de, durante a infecção por *Leishmania*, a densidade do parasita ser variável entre os diferentes tecidos (REIS, A.B. et al. 2005) e a densidade parasitária no tecido das pálpebras internas ser baixa, o diagnóstico molecular qualitativo utilizando swabs conjuntivais mostrou o melhor resultados com maior quantidade de positivos em comparação com outras amostras de mucosas (FERREIRA, et al. 2012).

A frequência elevada da presença de sinais clínicos em animais infectados permite a conclusão de que a doença se desenvolve gradualmente de um quadro assintomático para um intermediário podendo evoluir para um severo e terminal OLIVEIRA, et al. 1993). Por se tratar de uma enfermidade de curso crônico com um longo período de incubação, o diagnóstico clínico pode atrasar ou apresentar erro (CARDOSO e CABRAL, 1998) e assim, a alta sensibilidade demonstrada pela PCR de swab conjuntival em cães assintomáticos é uma ferramenta essencial e promissora em pesquisas de larga escala, tendo em vista a prevalência de animais assintomáticos em áreas endêmicas (LEONTIDES, et al. 2002; LEITE, et al. 2010). A PCR do swab conjuntival também proporciona um diagnóstico positivo antes da soroconversão, favorecendo um diagnóstico precoce para o controle da zoonose, evitando aumentar o risco de exposição para a população humana próxima (STRAUSS-AYALI,

et al. 2014). Também de acordo com o experimento de Ferreira et al. (2012), a frequência de positivos ao analisar amostras de swabs conjuntivais não pareceram ter relação com o estado clínico de animal, transformando a PCR em um método útil para identificar infecções subclínicas.

Apesar do diagnóstico potencial através de amostras conjuntivais, PCR de aspirados de linfonodos mostraram a maior taxa de positividade (ALMEIDA, et al. 2013; RAMOS, et al. 2013). Isso pode ocorrer já que *L. infantum* tem tropismo por tecido linfóide (ASCHAR, et al. 2016) e também por amostras de swab conjuntivais poderem variar na quantidade de material biológico coletado (CECCARELLI, et al. 2014). De acordo com Aschar et al (2016), a positividade encontrada em diagnósticos moleculares qualitativos está intimamente relacionado com a carga parasitária existente, sendo a de linfonodos maior que a de conjuntivas.

A utilização do diagnóstico por meio da PCR em combinação com outros métodos diagnósticos poderia ajudar a determinar a extensão de infecções subclínicas assim como fornecer um número mais preciso de animais assintomáticos (QUARESMA, et al. 2009). É recomendado a associação da PCR com testes sorológicos como o kit ELISA para uma detecção mais eficiente da Leishmaniose Visceral Canina, principalmente pela sorologia apresentar maiores limitações como falsos positivos devido reações cruzadas ou falso negativos por baixa titulação de anticorpos causada por imunossupressão (FERREIRA, et al. 2012).

O presente estudo revelou que o diagnóstico para Leishmaniose Visceral é possível a partir de amostras de aspirado de linfonodo e swabs conjuntivais. Entretanto, é necessário lembrar que apesar de nenhum resultado positivo neste trabalho, a *Leishmania* tem tropismo por tecido linfóide e pode ser a melhor opção de amostra para o diagnóstico. Em contrapartida, a coleta de amostra conjuntival por meio de swab é considerada mais aplicável em pesquisas de campo em larga escala por ter uma coleta fácil e rápida, apesar de poder conter diferentes quantidades de material biológico para análises assim como menor densidade parasitária. A PCR como método diagnóstico pode ser associada a outros tipos de testes e também se mostra importante para o diagnóstico precoce, que possui extrema importância para o controle da doença.

8 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista os objetivos deste trabalho concluímos que é possível realizar a coleta e extração de mucosa canina, assim como de linfonodos, embora este seja um método invasivo. A identificação de *Leishmania sp* foi possível através da técnica de PCR, isto abre possibilidade de diagnóstico simples e rápido. Logo a utilização da biologia molecular deve ser melhor investigada para que sua utilização seja viabilizada.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES T.R. et al. **Environmental factors associated with canine visceral leishmaniasis in an area with recent introduction of the disease in the State of Rio de Janeiro, Brazil.** CadSaude Publica. 5;34(1):e00021117, Feb. 2018
- ALMEIDA FERREIRA, A. de et al. **Canine visceral leishmaniasis: seroprevalence and risk factors in Cuiabá, Mato Grosso, Brazil.** Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 21, n. 4, p. 359-365, Dec. 2012
- ALMEIDA, A.B.P.F. et al. **Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples.** Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 76; 321-324, 2013
- ARRUDA M.M. et al. **Sensitivity and specificity of parallel or serial serological testing for detection of canine Leishmania infection.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 111(3): 168-173, Mar. 2016
- ASCHAR M. et al. **Value of the oral swab for the molecular diagnosis of dogs in different stages of infection with Leishmania infantum.** Veterinary Parasitology, v.225, p.108-113, 30 July 2016
- AWASTHI A; MATHUR R.K; SAHA B. **Immune response to Leishmania infection.** Indian J Med Res. 119(6):238-58, Jun. 2004
- BANETH G. et al. **Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one.** Trends Parasitol. 24(7):324-30, Jul. 2008
- CARDOSO, L.; CABRAL, M. **Leishmania and canine Leishmaniasis.** Rev. Port. C. Vet. XCIII (527), 122-141,1998
- CECCARELLI, M. et al. **Application of qPCR in conjunctival swab samples for the evaluation of canine leishmaniasis in borderline cases or disease relapse and correlation with clinical parameters.** Parasit Vectors. 7: 460. 2014
- CRUZ I. et al. **Leishmania/HIV co-infections in the second decade.** Indian J Med Res. 123(3):357-88. Mar. 2006
- FARIA, Angélica Rosa; ANDRADE, Hélida Monteiro de. **Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática.** Rev Pan-Amaz Saúde, Ananindeua, v. 3, n. 2, p. 47-57, Jun. 2012
- FARIA, M.T. et al. **Autochthonous case of Canine Visceral Leishmaniasis in a non-endemic area in Minas Gerais, Brazil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, V. 37, N.12, Dez. 2017.
- FERREIRA S.A et al. **Canine Skin and Conjunctival Swab Samples for the Detection and Quantification of Leishmanis infantum DNA in an Endemic Urban Area in Brazil.** PLoS Neglected Tropical Diseases, 6(4): e1596, 2012
- FERREIRA, S. A. et al. **Nasal, Oral and Ear Swabs for Canine Visceral Leishmaniasis Diagnosis: New Practical Approaches for Detection of Leishmania infantum DNA.** PLOS Neglected Tropical Diseases, V. 7, issue 4, e2150, 2013.
- FRANCINO O. et al. **Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis.** Vet Parasitol. 30;137(3-4):214-21. Apr. 2006
- GUIMARÃES E SILVA, Antônia Suely et al. **Leishmania Infection and Blood Food Sources of Phlebotomines in an Area of Brazil Endemic for Visceral and Tegumentary Leishmaniasis.** Ed. BhaskarSaha. PLoS ONE 12.8, e0179052. 2017

- KASZAK, I.; PLANELLAS, M.; DWORECKA-KASZAK, B. **Canine leishmaniosis – an emerging disease.** *Annals of Parasitology*, 61(2), 69–76, 2015.
- KHATUN M. et al. **Novel PCR primers to diagnose visceral leishmaniasis using peripheral blood, spleen or bone marrow aspirates.** *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* Volume 10, Issue 8, Pages 753-759, Aug. 2017
- KUHLS, K. et al. **Comparative microsatellite of new world *Leishmania infantum* reveals low heterogeneity among populations and recent old world origin.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v.5, n.6, e.1155, 2011.
- LEITE, R.S. et al. **PCR diagnosis of visceral leishmaniasis in asymptomatic dogs using conjunctival swab samples.** *Veterinary Pathology*. 170, 201-206, 2010
- LEONTIDES, L.S. et al. **A cross-sectional study of leishmania spp infection in clinically healthy dogs with polymerase chain reaction and serology in Greece.** *Veterinary Pathology*, 109, 19-27, 2002
- MAURYA, R. et al. **Evaluation of PCR for diagnosis of Indian Kala-Azar and assessment of cure.** *J. Clin. Microbiol.* 43(7): 3038-3041. Jul, 2005
- MEKUZAS, Y. et al. **Ehrlichia canis and Leishmania infantum co-infection: a 3-year longitudinal study in naturally exposed dogs.** *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 15 Suppl 2, p. 30–1, 2009.
- MONDAL S; BHATTACHARYA P; ALI N. **Current diagnosis and treatment of visceral leishmaniasis.** *Expert Rev Anti Infect Ther.* 8(8):919-44, Aug. 2010.
- OLIVEIRA G.G.S et al. **The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs.** *Mem. Int. Oswaldo Cruz.* 88(2), 243 – 248, 1993
- OLIVEIRA V.V.G; ALVES L.C; JUNIOR V.A.S. **Transmission routes of visceral leishmaniasis in mammals.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v.45, n.9, p.1622-1628, Set. 2015
- OLIVEIRA, T. M. F. S. et al. **A study of cross-reactivity in serum samples from dogs positive for Leishmania sp., Babesiacanis and Ehrlichiacanis in enzyme-linked immunosorbent assay and indirect fluorescent antibody test.** *Revista Brasileira Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 7-11, 2008.
- ORYAN A; AKBARI M. **Worldwideriskfactors in leishmaniasis.** *Asian Pac J Trop Med.* 9(10):925-932. Oct. 2016
- PILATTI M.M. et al. **Comparison of PCR methods for diagnosis of canine visceral leishmaniasis in conjunctival swab samples.** *Res VetSci;* V.87 N.2, p.255-257. 2009
- QUARESMA, P.F. et al. **Molecular diagnosis of canine visceral leishmaniasis: identification os Leishmania species by PCR-RFLP and quantification of parasite DNA by real-time PCR.** *Acta Tropica*, 111;289-294, 2009
- QUEIROZ N.M.G.P. et al. **Canine Visceral Leishmaniasis diagnosis by immunohistochemistry and PCR in skin tissues in association with RIFI and ELISA-test.** *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal*, v. 19, n. 1, p. 32-38, 2010
- QUINNELL R.J; COURTENAY O. **Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis.** *Parasitology.* 136(14):1915-34. 2009
- REIS, A. B.; et al. **Parasite density and impaires biochemical/hematological statur are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis.** *Research in Veterinary Science* 81 (2006) 68–75,

REITHINGER R., et al. **Leishmania (Viannia) spp. dissemination and tissue tropism in naturally infected dogs (Canis familiaris)**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 96: 76–78, 2002

SINGH O.P; SUNDAR S. **Developments in Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in the Elimination Era**. J Parasitol Res. 2015: 239469. 2015

SOLANO-GALLEGO L, et al. **Diagnostic Challenges in the Era of Canine *Leishmania infantum* Vaccines**. Trends Parasitol. 33(9):706-717. Sep. 2017

SRIVASTAVA P. et al. **Diagnosis of visceral leishmaniasis**. Trans R SocTropMedHyg. 105:1-6. 2011.

STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, CL.; BURSHTAIN, O.; GONEN L.; BANETH G. **Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs**. Journal of Infectious Diseases 189: 1729–1733, 2004

TRAVI B.L. et al. **Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us**. PLOS Neglected Tropical Diseases, V.12 p 1-13, 2018

ÍNDICE REMISSIVO

A

Ácido húmico 50, 51, 53, 55, 56, 57, 58, 61, 62
Adjuvante 43, 44, 45, 46, 48
Agricultura familiar 25, 34, 128
Antioxidante 1, 2, 3, 4, 5, 78
Atumus 43, 44, 45, 46, 48
Aves silvestres 108, 109, 110, 113, 114, 115

B

Balanço hídrico 28, 30
Brássicas 34

C

Cabergolina 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123
Cães 94, 95, 96, 97, 98, 99, 103, 116, 117, 118, 124
Cama de Frango 17, 18, 20, 21, 22, 23, 25, 26
Cana-de-açúcar 28, 29
Canino 116
Cio 116, 120, 121
Citologia vaginal 116, 119, 120
Cocção 1
Colheita de Madeira 86, 93
Componentes de Produção 7, 8, 18, 20, 49, 52, 60
Compostos fenólicos 1, 2, 3, 4, 33, 78
Coproparasitológica 108
Corte florestal 86
Crescimento 4, 25, 31, 50, 51, 52, 57, 62, 64, 69, 73, 74, 79, 80, 128
Cultivo orgânico 17, 27

D

Derrubada de Árvores 85, 87, 88
Diagnóstico molecular 94, 103

E

Écotoño cerrado 7
Esterco bovino 17, 18, 19, 20, 21, 24, 25, 26
Estresse salino 64, 65, 67, 69, 71, 72, 74

Estudo de Tempos 85, 86, 87
Evapotranspiração 28, 29, 30, 31, 32
Exame coproparasitológico 108

F

Feijão-caupi 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 63, 64, 65, 69, 70, 71, 72, 73, 74

H

Harvester 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93
Herbicida 10, 43, 44, 45, 46, 48, 128

I

Irrigação 20, 28, 29, 30, 32, 63, 64, 65, 66, 70, 71, 72, 73, 74, 139

L

Laranjinha-do-Cerrado 33, 34
Leishmania sp. 94, 95, 98, 99, 106
Linhagens 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9, 10, 14, 15, 63, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72
Lisímetro 28, 29, 30

M

Manejo 12, 16, 19, 29, 43, 44, 49, 51, 52, 62, 65, 73, 116, 117, 118, 119, 121, 122, 123, 124, 136, 138, 139
Manejo nutricional 19, 49
Matéria orgânica 18, 19, 24, 26, 27, 50, 51, 52, 53, 55, 60
Melhoramento genético 5, 8, 15
Mudas nativas 75

O

Olericultura 18, 26, 34

P

Paisagismo 75, 76, 77, 84, 139
Parasitas 97, 108, 109, 112, 113, 114, 128, 136
PCR 94, 95, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106
Pimentão 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27
Pinus taeda 85, 86, 87, 93
Plantas ornamentais 75, 76, 84, 139
Produção orgânica 18

Produtividade 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 29, 41, 50, 51, 54, 55, 58, 59, 61, 62, 73, 85, 86, 87, 88, 89, 91, 92, 93, 128, 137

Propagação 75, 77, 78, 127, 139

R

Restinga 75, 76, 77, 78, 83, 84

S

Salinidade da Água 63, 65, 72, 73

Shih tzu 116, 117, 118, 119, 123

Styrax camporum 33, 34, 35, 39, 41, 42

T

Trigo 48, 49, 50, 52, 53, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62

Turnera subulata 75, 76, 77, 78, 82, 83, 84

V

Vigna unguiculata 1, 2, 5, 6, 9, 15, 16, 64

 **Atena**
Editora

2 0 2 0