



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE EDUCACIONAL VIÇOSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
INTEGRADAS A MEDICINA VETERINÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO
REGIONAL

LARISSA OTAVIANO DA ROCHA

Infecção por *Burkholderia mallei* em Equídeos e cobaios (*Cavia porcellus*): avaliação da resposta humoral e estudo clínico

**Viçosa – AL
2018**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE EDUCACIONAL VIÇOSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
INTEGRADAS A MEDICINA VETERINÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO
REGIONAL

LARISSA OTAVIANO DA ROCHA

Infecção por *Burkholderia mallei* em Equídeos e cobaios (*Cavia porcellus*): avaliação da resposta humoral e estudo clínico

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa em Inovação e Tecnologia Integradas a Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Orientadora: Prof. Dra. Karla Patrícia Chaves da Silva

**Viçosa – AL
2018**

Folha de Aprovação

AUTORA: LARISSA OTAVIANO DA ROCHA

Infecção por *Burkholderia mallei* em Equídeos e cobaios (*Cavia porcellus*): avaliação da resposta humoral e estudo clínico

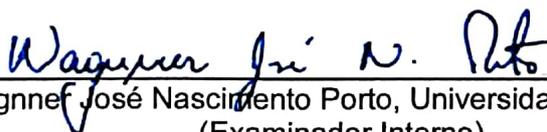
Dissertação submetida ao Programa em Inovação e Tecnologia Integradas a Medicina Veterinária da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Data de Defesa: 27/09/2018



Prof.^a Dra. Karla Patrícia Chaves da Silva, Universidade Federal de Alagoas
(Orientadora)

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Wagner José Nascimento Porto, Universidade Federal de Alagoas
(Examinador Interno)



Prof. Dr. Thiago Augusto Pereira de Moraes
(Examinador Externo)

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pelo seu amor e por permitir a realização dos meus sonhos. Agradeço também Senhor pela força que me destes nos últimos momentos, não foi fácil chegar até o fim. Obrigada por estar ao meu lado durante todo o processo, desde a entrada na pós-graduação até o momento da finalização, pois muitas vezes pensei que estava sozinha e tinha medo do que me esperava, mas o senhor sempre me fortaleceu e não me fez desistir.

A minha mãe, Eliene Otaviano da Rocha, pelo incentivo de todas as formas, meu exemplo de mulher guerreira e batalhadora, que luta pelos seus até o fim. Muito obrigada por mostrar que nunca é tarde, e que quando queremos algo não há nada e nem ninguém que possa impedir.

Ao meu pai, Paulo Roberto Ferreira da Rocha, por nunca ter se negado quando eu mais precisei. Muitos não entendem a sua forma de agir, mas o seu modo de proteger e demonstrar seu amor é único e poucos podem desfrutar de todo esse carinho. Obrigada pela companhia nas coletas e idas a Viçosa, desde a graduação nunca se negou a estar presente.

Ao meu avô, Pedro Otaviano Filho (in memoriam), que não acompanhou minha trajetória durante a pós-graduação, mas sempre senti sua presença, desde a realização das provas. Ele que esteve presente durante a minha graduação, e sempre me esperava chegar todo final de semana, minha maior saudade.

Ao meu noivo, Flávio Anderson Pedrosa de Melo, meu exemplo na vida acadêmica. Tenho uma admiração imensa por você, meu companheiro e amigo, que está ao meu lado em todos os momentos, mesmo os que a presença física não é possível.

Aos meus irmãos, Antonio Rocha, Pedro Henrique e Marcela Rocha, cada um em particular sempre vibrou e me incentivou, mesmo que indiretamente. E ao Pedro e Marcela, muito obrigada pelo presente maravilhoso, meus dois sobrinhos, Ian e Guilherme, a nossa alegria, a demonstração mais perfeita do amor de Deus, que fez nossa família se renovar.

À minha orientadora, professora Karla Patrícia por todos os conselhos dados e pela oportunidade de realização desse trabalho. E a todos os meus professores da pós-graduação, pela contribuição na minha vida acadêmica e por tanta influência na minha vida profissional.

Aos meus colegas de pós-graduação, que apesar dos momentos de dificuldade durante todo o curso, principalmente por sermos a primeira turma, me mostraram o valor da amizade e provaram que juntos somos mais fortes, mesmo não estando no convívio diário.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para que fosse possível a realização deste trabalho.

RESUMO

O mormo é uma enfermidade infectocontagiosa e frequentemente letal, aguda ou crônica, caracterizada por lesões respiratórias, linfáticas e cutâneas em equídeos, porém de caráter zoonótico. O diagnóstico do mormo consiste na associação dos aspectos clínico-epidemiológicos, anatomohistopatológicos, isolamento bacteriano, inoculação em animais de laboratório, reação imunoalérgica e testes sorológicos como FC, ELISA e WB. Estudos inerentes ao acompanhamento de focos naturais do mormo auxiliam a elucidar lacunas referentes à patologia e diagnóstico da doença e atualmente existem algumas lacunas referentes ao padrão de resposta imunológica dos equídeos em diferentes fases de infecção durante o quadro natural de desenvolvimento da doença. Com isso, objetivou-se estudar os aspectos de diagnóstico clínico, imunológico, anatomopatológico e microbiológico em equídeos naturalmente infectados por *Burkholderia mallei*, em dois focos para o mormo de acordo com a ADEAL e MAPA, no estado de Alagoas.

Palavras-Chave: mormo. *b. mallei*. equino. diagnóstico

ABSTRACT

Glanders is an infectious and frequently lethal disease, acute or chronic, characterized by respiratory, lymphatic and cutaneous lesions in equidae, but of a zoonotic nature. The mormo diagnosis consists of the association of clinical and epidemiological aspects, anatomohistopathological, bacterial isolation, inoculation in laboratory animals, immunoallergic reaction and serological tests such as FC, ELISA and WB. Studies in the monitoring of natural foci of glanders help to elucidate gaps regarding the pathology and diagnosis of the disease and there are currently some gaps regarding the pattern of immunological response of the equines in different phases of infection during the natural development of the disease. The aim of this study was to study the clinical, immunological, anatomopathological and microbiological aspects of equidae naturally infected with *Burkholderia mallei* in two outbreaks for glanders according to ADEAL and MAPA, in the state of Alagoas.

Keywords: glanders. *b. mallei*. equine. diagnosis.

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

- Figura 1** Coleta de secreção nasal
- Figura 2** Animal positivo nos testes oficiais sem sintomatologia
- Figura 3** Equino, positivo, assintomático. Foco A (FA)
- Figura 4** Presença de lesões ulceradas e linfangite disseminada em membro posterior esquerdo, expectoração de secreção nasal serosanguinolenta bilateral (hemoptise), dispneia severa. Foco B (FB).
- Figura 5** Animal com apatia, dispnéia estertorosa, nódulos linfáticos infartados (aumentados), expectoração nasal mucopurulenta bilateral. Foco B (FBa02)
- Figura 6** Seta evidenciando presença de piogranuloma em pulmão
- Figura 7** Necropsia animal FBa03, presença de piogranuloma no pulmão
- Figura 8** Análise Macroscópica da Bactéria *B. mallei*. Presença de colônia puntiforme, translúcida, não hemolítica, sem pigmentação.
- Figura 9** Prova de Strauss positiva: Orquite
- Figura 10** Necropsia dos cobaios, presença de congestão no pulmão
- Gráfico 1** Resposta imunológica dos animais positivos no ELISAI A1 (ponto de corte: 35pp)
- Gráfico 2** Resposta imunológica dos animais positivos no ELISAI A2 (ponto de corte: 15pp)
- Gráfico 3** Resposta imunológica dos animais negativos no ELISAI A1 (ponto de corte: 35pp).
- Gráfico 4** Resposta imunológica dos animais negativos no ELISAI A2 (ponto de corte: 15pp).

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

A1	Antígeno 1
A2	Antígeno 2
<i>B. mallei</i>	<i>Burkholderia mallei</i>
°C	Grau Celsius
CONCEA	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ELISAI	Ensaio de imunoabsorção enzimática Indireto
FC	Fixação de Complemento
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ML	Mililitros
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PP	Partes de positividade
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco
WAHID	World Animal Health Information Database
WB	Western Blotting
HAI	Hemaglutinação indireta
CIEF	Contraímunoeletroforese
IB	<i>Immunoblotting</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1. EQUINOCULTURA	13
2.2. MORMO	13
2.3. ETIOLOGIA	14
2.4. EPIDEMIOLOGIA	15
2.5. PATOLOGIA	17
2.6. SINTOMATOLOGIA	19
2.7. DIAGNÓSTICO	21
2.7.1.1 Prova de Strauss	22
2.7.2 Diagnóstico Molecular	22
2.7.3 Diagnóstico Sorológico	23
2.8. TRATAMENTO	26
2.9. PREVENÇÃO E CONTROLE	27
2.10. IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA E BIOSSEGURANÇA	28
2.11. OBJETIVOS	29
2.11.1 Objetivo geral	29
2.11.2 Objetivos específicos	29
REFERÊNCIAS	30
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	36
3.7. Artigo 1	36
3.7.1 Introdução	37
3.7.2 Material e Métodos	38
3.7.3 Resultados	41
3.7.4 Discussão	46
3.7.5 Conclusão	47
Referências Bibliográficas	47
3.8. Artigo 2	49
INTRODUÇÃO	51
RESULTADOS	52
DISCUSSÃO	52
CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	53
4. CONCLUSÃO	57
5. COMITÊ DE ÉTICA	58

1. INTRODUÇÃO

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2016), o Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e está entre os maiores rebanhos do (FAO, 2014). A equideocultura possui grande importância econômica e social no Brasil e algumas doenças causam prejuízos consideráveis aos proprietários, principalmente, aquelas onde é obrigatória a eutanásia dos animais positivos, como o mormo (Said et al., 2016).

O mormo é talvez a mais grave ameaça à equideocultura brasileira. A sua notificação submete o Brasil a uma série de restrições referentes à exportação de animais vivos ou de carne. No Brasil, o mormo pertence à lista de doenças passivas das ações de defesa sanitária, de sacrifício obrigatório, sem indenização e faz parte do Plano Nacional de Sanidade de Equídeos (PNSE) do MAPA (MOTA, 2006; VARGAS et al., 2015; MOTA e RIBEIRO, 2016).

A doença é altamente contagiosa em solípedes, causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, um bacilo gram-negativo, não móvel, intracelular facultativo e aeróbico (NEUBAUER et al., 2005; ROWLAND et al., 2010). A *B. mallei* é considerada uma arma biológica, que já foi utilizada em tempos de guerra durante o século XX, devido a seu potencial de disseminação e habilidade de causar morbidade e mortalidade em humanos (NAUREEN et al., 2010).

Em equinos, a doença normalmente tem curso crônico, mas em asininos e muares geralmente causa morte em 4 a 7 dias. Lesões típicas são: granulomas e úlceras no trato respiratório ou na pele, com linfangite e linfadenite. A bactéria é excretada com o pus e descargas dos abscessos da pele e aparelho respiratório. A transmissão ocorre principalmente através de água e comida contaminadas e é favorecida por condições de superpopulação. Apesar do hospedeiro específico, *B. mallei* não possui reservatório. Mesmo sendo uma doença primariamente de solípedes, a maioria dos mamíferos possui certo grau de suscetibilidade, e a infecção foi reportada em cabras, ovelhas, camelídeos, gatos, cães e vários animais de zoológico carnívoros alimentados com carne de cavalos com mormo (SCHOLZ et al., 2006).

De acordo com o Terrestrial Manual (OIE, 2015), a confirmação do diagnóstico de mormo deve ser baseada no isolamento e identificação da *B.*

mallei em uma amostra do equídeo em questão, ou a identificação de um antígeno ou material genético específico na amostra. Evidências de apoio podem ser conseguidas através de testes sorológicos positivos, como título de 1/5 no teste de FC, confirmado por um segundo teste com sensibilidade e especificidade igual ou superior ao primeiro, como Western Blot (WB) para lipopolissacarídeo específico de *B. mallei*, ELISA indireto baseado em uma proteína recombinante, ou ainda ELISA competitivo, baseado em anticorpos monoclonais específicos para a bactéria. Apesar de esses testes ainda não terem passado por validação formal, o seu amplo uso mundialmente sem resultados duvidosos os tornam aceitáveis.

Até agora, o desenvolvimento de vacinas não obteve sucesso e pouco se sabe sobre tratamento antibiótico adequado (SCHOLZ et al., 2006). Em todo o Brasil, a Instrução Normativa nº 06/2018, de 16 de janeiro de 2018, regulamenta a prevenção, controle e erradicação do mormo, através da análise das condições epidemiológicas e da evolução dos meios de diagnóstico, para o controle e erradicação do mormo (MAPA, 2018). A Portaria nº35 de 17 de abril de 2018 define que os testes laboratoriais de triagem a serem empregados para o diagnóstico do mormo são o Fixação de Complemento (FC) ou ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay ou ensaio de imunoabsorção enzimática). O ELISA poderá ser empregado como teste de triagem nos laboratórios oficiais. E os demais laboratórios, públicos ou privados, poderão utilizar o teste ELISA como teste de triagem após credenciamento específico emitido pelo Mapa (MAPA, 2018).

Os dados da OIE (2014) são alarmantes, quanto à emergência da doença no Brasil. E mesmo com todas as medidas de diagnóstico sendo adotadas, existe a necessidade de melhorar a eficácia das técnicas, para dar maior fidelidade aos resultados e aplicação das medidas preventivas, e estudos inerentes ao acompanhamento de focos naturais do mormo auxiliam a elucidar lacunas referentes à patologia e diagnóstico da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. EQUINOCULTURA

A população mundial de equídeos esta estável nas últimas décadas e é estimada atualmente em 113.473.522 cabeças, sendo 58.770.171 equinos, 43.496.677 asininos e 11.206.674 muares. E o Brasil possui o quarto maior rebanho equino do mundo e o maior da América Latina (ALMEIDA E SILVA, 2010; FAO, 2014).

No Brasil, a densidade é de 0,65 equinos por quilômetro quadrado (OIE, 2016). A estimativa é de que, do total do rebanho equino brasileiro, aproximadamente 1.100.000 cabeças sejam animais para esporte, lazer e criação, enquanto que em torno de 3.900.000 cabeças sejam de cavalos para trabalho (LIMA e CINTRA, 2016).

De acordo com a Pesquisa Pecuária Municipal (PPM, 2015), Alagoas possui um efetivo de equinos na ordem de 64.126 cabeças de cavalos, sendo a cidade de Porto Real do Colégio com maior rebanho (3.000 cabeças).

2.2. MORMO

O mormo é uma das doenças mais antigas de equídeos conhecidas e era encontrada em toda Europa, Ásia e África, além de parte do hemisfério ocidental. Devido a testes, métodos de erradicação, vigilância veterinária e diminuição do número de cavalos, a doença foi eliminada, ou controlada, na maioria dos países desenvolvidos. Porém, o mormo ainda é prevalente em países em desenvolvimento, como Índia, China, Turquia, Brasil, Iraque, Paquistão, Turquia e Norte da África (MUHAMMAD et al., 1998; ROWLAND et al., 2010).

Segundo Mota et al. (2000), no Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em 1811, introduzida provavelmente por animais infectados importados da Europa, desencadeando-se verdadeiras epidemias em vários pontos do território nacional, vitimando muares, cavalos e humanos que adoeceram com sintomatologia de catarro e cancro nasal. Após vários relatos da ocorrência da enfermidade em eqüídeos e humanos, com caracterização dos achados epidemiológicos, clínicos, microbiológicos e anatomo e histopatológicos, a

doença parecia ter sido erradicada no Brasil; a última referência a um foco de mormo havia sido feita no Instituto Vital Brasil, no Rio de Janeiro em 1967. De acordo com Santos et al. (2001), a partir de 1967, por 30 anos, não se registraram mais oficialmente casos de mormo no Brasil, porém, nas propriedades produtoras de cana-de-açúcar da Zona-da-Mata dos Estados de Alagoas e de Pernambuco, continuou a ocorrer uma doença que acometia principalmente os muares, com sintomatologia clínica e epidemiologia semelhantes àquelas do mormo, embora sem comprovação laboratorial do envolvimento da *B. mallei*, circunstância essa que veio a ocorrer somente em 1999 no trabalho de Mota et al. (2000)., Said et al. (2016) descrevem que em 2004 foi relatado o primeiro caso em Santa Catarina, seguido pelo Paraná em 2007, São Paulo em 2008, Minas Gerais e Bahia em 2012, e de 2012 a 2015 vários focos em outros Estados (Amazonas, Pará, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Rio de Janeiro, Ceará, Piauí, Distrito Federal e Roraima).

2.3. ETIOLOGIA

Burkholderia mallei é um bacilo Gram-negativo, sem cápsula, que medindo 0,5µm de espessura, aeróbio, não esporulado e imóvel, e sua morfologia depende das condições de cultivo. O agente do mormo pode ser cultivado em meios que contenham glicerol ou sangue. Quando cultivados em ágar sangue, produzem colônias não hemolíticas de coloração ligeiramente acinzentada, de aspecto mucoide e brilhante, após 48 horas de incubação a 37°C. Não existe meio seletivo comercial específico para o cultivo do bacilo do mormo, e alguns meios de cultura, como agar Ashdown e BSCA, não permitem o crescimento do agente (HIRSH e ZEE, 2003; MOTA et al., 2005; ROMERO et al 2006; GLASS et al. 2009; SILVA et al., 2009; DITTMANN et al., 2015; MOTA e RIBEIRO, 2016).

As provas bioquímicas são utilizadas para caracterizar as bactérias. A *B. mallei* é oxidase e catalase-positiva, reduz nitrato, hidrolisa a ureia, descarboxilisa a lisina e fermenta a glicose, sendo negativa para a produção de H₂S, indol, não utiliza citrato e não fermenta maltose, lactose, manose e manitol, além de não reagirem ao VM e VP (AL-ANI et al., 1998; SILVA et al., 2009).

A *B. mallei* é uma bactéria intracelular obrigatório, bem adaptado ao seu hospedeiro, mas não resiste no ambiente. Sendo sensível à dessecação, luz solar, irradiação ultravioleta, ao calor, sendo destruído em 10 minutos ao aquecimento a 55°C, a diversos desinfetantes comuns, como desinfetantes à base de iodo, cloreto de mercúrio em álcool, permanganato de potássio, hipoclorito de sódio na concentração de 500ppm, etanol a 70% e glutaraldeído a 2%. Pode permanecer viável, pelo menos por um mês, em água de reservatório, e condições de umidade favorecem sua sobrevivência (BEER, 1988; SANFORD et al., 1995; OIE, 2009).

2.4. EPIDEMIOLOGIA

O mormo é conhecido desde a antiguidade, havendo relatos de Hipócrates e de Aristóteles descrevendo quadros da doença em cavalos (WILKINSON, 1981). Na idade média, difundiu-se em muitos países, em decorrência das inúmeras guerras, continuando a disseminação até a 2ª Grande Guerra Mundial. No início do século XX, o mormo era largamente distribuído na Europa, Estados Unidos da América e Canadá, diminuindo sua difusão após o advento do transporte motorizado em substituição ao transporte animal (WILKINSON, 1981; NAUREEN et al. 2007).

O mormo foi erradicado da América do Norte e da maioria dos países europeus na década de 50, do século passado (CDC, 2000; SRINIVASAN et al, 2001), sendo enzoótica em alguns países do continente africano, asiático, do oriente médio, da América do Sul e Central (AL-ANI et al., 1998; THIBAUT et al., 2004; AL-ANI e ROBERSON, 2007; SPRAGUE et al., 2009).

Atualmente, o mormo continua a ser relatado no Brasil, China, Índia, Irã, Iraque, Paquistão, Turquia e Emirados Árabes Unidos. A doença é considerada endêmica em várias áreas do Oriente Médio, Ásia, África e América do Sul, embora a distribuição geográfica determinada através de pesquisas sorológicas para *B. mallei* seja complicada pelas reações cruzadas com *B. pseudomallei* (OIE, 2009).

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em 1811 e sua introdução provavelmente ocorreu pela importação de animais infectados da Europa (PIMENTEL, 1938). No período entre 1968 e 2000 não houve registro oficial da doença em território brasileiro, sendo considerada extinta pelo

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (ITO et al, 2008). Mota et al. (2000) relata que o diagnóstico de mormo em equinos dos estados de Alagoas e Pernambuco, surgindo polêmica se houve um ré emergência da doença ou se, anteriormente, houve falhas no diagnóstico. Após o diagnóstico do mormo nos estados de Alagoas e Pernambuco foi observado que a doença ocorria em animais utilizados no trabalho da zona da mata dos dois estados, e em cavalos que participavam de vaquejadas e cavalgadas (MANSO FILHO et al., 2000). A partir dessa constatação a ocorrência de mormo no Brasil foi alta e continuada em alguns estados, de acordo com as notificações à OIE no período de 1999 a 2004 (OIE, 2011c).

Burkholderia mallei pode produzir infecção natural em diversas espécies animais, inclusive no homem, sendo atualmente considerada uma importante zoonose, especialmente pela possibilidade da utilização da bactéria como arma biológica (CDC, 2000; SRINIVASAN et al., 2001; ACHA e SZYFRES, 2003; DeSHAZER e WAAG, 2004; OIE, 2009). Os equinos, asininos, muares são considerados os principais hospedeiros suscetíveis, podendo a infecção ocorrer em camelos, dromedários, ursos, lobos, felídeos, cães, macacos, leões e pequenos ruminantes; são considerados resistentes bovinos, suínos e aves; com relação aos animais de laboratório, os hamsters, cobaios, ratos e camundongos são suscetíveis à infecção, especialmente os cobaios e hamsters (FRITZ et al., 2000; DeSHAZER e WAAG, 2004; THIBAUT, et al., 2004; NAUREEN et al., 2007; RIBOT e ULRICH, 2006; MOTA et al. 2008; OIE, 2009).

Entre os solípedes, os muares e asininos são considerados mais sensíveis ao aparecimento clínico da doença, as mulas têm sensibilidade intermediária e os cavalos demonstram alguma resistência, manifestada pelo aparecimento de formas crônicas da doença (FRITZ et al., 2000; DeSHAZER e WAAG, 2004; OIE, 2009), com base nesse conceito alguns autores consideram os equinos reservatório do agente do mormo por apresentarem não só a forma crônica da doença, mas também infecção clinicamente inaparente que pode determinar a persistência do agente no plantel (ACHA e SZYFRES, 2003; NEUBAUER et al., 2005; SPRAGUE et al., 2009), especialmente em condições de aglomeração de animais e estresse (MOTA et al., 2000; OIE, 2009; SPRAGUE et al., 2009).

Na epidemiologia do mormo, os animais carreadores subclínicos são frequentemente mais importantes na transmissão da doença, que animais com quadros clínicos, sendo os principais responsáveis pela manutenção da infecção na região ou no estabelecimento, principalmente em criações em confinamento, contribuindo para a dispersão do agente através da movimentação desses animais (ACHA e SZYFRES, 2003; OIE, 2009; LAZAR ADLER et al., 2011).

A transmissão da *B. mallei*, entre os solípedes, pode ocorrer principalmente através da ingestão de alimentos e água contaminada com descarga do trato respiratório ou exsudato das lesões cutâneas dos animais doentes (MOTA, 2006; WHITLOCK et al., 2007; OIE, 2009; SPRAGUE et al., 2009), sendo possível também a transmissão através da via aerógena e por infecção de ferida (ACHA e SZYFRES, 2003). Os carnívoros podem infectar-se através de contato estreito com cavalos doentes (OIE, 2009). O homem pode contrair a infecção através do contato com solípedes doentes, sobretudo em aglomerações (ACHA e SZYFRES, 2003), sendo considerados como grupos de risco veterinários, tratadores e magaferes (WHITLOCK et al., 2007). A principal via de eliminação do agente bacteriano é através das secreções orais e nasais, após a ruptura das lesões pulmonares (RADOSTITS et al., 2002).

2.5. PATOLOGIA

Ao penetrar no organismo a *B. mallei* pode produzir lesões na porta de entrada, especialmente na faringe e septos nasais, as quais geralmente apresentam congestão, lesão primária granulomatosa ou formações nodulares que podem se ulcerar e apresentar exsudato mucopurulento com estria de sangue (PRITCHARD, 1995; SHARRER, 1995; MOTA et al., 2000; HIRSH e ZEE, 2003; ITO et al., 2008), em casos crônicos essas úlceras evoluem formando cicatrizes irregulares ou estrelas na mucosa nasal, muitas vezes com destruição do septo nasal (MOTA et al., 2000; SANTOS et al., 2001; MOTA et al., 2006).

Com disseminação do agente etiológico e a resposta do organismo animal, as lesões são observadas em diversos órgãos e tecidos. À necropsia, podem ser observados abscessos cutâneos, com conteúdo purulento amarelo cremoso, aumento de volume e abscedação dos linfonodos, aumento de

volume dos vasos linfáticos superficiais e ulcerações cutâneas, principalmente nos membros (SANTOS et al., 2001).

Na porção posterior do sistema respiratório e na cavidade torácica podem ser visualizadas áreas de inflamação proliferativa (SANTOS et al., 2001), hemorragias petequiais e equimóticas na pleura visceral e abscessos, que podem ser múltiplos (MOTA et al., 2000), pleurite fibrinosa, com aderência entre os folhetos da pleura e espessamento da pleura visceral (SANTOS et al., 2001). Nos pulmões podem ocorrer pneumonia lobar e presença de abscessos isolados ou confluentes, dando aspecto de caverna, pequenos nódulos avermelhados, com área central acinzentada (SANTOS et al., 2001) e piogranulomas nos pulmões (MOTA et al., 2000), e em casos crônicos áreas de carnificação pulmonar (SANTOS et al., 2001).

Ao longo dos vasos do sistema linfático, principalmente nas regiões da cabeça, pescoço e membros, podem ser observados nódulos firmes, arredondados e elevados, formando rosários, que podem tornar-se flácidos, podem fistular, drenando pus branco-amarelado, e os linfonodos podem apresentar aumento de volume, principalmente os linfonodos mandibulares, cervicais, precurais e os relacionados ao trato respiratório, às vezes, presença de fístulas, com eliminação de material purulento, e em casos crônicos podem apresentar textura fibrosa e aderência à pele (MOTA et al., 2000).

No trato intestinal podem ser encontradas ulcerações na mucosa do ceco. No fígado e baço podem ser observados nódulos de aspecto lardáceo, com tamanhos variados, ou granulomas específicos, Nos testículos podem ocorrer lesões abscedativas (SANTOS et al., 2001).

O exame histopatológico revela lesões granulomatosas ou piogranulomatosas, com necrose de caseificação central circundada por grande quantidade de elementos inflamatórios, especialmente macrófagos, células epitelióides, células gigantes, linfócitos, plasmócitos e abundante tecido conjuntivo, podendo haver áreas de calcificação no tecido necrótico (MOTA et al., 2000; SANTOS et al., 2001). Nas fossas nasais pode-se observar infiltrado com grande quantidade de polimorfonucleares, destruição do epitélio nasal, glândulas e cartilagem septal, hemorragias, focos de fibrina, vasculite, trombose vascular e presença de tecido de granulação, junto a infiltrado celular

contendo macrófagos, linfócitos, plasmócitos e células gigantes (MOTA et al., 2000; SANTOS et al., 2001).

Nos pulmões podem ser observados moderada a acentuada congestão, pequenos focos de hemorragia, presença de edema e fibrina, com localização interlobular e intra-alveolar, presença de piogranulomas, com área central necrótica, debris celulares e neutrófilos degenerados, circundados de macrófagos, células epitelíoides e células gigantes, infiltrado no tecido de granulação, havendo ainda fibrinoso e estroma conjuntivo e edema periférico (MOTA et al., 2000; SANTOS et al., 2001; HIRSH e ZEE, 2003).

Nos linfonodos pode ocorrer congestão, hemorragia e necrose, além de focos de inflamação piogranulomatosa, semelhantes àqueles observados nos pulmões (MOTA et al., 2000; SANTOS et al., 2001). No fígado pode-se observar necrose e infiltração granulomatosa focal, com presença de células gigantes e pericolangite granulomatosa, no baço, áreas de necrose fibrinóide, associadas à inflamação piogranulomatosa e extensas áreas de fibrinose, e nos rins, infiltração granulomatosa multifocal intersticial com alguns focos de necrose tubular (MOTA et al., 2000).

2.6. SINTOMATOLOGIA

O período de incubação do mormo depende da virulência da bactéria, do tipo e da intensidade da infecção e da resistência do animal, variando de alguns dias a vários meses (ACHA e SZYFRES, 2003).

Em solípedes, principais hospedeiros suscetíveis da *B. mallei*, o mormo pode se manifestar de forma aguda, subaguda ou crônica (GILAD et al., 2007), raramente ocorrendo a forma superaguda, observada principalmente em animais desnutridos, depauperados e estressados (ACHA e SHYFRES, 2003).

Na forma aguda do mormo ocorre febre alta, diminuição do apetite, tosse, dispneia progressiva, emaciação, ulceração do septo nasal, acompanhada de descarga nasal, inicialmente serosa, tornando-se mucopurulenta a hemorrágica, nódulos nas cavidades nasais e descarga oculares purulentas (AL-ANI et al., 1998; WHITLOCK et al., 2007; ITO et al., 2008).

Em equinos, além da febre alta, podem ocorrer sintomas respiratórios incluindo narinas inchadas, presença de úlceras necróticas e nódulos nas

passagens nasais, descarga nasal espessa, dispneia inspiratória, tosse, sinais de pneumonia, e aumento de volume dos linfonodos das regiões do pescoço, principalmente dos linfonodos submaxilares que comumente estão edemaciados e doloridos, e da região mediastínica, e espessamento dos vasos linfáticos da face (SANTOS et al., 2001; ITO et al., 2008; LARSEN e JOHNSON, 2009). Às vezes pode ser observado apenas edema no peito e o órbita ocorrer em poucos dias (SANTOS et al., 2001; ITO et al., 2008; LARSEN e JOHNSON, 2009).

Infecções cutâneas, com presença de nódulos, úlceras e abscessos podem ser visualizados e a morte dos animais acometidos pode ocorrer em poucos dias ou semanas, usualmente devido à septicemia (LARSEN e JOHNSON, 2009).

Em jumentos e mulas, os mesmos sinais clínicos são observados, podendo ser letal em poucos dias (LARSEN e JOHNSON, 2009). Ocorrendo também úlceras na cavidade nasal, caquexia, perda de apetite e nódulos nos vasos linfáticos, com aspecto de rosário, na região cervical (RABELO et al., 2006; MOTA et al., 2010).

A forma crônica do mormo é a forma mais comumente verificada em equinos, podendo apresentar sinais e sintomas variados, dependendo da via infecção (WHITLOCK et al., 2007), como as formas nasal, pulmonar e cutânea, podendo coexistir em um mesmo animal mais de uma forma (SANTOS et al., 2001; ITO et al., 2008). Podem ser observados sinais de pneumonia com tosse, respiração ruidosa, epistaxe, dispneia e estertores pulmonares; lesões no septo nasal, que se iniciam com nódulos e evoluem para úlceras, no processo de cicatrização formam cicatrizes em forma de estrelas; no início há uma secreção nasal serosa que evolui para purulenta com estrias de sangue. Podendo ocorrer, também, nódulos elevados de consistência firme a flácida na pele, que drenam secreção purulenta amarelada, e com a evolução da doença, emagrecimento progressivo (PRITCHARD, 1995; SHARRER, 1995; AL-ANI et al., 1998; MOTA et al., 2000; MOTA et al., 2006).

No mormo nasal, os animais podem apresentar, inicialmente, uma descarga nasal serosa, unilateral, que pode evoluir para purulenta de coloração amarelada a purulenta hemorrágica, podendo tornar-se bilateral (SANTOS et al., 2001; ITO et al., 2008). Pode ocorrer a perfuração nasal, e os nódulos

linfáticos submaxilares podem tornar-se aumentados e endurecidos, muitos podem supurar e drenar e as úlceras cicatrizadas adquirem a forma estrelada (ITO et al., 2008). Além desses sinais e sintomas, cavalos com a forma crônica do mormo podem apresentar nódulos inflamatórios e úlceras nas passagens nasais, febre intermitente, letargia, perda de peso, dispneia, diarreia, poliúria (AL-ANI et al., 1998; LARSEN e JOHNSON, 2009); em jumentos e mulas, pode ocorrer também tosse, letargia, perda de peso, além da concomitância de sinais e sintomas das outras formas (LARSEN e JOHNSON, 2009).

A forma pulmonar caracteriza-se por uma pneumonia lobular, algumas vezes há formação de abscessos ou de nódulos pulmonares. Algumas infecções são inapetentes, outras variam de ligeira dispneia a doença respiratória grave, incluindo, episódios febris, tosse, dispneia e as descargas dos abscessos pulmonares podem disseminar a infecção para o trato respiratório superior. Podem ocorrer, diarreia, poliúria e debilidade progressiva (SANTOS et al., 2001; ITO et al., 2008).

A forma cutânea do mormo é caracterizada pela formação de abscessos ou nódulos cutâneos, que podem se romper e liberar exsudato oleoso-purulento de coloração amarela, aumento dos linfonodos e aumento dos vasos linfáticos que os interligam, dando um aspecto de rosário, vergões, laparões. Podem ocorrer ainda, edema e ulcerações, principalmente nas articulações dos membros posteriores, e em machos, é relativamente comum aparecimento de orquite (SANTOS et al., 2001; ITO et al., 2008; LARSEN e JOHNSON, 2009).

2.7. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do mormo deve estar baseado nas observações das alterações clínicas, patológicas, dados epidemiológicos, da identificação do agente bacteriano, através de isolamento bacteriano inoculação em animais de laboratório ou caracterização por métodos moleculares, de reação imunoalérgica (maleinização) e testes sorológicos como a fixação de complemento e ELISA (MOTA, 2006; AL-ANI e ROBERSON, 2007).

O exame clínico raramente possibilita um diagnóstico seguro, os sinais clínicos do mormo podem estar ausentes ou pouco desenvolvidos, principalmente na evolução crônica, frequente em cavalos. Na forma aguda do mormo deve-se levar em consideração para o diagnóstico clínico ocorrência de

febre, dispneia, tosse e sinais de pneumonia, ulceração do septo nasal, descarga mucopurulenta a hemorrágica, aumento de volume dos linfonodos das regiões do pescoço e do mediastino, espessamento dos vasos linfáticos e nódulos e abscessos cutâneos (AL-ANI et al., 1998; SANTOS et al., 2001; WHITLOCK et al., 2007; ITO et al., 2008; LARSEN e JOHSON, 2009).

Presença de lesões granulomatosas ou nodulares, úlceras e cicatrizes irregulares, ou estrelares na mucosa nasal, hemorragias, abscessos e processo inflamatório na pleura, pneumonia lobar, com presença de abscessos e piogranulomas nos pulmões, presença de nódulos firmes ou flácidos, fistulados ou não, ao longo dos vasos linfáticos e linfonodos aumentados de volume, às vezes fistulados, podendo ter textura fibrosa e aderência à pele, e nódulos, abscessos, úlceras e cicatrizes cutâneas, contribuem para o diagnóstico do mormo (PRITCHARD, 1995; SHARRER, 1995; MOTA et al., 2000; SANTOS et al., 2001; HIRSH e ZEE, 2003; MOTA, 2006; ITO et al., 2008).

2.7.1 Diagnóstico Microbiológico

2.7.1.1 Prova de Strauss

A prova de Strauss é realizada pela inoculação da secreção nasal ou o conteúdo dos abscessos subcutâneos na cavidade peritoneal de cobaias, observando-os por até duas semanas após a inoculação. As cobaias poderão apresentar aumento do volume testicular e sinais de septicemia 24 a 48 horas após a aplicação ou abscessos no ponto de inoculação aproximadamente três a cinco dias após. À necropsia observam-se lesões abscedativas em diferentes órgãos de onde coleta-se material para isolamento e identificação bacteriana (SILVA et al., 2005; MOTA, 2006). A prova de Strauss é um teste bastante sensível e que pode ser empregado no diagnóstico do mormo (BIER, 1984; MOTA et al., 2000; SILVA et al., 2005; GLASS et al., 2009).

2.7.2 Diagnóstico Molecular

Segundo Tyler et al. (1995), a aplicação de métodos baseados em biologia molecular apresenta um impacto significativo no diagnóstico, especialmente na caracterização molecular de amostras.

2.7.2.1 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A Reação em cadeia de Polimerase (PCR) é um método de amplificação de ácidos nucleicos (DNA ou RNA), utilizando métodos de replicação *in vitro*. A utilização de ferramentas de investigação molecular na identificação da bactéria, após isolamento em meio de cultura ou em material clínico, tem sido investigada nas últimas décadas. Variações na metodologia da PCR têm sido utilizadas na identificação da *Burkholderia mallei* em materiais biológicos e em culturas da bactéria (TOMASO et al., 2006; ULRICH et al., 2006a; ULRICH et al., 2006b).

A PCR, atualmente, é uma alternativa para o diagnóstico do mormo. Diversos estudos têm sido objetivaram utilizar esta técnica para identificação de microorganismos do gênero *Burkholderia* spp. Segundo Suppiah et al. (2010), a detecção de patógenos por métodos moleculares vem sendo usada devido à rápida identificação do agente e conclusão do diagnóstico, sendo importante, principalmente, em casos de doença clínica. Lee et al. (2005) utilizaram a PCR para diferenciar a *B. mallei* da *B. pseudomallei*, pois em países onde a *B. pseudomallei* é endêmica a diferenciação das duas espécies de *Burkholderia* deve ser usual, além disso, a identificação é importante pois as duas bactérias são consideradas como agentes potenciais para o bioterrorismo.

Silva et al. (2009) realizaram a caracterização fenotípica e molecular de amostras de *B. mallei* isoladas nos Estados de Pernambuco e Alagoas, utilizando as técnicas de ribotipagem-PCR e RAPD-PCR.

2.7.3 Diagnóstico Sorológico

O diagnóstico do mormo pode ser realizado através da investigação sorológica, utilizando diversas metodologias, como o teste de fixação do complemento (FC), hemaglutinação indireta (HAI), contraimuno eletroforese (CIEF), ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), *western blot* (WB), *immunoblotting* (IB), aglutinação, reação de aglutinação com antígeno corado por rosa bengala (RB) e outras técnicas ou modificações das técnicas conhecidas (NAUREEN et al., 2007; SPRAGUE et al., 2009; ELSCHNER et al., 2011). Na atualidade todos os teste sorológicos utilizados no diagnóstico do

mormo apresentam problema devido à inadequada sensibilidade e especificidade dos antígenos utilizados nos testes, geralmente representados por preparações produzidas com células bacterianas inteiras, ocasionando reação falso positivas ou falso negativas (NEUBAUER et al., 2005; SPRAGUE et al., 2009).

Oficialmente, para fins de diagnóstico e controle da enfermidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento recomenda somente a realização dos testes de FC, ELISA e WB (MAPA, 2018)

2.7.3.1 Fixação de Complemento (FC)

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº24 da Secretaria de Defesa Agropecuária (MAPA, 2004), determina que o diagnóstico sorológico do mormo deverá ser realizado pela prova de fixação do complemento (FC), ou outra prova aprovada previamente pelo Departamento de Defesa Animal (DDA). O teste de FC também é recomendado para o diagnóstico do mormo pela OIE (OIE, 2011d). A coleta e remessa de material para diagnóstico devem ser realizadas por médico veterinário oficial ou cadastrado, enviando o material para o Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco (LANAGRO – PE) ou laboratório credenciado pelo MAPA (SOUZA, 2012).

O teste de FC é confiável em populações equinas com baixa prevalência de mormo, sendo o teste de eleição para testar cavalos para ausência de infecção por *B. mallei* (SPRAGUE et al., 2009). A sensibilidade do teste de FC é pelo menos 97%, com resultados inespecíficos, falsos positivos, devido a reações cruzadas que podem ocorrer em cavalos com garrotilho, influenza equina e febre petequial, não sendo possível sua realização em soros com atividade anticomplementar e em soros hemolisados, resultados falso negativos podem ocorrer em animais emaciados e cronicamente debilitados (ELSCHNER et al., 2011).

Com o objetivo de evitar falsos resultados observados com a utilização de antígeno com célula bacteriana inteira, foi elaborado um antígeno com lipopolissacarídeos de *B. mallei* utilizado no teste de WB, que demonstrou especificidade maior que o teste de FC, porém com menor sensibilidade, tendo ocorrido ainda reação cruzada com anticorpos anti – *B. pseudomallei*, com o

indicativo de ser utilizado como teste confirmatório para o diagnóstico de mormo (ELSCHNER et al., 2011).

2.7.3.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - ELISA

Desde sua introdução por Engvall e Perlmann (1972), o método de ELISA tem se mostrado extremamente versátil, permitindo pesquisar a presença de anticorpos para uma ampla variedade de antígenos, com especificidade e sensibilidade superiores a muitos dos outros métodos em uso rotineiro (THEAKSTON et al., 1977; COSTA, 1986; DAHOO et al., 1986; CHÁVEZ-OLÓRTEGUI et al., 1989; ARAJ e KAUFAMAN, 1989; YOUNG, 1991).

O Elisa-i (ELISA indireto) é usado para a detecção e/ou quantificação de anticorpos em amostras de soro, com destaque em estudos soropidemiológicos. A especificidade dessa prova é garantida principalmente pela qualidade do antígeno adsorvido à placa (Madruga et al., 2001).

2.7.3.3 Teste Imuno Alérgico Cutâneo – Maleína

O derivado proteico purificado (PPD) maleína é uma solução aquosa, contendo frações proteicas de *B. mallei* tratada pelo calor (OIE, 2008), não tóxica para animais sadios, que aplicada em cavalos infectados determina reação de hipersensibilidade local e sistêmica (HAGEBOCK et al., 1993), mas que pode produzir resultados inconclusivos em casos clínicos avançados em cavalos e casos agudos em jumentos e mulas (OIE, 2008).

O teste deve ser realizado através da aplicação de PPD maleína, na dose de 0,1mL por via intradérmica, na pálpebra inferior de um dos olhos do animal, e o procedimento de leitura deverá ser realizado 48 horas após aplicação intradérmica, por médico veterinário do serviço oficial (MAPA, 2004). A reação positiva caracterizada por marcante edema de pálpebra, lacrimejamento, fotossensibilidade, podendo ocorrer descarga ocular purulenta, usualmente acompanhada de aumento na temperatura corporal. Animais negativos não apresentam reação ou ocorre apenas discreto edema de pálpebra inferior (HAGEBOCK et al., 1993; OIE, 2008).

Por este método o animal maleinizado apresenta conversão sorológica, podendo ser detectado pelos testes de FC e ELISA, por 17 a 24 dias após a aplicação. A resposta sorológica geralmente desaparece em algumas semanas, mas pode persistir em alguns animais, sendo mais persistente na segunda aplicação de maleína (HAGEBOCK et al., 1993).

2.7.3.4 Western Blotting (WB)

Western blotting (WB) também conhecido como protein blotting ou immunoblotting, é um poderoso e importante método em biologia molecular utilizado para imunodeteção de proteínas após a separação destas por eletroforese em gel e transferência para membrana adsorvente. Esta técnica permite detectar, caracterizar e quantificar múltiplas proteínas principalmente aquelas que estão em baixas quantidades em determinada amostra (KURIEN & SCOLFIELD, 2003). O método é baseado na construção de um complexo anticorpo-proteína através da ligação de anticorpos específicos em proteínas imobilizadas sobre uma membrana e a detecção de anticorpo ligado a partir de vários métodos de detecção (GE Handbook, 2011).

Em estudos relacionados à detecção de anticorpos e proteínas de agentes infecciosos, este método é considerado altamente sensível e específico, sendo o método de eleição para diagnóstico de inúmeras doenças dos animais (COOLEY et al., 2001; TALMI-FRANK et al., 2006). A técnica de IB foi usada como padrão ouro por Elschner, et al. 2011. O teste detecta animais com clínica inaparente e aqueles infectados na fase crônica. Os benefícios do WB em soros anticomplementares já foi destacado por Katz et al., 1999 e Elschner, et al. 2011.

2.8 TRATAMENTO

O tratamento de animais acometidos pelo mormo não é indicado pela OIE (2008), pois se tornam portadores subclínicos, tornando-se fonte de infecção para outros animais e para o homem. Em áreas ou países que apresentam baixa prevalência devem ser adotadas medidas de controle e erradicação do mormo (SOUZA, 2012).

Desde que o bacilo do mormo foi colocado na lista de agentes biológicos possíveis de serem utilizados em atentados terroristas (GILAD et al., 2007; GREGORY e WAAG, 2007), houve aumento de interesse no estudo da sensibilidade da *B. mallei* a antibióticos e quimioterápicos visando a possibilidade de tratamento de humanos (SOUZA, 2012).

2.9 PREVENÇÃO E CONTROLE

O controle e a prevenção de epizootias de mormo dependem da existência e eficiência de programa de detecção precoce e eliminação de animais positivos, cujas carcaças devem ser incineradas e enterradas, controle estrito de movimentação animal, procedimentos efetivos de quarentena e limpeza e desinfecção das áreas afetadas, alimentos e camas devem ser incinerados e enterrados, e veículos e equipamentos cuidadosamente desinfetados (OIE, 2000).

No Brasil, a vigilância e o controle do mormo em equídeos estão normatizados pelo MAPA, através da IN 24 (MAPA, 2004), da Secretaria de Defesa agropecuária, que determina a eliminação de animais com diagnóstico laboratorial positivo para mormo; controle rigoroso de trânsito interestadual, com prova de fixação de complemento negativa, com validade de 60 dias; quarentena e interdição da fazenda com casos diagnosticados sorologicamente. A interdição da propriedade somente será suspensa pelo serviço veterinário oficial, após eutanásia dos animais positivos e realização de dois exames sucessivos de FC de todo plantel, com intervalos de 45 a 90 dias, com resultados negativos. Carcaças de animais contaminados, alimentos e camas das baias, além de todos os materiais descartáveis devem ser queimados e enterrados. Devem ser realizada limpeza e desinfecção das áreas de focos, com desinfetantes comuns; veículos e equipamentos, como cabrestos, arreios e outros, também devem ser cuidadosamente lavados e desinfetados, devendo-se evitar baias e cochos coletivos. A aquisição de animais devem ser de áreas livres e com diagnóstico laboratorial negativo para mormo (SOUZA, 2012).

Não há vacina comercializada contra o mormo (GILAD et al., 2007; SARKAR-TYSON et al., 2009). A proteção contra o desafio da infecção pelo bacilo do mormo através da vacinação deve levar em consideração a resposta

imune celular, em adição à resposta humoral (BONDI e GOLDBERG, 2008), produção de IFN- γ (WHITLOCK et al., 2007; WHITLOCK et al., 2009) e TNF- α (WHITLOCK, 2009).

2.10 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA E BIOSSEGURANÇA

O mormo é uma zoonose e a importância da *B. mallei* aumentou para a Saúde Pública após sua inclusão na lista B de agentes biológicos possíveis de serem utilizados em atividades terroristas, como arma biológica (CDC, 2000; SRINIVASAN et al, 2001; ACHA e SZYFRES, 2003; DeSHAZER e WAAG, 2004; GILAD et al., 2007, OIE, 2009). Apesar do baixo número de casos de ocorrência de mormo em humanos, a doença determina alta mortalidade, sendo letal em quase todos os casos de infecção humana (SHARRER, 1995; DeSHAZER e WAAG, 2004; GREGORY e WAAG, 2007; BONDI e GOLDBERG, 2008). No Brasil, o Ministério da Saúde classifica a *B. mallei* como risco nível 3 (BRASIL, 2006).

2.11 OBJETIVOS

2.11.1 Objetivo geral

Estudar os aspectos de diagnóstico clínico, imunológico, anatomopatológico e microbiológico em equídeos naturalmente infectados por *Burkholderia mallei*.

2.11.2 Objetivos específicos

- Acompanhar o desenvolvimento dos sinais clínicos de animais infectados naturalmente por *B. mallei*;
- Isolar e caracterizar fenotipicamente e estudar genotipicamente a bactéria *B. mallei*;
- Avaliar a resposta imunológica em equídeos naturalmente infectados por *B. mallei* em uma propriedade foco no estado de Alagoas por ELISA;
- Realizar infecção experimental por *B. mallei* em cobaios (*Cavia porcellus*);
- Realizar estudo anatomopatológico em equídeos naturalmente infectados.

REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZIFRES, B. **Glanders. In: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals.** Pan American Health Organization, Washington, DC. p.142-145. 2003.
- AL-ANI, F. K. et al. **Glanders in horses: Clinical, biochemical and serological studies in Iraq.** Veterinarski Arhiv, v.68, n.5, p.155-162, 1998.
- AL-ANI, F. K; ROBERSON, J. **Glanders in horses: A review of literature.** Veterinarski Arhiv, v.77, p.203-218, 2007.
- ARAJ, G.F.; KAUFAMAN, A.F. **Determination by enzyme-linked immunosorbent assay of immunoglobulin G (IgG), IgM and IgA to Brucella melitensis major outer membrane proteins and whole-cell heat-killed antigens in sera of patients with brucellosis.** J. Clin. Microbiol , 27: 1909-1912, 1989
- BEER, J. Infecção por *Loefflerellas*. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos.** V. 2, p. 142-147. Livraria Roca Ltda, 1988.
- BIER, O. **Microbiologia e Imunologia.** São Paulo: Editora Melhoramento, 1984.1106p.
- BONDI, S. K.; GOLDBERG, J. B. **Strategies toward vaccines against Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei.** Expert Review of Vaccines, v.7, n.9, p.1357-1365, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Sumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tencologia. Série A. **Normas e Manuais Técnicos. Classificação de Risco dos Agentes Biológicos.** Editora MS, Brasília, 24p. 2006.
- CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Laboratory-acquired human glanders. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report,** V.49, P.532-535, 2000.
- CHÁVEZ-OLÓRTEGUI, C.; FONSECA, S.C.G.; CAMPOLINA, D. et al. **ELISA for detection of toxic antigens in experimental and clinical envenoming by Tityus serrulatus scorpion venom.** Toxicon, Oxford, 12: 1646-1656, 1994.
- COOLEY W.A., CLARK J.K., RYDER S.J., DAVIS L.A., FARRELLY S.S.J.; STACK M.J. **Evaluation of a Rapid Western Immunoblotting Procedure for the Diagnosis of Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in the UK.** Journal of Comparative Pathology. Edinburgh. v.125, n.1, p.64-70, 2001.
- COSTA, J. M. **ELISA no Diagnóstico da Neurocisticercose .** Arq. Neuro-psiquiatria (São Paulo). Vol.44, nº 1, março, 1986.
- DAHOO, I.R.; WRIGHT, P F ; RUCKERBAUER, G.S. A Comparison of Five Serological Tests for Bovine Brucellosis. American Journal of Veterinary Research, 50: 485-493, 1986.
- DeSHAZER, D.; WAAG, D. Glanders: new insights into an old disease. In LINDLER, L. E.; LEBEDA, F.J; KORCH, G. W. (ed) **Biological weapons defense: infectious diseases and counterbioterrorism.** The Humana Press, Inc., Totowa, N.J. p.209-237. 2004.
- Elschner, M. C. et al. **Use of Western Blot Technique for the Serodiagnosis of Glanders.** BMC Veterinary Research, 2011. 7:4
- ENGVALL, E.; PERLAMANN, P. **Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA.** J. Immonol, 109: 129-135, 1972.

FRITZ, D. L. et al. **Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*)**. Veterinary Pathology, v.37, n.6, p.626-636, 2000.

GE Handbooks. **Western Blotting - Principles and methods**, 2011.

GILAD, J. et al. ***Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness**. The Israel Medical Association Journal, v.9, p.499-503, 2007.

GLASS, M. B. et al. **Comparison of four selective media for the isolation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei***. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 80, n.6, p. 1023-1028, 2009.

GREGORY, B. C.; WAAG, D. M. **Glanders**. In: **Department of The Army. Medical Aspects of Biological Warfare**. Boden Institute, U. S. Army Medical Department, Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA,. P.121-146, 2007.

HAGEBOCK, J. M. **Serologic responses to the mallein test for glanders in solipeds**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, v.5, p.97-99, 1993.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**, 1ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 446p. 2003.

ITO, F. et al. Programa de Vigilância de Zoonoses e Manejo de Equídeos do Estado de São Paulo. Módulo III: Outras zoonoses de importância em equídeos e vigilância epidemiológica em unidades municipais – Parte 2. **Boletim Epidemiológico Paulista**. 2008. Disponível em http://www.cve.sp.saude.gov.br/agencia/bepa56_equideos.htm. Acesso em 05/01/2018.

KATZ, J. B., Chieves, L. P., Hennager, S. G., Nicholason, J. M. Fisher, T. A., Byers, P. E. **Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine and glanders using an arrayed immunoblotting method**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 11, 292 – 627, 1999.

KURIEN, B. T.; SCOFIELD, R. H. **Protein blotting: a review**. Journal of Immunological Methods. Amsterdam. v.274, p.1-15, 2003.

LARSEN, J. C.; JOHNSON, N. S. **Pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei***. Military Medicine, v.174, n.6, p.647-651, 2009.

LAZAR ADLER, N. R. et al. **Autotransporters and Their Role in Virulence of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei***. Frontiers in Microbiology, v. 2, p.151, 2011.

LEE, M.A.; WANG, D.; YAP, E.H. **Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR**. Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology, v.43, p.413-417, 2005.

MADRUGA, C.R.; ARAÚJO, F.R.; SOARES, C.O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.

MANSO FILHO, H. C. et al. **Glanders in working horses (Brazil)**. Draught Animal News, v.33, p.9-12, 2000.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Equídeos**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 10 abr. 2017.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução Normativa nº 24, de 05 de abril de 2004, da Secretaria de Defesa Agropecuária**. Publicada no Diário Oficial da União, Brasília, em 12 de abril de 2004.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Gabinete do Ministro. **Instrução Normativa nº6, de 16 de Janeiro de 2018 – PNSE**. Brasília, 2018.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Portaria nº35, de 17 de Abril de 2018 – Mormo**. Brasília, 2018.

MOTA, R. A. et al. **Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas**. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.20, n.4, p.155-159, 2000.

MOTA, R. A. et al. **Caracterización bioquímica y perfil de sensibilidad antimicrobiana in vitro de muestras de *Burkholderia mallei* aisladas de équidos de La región nordeste de Brasil**. Arquivos do Instituto Biológico, v.72, n.1, p.7-11, 2005.

MOTA, R.A. **Aspectos etiopatológicos, epidemiológicos e clínicos do mormo**. Veterinária e Zootecnia, v.13, n.2, p.117-124, 2006.

MOTA, R. A. et al. **Alterações clínicas em cobaios (*Cavia porcellus*) inoculados experimentalmente com isolados de campo de *Burkholderia mallei* de equídeos com mormo**. Medicina Veterinária, v.2, p.1-9, 2008.

MOTA, R. A. et al. **Glanders in donkeys (*Equus asinus*) in the State of Pernambuco, Brazil: a case report**. Brazilian Journal of Microbiology, v.41, p.146-149, 2010.

MOTA, R. A.; RIBEIRO, M. G. **Mormo**. In: MEGID, J.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C. (Eds). **Doenças Infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1. Ed. P.423-435. Rio de Janeiro: Roca, 20016.

NAUREEN, A.; SAQIB, M. MUHAMMAD, G. et al. **Comparative Evaluation of Rose Bengal Plate Agglutination Test, Mallein Test, and some Conventional Serological Tests for Diagnosis of Equine Glanders**. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, Tousand Oaks, v.19, n.4, p.362-367, 2007.

NAUREEN, A. et al. **Antimicrobial susceptibility of 41 *Burkholderia mallei* isolates from spontaneous outbreaks of equine glanders in Punjab, Pakistan**. Journal of Equine Veterinary Science, v.30, n.3, p.134-140, 2010.

NEUBAUER, H. et al. **Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: State-of-the-art and perspectives**. Journal of Veterinary Medicine, v.52, n.5, p.201-205, 2005.

OIE - World Animal Health Organization, 2000. **Glanders In Manua of Diagnostic Tests and Standards For Vacines**. Paris. Disponível em: <http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A00076.htm>. Acesso em: 03/01/2018.

OIE - World Animal Health Organization. Terrestrial Code. Chapter 2.5.11. Glanders. P.919-928. 2008. Disponível em: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahnm/2.05.11_GLANDERS.pdf. Acesso em: 24/10/2017.

OIE – World Animal Health Organization, 2009. Terrestrial Code. Chapter 12.10. **Glanders**. http://oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/GLANDERS_FINAL.pdf. Acesso em 25/03/2018.

OIE – World Animal Health Organization. 2011c, **Brazil/Glanders. Multiannual Animal Disease Status**. Disponível em http://web.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=26&c_mald=67. Acesso em 28/12/2017.

OIE – World Animal Health Organization. 2011d. Chapter 1.3. **Prescribed and alternative diagnostic tests for OIE listed diases.** Disponível em http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/en_chapitre_1.1.3.htm. Acesso em 23/03/2018.

PIMENTEL, W. **História e organização do serviço veterinário do exército.** Revista Militar de Medicina Veterinária, v.1, n.4, p.283-322, 1938.

PRITCHARD, D. G. **Glanders.** Equine Veterinary Education, v.7, n.1, p.29-32, 1995.

RABELO, S. S. A. et al. **Indicadores clínicos em muares naturalmente infectados pela *Burkholderia mallei*.** Veterinária e Zootecnia, v.13, p.54-62, 2006.

RADOSTITS, O. M. et al. **Clínica Veterinária.** 9 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 1737p. 2002.

RIBOT, W. J.; ULRICH, R. L. **The Animal Pathogen-Like Type III Secretion System Is Required for the Intracellular Survival of *Burkholderia mallei* within J774.2 Macrophages.** Infection and Immunity, v.74, n.7, p.4349-4353, 2006.

ROMERO, C. M. et al. **Genome sequence alterations detected upon passage of *Burkholderia mallei* ATCC23344 in culture and in mammalian hosts.** BMC Genomics, v. 7, p. 228, 2006.

ROWLAND, C. A. et al. **Protective cellular responses to *Burkholderia mallei* infection.** Microbes and Infection, v.12, n.11, p.846-853, 2010.

SAID, N. C.; NARDI JÚNIOR, G.; DOMINGUES, P. F. **Mormo em Equinos e a Biossegurança no Agronegócio.** Tekhne e Logos, Botucatu, SP, v.7, n.2, Dezembro, 2016.

SANFORD, J. P. ***Pseudomonas* species (including melioidosis and glanders).** In: MANDERLL, G. L.; BENETT, J. E.; DOLIN, R. Principles and practice of infectious diseases. 8. Ed. New York: Churchill Livingstone, p.2003-2008. 1995.

SANTOS, F. L. et al. **Mormo.** Revista Educação Continuada do CRMV-SP, v.4, n.3, p.20-30, 2001.

SARKAR-TYSON, M. et al. **Protective efficacy of heat-inactivated *B. thailandensis*, *B. mallei* or *B. pseudomallei* against experimental melioidosis and glanders.** Vaccine, v.27, n.33, p.4447-4451, 2009.

SHARRER, G. T. **The great glanders epizootic, 1861-1866: a Civil War legacy.** Agricultural History, v.69, n.1, p.79-97, 1995.

SILVA, K.P.C.; MOTA, R.A.; CUNHA, A.P.; SILVA, L.B.G.; LEAL, N.C.L.; CAVALCANTE, Y.V.N.; TELES, J.A.A.; PEREIRA, M.C.C.; FREITAS, N.S. **Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v.29, n.5, p.439-444, 2009.

SILVA, L.B.G.; SILVA NETO, J.B.; BRITO, M.F.; MAIA, F.C.L.; SILVA JÚNIOR, V.A.; MOTA, R.A. **Lesões anatomo-histopatológicas em cobaias (*Cavia porcellus*), experimentalmente infectados pela *Burkholderia mallei*.** Arquivos do Instituto Biológico, v.72, n.1, p.23-28, 2005.

SCHOLZ, H. C. et al. **Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed flip-based polymerase chain reaction assay.** Diagnostic Microbiology and Infection, v.2054, n.4, p.241-247, 2006.

SOUZA, M. M. A. **Diagnóstico do Mormo Através da Técnica de Fixação de Complemento Utilizando-se Diferentes Antígenos e Métodos de Incubação**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

SPRAGUE, L. D. et al. **Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses**. BMC Veterinary Research, v.5, n. 32, p.1-6, 2009.

SRINIVASAN, A. et al. **Glanders in a military research microbiologista**. The New England Journal of Medicine, v.345, p. 256-258, 2001.

SUPPIAH, J.; THIMMA, J.S.; CHEAH, S.H.; VADIVELU, J. **Development and evaluation of polymerase chain reaction assay to detect Burkholderia genus and to differentiate the species in clinical specimens**. Federation of European Microbiological Societies Immunology and Medical Microbiology, v.306, p.9-14, 2010.

TALMI-FRANK, D.; STRAUSS-AYALI, D.; JAFFE, C.L.; BANETH G. **Kinetics and diagnostic and prognostic potential of quantitative Western Blot analysis and antigenspecific enzyme-linked immunosorbent assay in experimental canine leishmaniasis**. Clinical and Vaccine Immunology. Oxford. v.13, n.2, p. 271–276, 2006.

THEAKSTON, R.D.G.; LLOYD-JONES, M.J.; REID, H.A. **Micro ELISA for detecting and assaying snake venom and venom antibody**. Lancet, 2: 639-641, 1977.

THIBAUT, F. M.; VALADE, E.; VIDAL, D. R. **Identification and Discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by Real-Time PCR Targeting Type III Secretion System Genes**. Journal of Clinical Microbiology, v.42, n.12, p.5871-5874, 2004.

TOMASO, H. et al. **Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting flip for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples**. Clinical Chemistry, v.52, n.2, p.307-310, 2006.

TYLER, S. D.; STRATHEDEE, C. A.; ROSEE, K. R.; JOHNSON, W. M. **Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonas on the basis of the sequencing of genes coding for 16S-23S rRNA internal transcribed spacers**. Clin. And Diag. Laborat. Immunol., v.4, n.2, p.448-453. 1995.

ULRICH, M. P. et al. **Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei***. Journal of Medical Microbiology, v.55, p.551-559, 2006a.

ULRICH, M. P. et al. **Development of a polymerase chain reaction assay for the specific identification of *Burkholderia mallei* and differentiation from *Burkholderia pseudomallei* and other closely related Burkholderiaceae**. Diagnostic Microbiology Infectious Diseases, v.55, p.37-45, 2006b.

VARGAS, R. T.; OLIVEIRA JÚNIOR, C. A.; SILVA, N. **Situação atual do mormo no Brasil**. Revista V&Z em Minas, n.127, p.43-51, 2015.

WHITLOCK, G. C. MARK ESTES, D. TORRES, A. G. **Glanders: of to the races with *Burkholderia mallei***. FEMS Microbiology Letters, v. 277, p.115-122, 2007.

WHITLOCK, G. C. et al. ***Burkholderia mallei* cellular interactios in a respiratory cell model**. Journal of Medical Microbiology, v.58, p.554-562, 2009.

WILKINSON, L. **Glanders: Medicine and Veterinary Medicine pursuit of a contagious disease.** Medical history, v.25, p.363-384, 1981.

YOUNG, E.J. **Serologic diagnosis of human brucellosis: Analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature.** Reviews of Infectious Diseases, 13: 359-372, 1991

3 ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.7 Artigo 1

Infecção natural por *Burkholderia mallei* no estado de Alagoas, estudo clínico, anatomohistopatológico, microbiológico e molecular.

Resumo: O mormo é uma enfermidade infectocontagiosa e frequentemente letal, aguda ou crônica, caracterizada por lesões respiratórias, linfáticas e cutâneas em equídeos, porém de caráter zoonótico. O diagnóstico do mormo consiste na associação dos aspectos clínico-epidemiológicos, anatomohistopatológicos, isolamento bacteriano, inoculação em animais de laboratório, reação imunoalérgica e testes sorológicos. Estudos inerentes ao acompanhamento de focos naturais do mormo auxiliam a elucidar lacunas referentes à patologia e diagnóstico da doença. Com isso, objetivou-se acompanhar os sinais clínicos de animais infectados naturalmente por *B. mallei* em diferentes propriedades de criação de equídeos, e isolar e caracterizar a bactéria causadora da doença. Foram estudados dois focos para o mormo de acordo com a ADEAL e MAPA, no estado de Alagoas. Foi feito o acompanhamento do foco e dos animais, eutanásia e necropsia dos animais positivos e coletado material para diagnóstico através de técnicas de isolamento e biologia molecular.

Palavras chave: mormo, *Burkholderia mallei*, sinais clínicos, diagnóstico.

3.7.1 Introdução

O mormo é uma enfermidade infectocontagiosa e frequentemente letal, aguda ou crônica, caracterizada por lesões respiratórias, linfáticas e cutâneas em equídeos, porém de caráter zoonótico. Tem como agente etiológico a bactéria *Burkholderia mallei* (LEOPOLDINO et al, 2009; MOTA e RIBEIRO 2016).

Devido a sua alta taxa de mortalidade em equídeos e aumento do número de surtos nos últimos pode ser considerada uma doença re-mergentes (KHAN et al., 2013).

A disseminação da bactéria ocorre principalmente por meio da contaminação de forragem, cochos e bebedouros por secreção oral e nasal. Essa disseminação ocorre de maneira esporádica, através da forma cutânea da doença, onde pode haver contato direto com ferimentos ou por utensílios usados na monta dos animais, ou através de lesões pulmonares crônicas, que se rompem nos brônquios e infectam as vias aéreas superiores e secreções orais e nasais, que representam a mais importantes vias de excreção da *B. mallei* (MOTA, 2006; RADOSTITS et al., 2010).

O diagnóstico do mormo consiste na associação dos aspectos clínico-epidemiológicos, anatomohistopatológicos, isolamento bacteriano, inoculação em animais de laboratório (prova de Strauss), reação imunoalérgica (maleinização), e testes sorológicos (NAUREEN et al, 2007; DITTMAN et al., 2015). E para testes oficiais são aceito o Teste de Fixação de Complemento (FC) ou ELISA (ensaio de imunoabsorção enzimática), como teste de triagem e o Western Blotting (WB) como confirmatório (MAPA, 2018).

Estudos inerentes ao acompanhamento de focos naturais do mormo auxiliam a elucidar lacunas referentes à patologia e diagnóstico da doença. Com isso, objetivou-se acompanhar os sinais clínicos de animais infectados naturalmente por *B. mallei* em diferentes propriedades de criação de equídeos, e isolar e caracterizar a bactéria causadora da doença.

3.7.2 Material e Métodos

3.7.2.1 Comitê de Ética da Pesquisa

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas sob a licença nº 92/2016.

3.7.2.2 Local do estudo

Foram estudados dois focos para o mormo de acordo com a Agência de Defesa e Inspeção Agropecuária de Alagoas (ADEAL) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), no estado de Alagoas, o primeiro localizado no Leste Alagoano, e o segundo localizado na região metropolitana de Maceió.

3.7.2.3 Acompanhamento do Foco e Animais Estudados

No primeiro foco (FA), foram realizadas visitas semanais durante quatro meses para acompanhamento da evolução dos sinais clínicos e colheita de material. Dentre os animais da propriedade oito eram equinos, dois asininos e um muar. Os animais eram utilizados para tração e transporte em propriedade canvieira (usina), havendo livre acesso a propriedade por outros criadores e animais.

No segundo foco (FB), foram estudados cinco animais, todos equinos, utilizados para lazer e esporte. Devido aos resultados dos testes oficiais e sintomatologia dos animais, o acompanhamento dos animais foi de apenas um mês, onde foram realizadas duas visitas.

3.7.2.4 Eutanásia e Necropsia dos Animais para Estudo Anatomopatológico

A eutanásia dos animais foi realizada pelos agentes da ADEAL, através da indução do animal à morte, utilizando método que ocasione a perda rápida e irreversível da consciência e promova analgesia total do animal, sem representar risco ou causar angústia ao operador, como preconiza a Instrução Normativa nº 6 do PNSE (MAPA, 2018). A eutanásia e destruição dos casos confirmados de mormo foram realizadas no estabelecimento onde os animais

se encontravam, de acordo com os procedimentos e métodos aprovados pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV).

3.7.2.5 Colheita e Transporte de Amostras

Para o isolamento bacteriano, foram colhidas amostras da região nasal dos equídeos positivos, na colheita foram utilizados swabs esterilizados. Ao término de cada colheita, os swabs foram identificados com o número/nome do animal, local de colheita e data. Dos animais necropsiados, foram colhidas amostras dos abscessos e fragmentos dos órgãos.

Em seguida, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Infecciosas e Patologia Veterinária da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) sob refrigeração.

3.7.2.6 Processamento das Amostras para Estudo Microbiológico

No Laboratório de Doenças Infecciosas (UFAL) os swabs foram semeados em placas de Petri, contendo Blood Ágar Base, enriquecido com 5% de sangue de ovino desfibrinado. As placas foram encubadas em estufa bacteriológica por 72 horas, na temperatura constante de 37 °C em aerobiose. As leituras ocorreram em 24, 48 e 72 horas após incubação.

No Laboratório de Patologia Veterinária (UFAL), os fragmentos de órgão foram processados por meio de técnicas histológicas, visando a preparação dos tecidos destinados ao estudo.

3.7.2.7 Caracterização Fenotípica e Molecular

Posteriormente realizou-se a leitura das placas de Petri para caracterização macroscópica, observando se havia presença de hemólise, pigmentação, tamanho, forma, elevação e consistência das colônias. Já as características microscópicas foram observadas através do método de coloração de Gram que classifica as bactérias através da cor, tamanho, forma e agrupamento.

As provas fenotípicas foram realizadas no Laboratório de Doenças Infecciosas (UFAL), onde as amostras foram submetidas às provas de Catalase, Oxidase, Indol, Produção de H₂S, Vermelho de Metila-VM, Voges

Proskauer–VP, Motilidade, Produção de Pigmento, Lisina Descarboxilase, Gás de Dglucose, Citrato, Urease e Fermentação de Carboidratos (glicose, maltose, galactose, lactose, frutose, manose, sacarose e manitol) (AL-ANI et al, 1998). Já a técnica utilizada para caracterização molecular foi a Reação em Cadeia Polimerase (PCR), realizada no Laboratório de Bacterioses da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) (amostra UFAL1).

3.7.2.8 Prova de Strauss

De acordo com Silva (2003), a secreção nasal ou conteúdo dos abscessos subcutâneos deve ser inoculado na cavidade peritoneal de cobaias (Prova de *Strauss*), observando-os por até duas semanas após inoculação.

Após a identificação fenotípica e molecular as amostras foram testadas na prova biológica de *Strauss*, onde foi inoculado em *Cavia porcellus* 0,1 mL de *B. mallei*, por via intraperitoneal. Os cobaios foram observados durante sete dias para desenvolvimento de orquite purulenta. Para cada amostra de *B. mallei* testada, foram utilizados grupos infectados e controle (inoculado 0,1 mL solução fisiológica), contendo cinco indivíduos por grupo, no total de dez animais.

3.7.2.9 Necropsia dos Cobaios e Reisolamento

Após sete dias de observação, os animais foram eutanasiados e necropsiados, por métodos recomendados, de acordo com a legislação do CONCEA e CFMV. Onde foi utilizado 0,5 mL de Tiopental 1g, como droga indutora da morte dos animais.

As amostras colhidas de esfregaços e exsudatos purulentos adquiridas na necropsia dos cobaios foram inoculadas em placas de Petri contendo Blood Ágar Base, enriquecido com 5% de sangue de ovino desfibrinado. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37° C por 48 horas, após esse período foi realizada a leitura macroscópica e microscópica. O isolamento de *B. mallei* foi confirmado por provas fenotípicas e moleculares realizadas na UFRPE (amostra UFAL2).

3.7.3 Resultados

3.7.3.1 Avaliação Clínica dos Equídeos

No FA, três animais foram inicialmente positivos e confirmados nos testes oficiais para mormo (dois equinos e um asinino), sendo isolados dos demais para posterior eutanásia. Esses animais inicialmente apresentaram discreta secreção nasal bilateral, de onde foi possível isolar e identificar a primeira amostra de *B. mallei* (Figura 1). Mas esses sintomas não eram constantes durante o período de observação, em alguns momentos sem evidência clínica de mormo (Figura 2).



Figura 1 – Coleta de secreção nasal equino positivo para mormo.



Figura 2 – Animal positivo nos testes oficiais sem sintomatologia

Durante o saneamento da propriedade, um quarto animal, que foi assintomático durante três meses, desenvolveu sintomas como, expectoração de secreção mucopurulenta e edemas de membro posterior, vindo a óbito após sete dias do início dos sintomas, permanecendo neste período até o óbito negativo na FC, e detectado como positivo no ELISA indireto.

Após quatro meses de acompanhamento da propriedade, um quinto animal foi positivo nos testes oficiais (FC e WB), porém não apresentou sintomatologia do mormo durante todo o estudo até a eutanásia (Figura 3).



Figura 3 – Equino, positivo, assintomático. Foco A (FA).

Nesta propriedade observou-se que animais do mesmo foco natural infectado pela mesma cepa de *B. mallei*, podem apresentar distintos quadros clínicos, até mesmo permanecer assintomático durante semanas e até meses. Além disso, a técnica oficial FC, apresentou nesse estudo uma janela imunológica de pouca sensibilidade para animais em início de infecção.

No FB, onde havia cinco equinos, dois foram positivos nos testes oficiais iniciais e os outros três um mês após. No FBa01 observou-se edema de membro posterior esquerdo, com presença de lesões ulceradas, linfangite disseminada, expectoração de secreção nasal serosanguinolenta bilateral (hemoptise), dispneia severa (Figura 4). O FBa02 apresentava apatia, dispnéia estertorosa, nódulos linfáticos infartados (aumentados), expectoração nasal mucopurulenta bilateral (Figura 5). Esses animais haviam sido tratado com antibiótico e anti-inflamatório pelo proprietário antes da realização do diagnóstico e identificação do foco. Os animais foram eutanasiados sem a permissão para necropsia, no entanto da secreção nasal colhida foi isolada e identificada *B. mallei* (02).



Figura 4 - Presença de lesões ulceradas e linfangite disseminada em membro posterior esquerdo,

expectoração de secreção nasal serosanguinolenta bilateral (hemoptise), dispneia severa. Foco B (FBa01)



Figura 5 – Animal com apatia, dispnéia estertorosa, nódulos linfáticos infartados (aumentados), expectoração nasal mucopurulenta bilateral. Foco B (FBa02)

Dos outros três animais, foram colhidos amostras de sangue pelos agentes da ADEAL para diagnóstico. Após um mês, esses animais, dois equinos adultos assintomáticos, foram eutanasiados e não necropsiados, e um potro (cinco meses) (FBa03), apresentava secreção purulenta bilateral e dispneia, esse foi eutanasiado e necropsiado.

3.7.3.2. Eutanásia e Necropsia dos Animais

Durante a necropsia no FA, dos três animais inicialmente positivos nos testes oficiais, foram observados piogranulomas no pulmão (Figura 6), em linfonodos de cabeça e pescoço de apenas um dos animais, de onde foi possível isolado e caracterizado a primeira amostra de *B. malle* (01), além da histopatologia caracterizando os piogranulomas. Os outros dois animais não apresentaram achados de necropsia.



Figura 6 – Seta evidenciando presença de piogranuloma em pulmão.

No FB, só foi possível realizar necropsia em um dos animais (FBa03), este apresentava secreção purulenta bilateral e dispneia, durante a necropsia observou-se piogranulomas no pulmão (Figura 7), linfonodos submandibulares e fígado. Destas lesões foram isolados e identificados *B. mallei* (03).



Figura 7 – Necropsia animal FBa03, presença de piogranuloma no pulmão

3.7.3.3 Caracterização Fenotípica e Molecular

No isolamento bacteriano foi possível observar macroscopicamente colônias diminutas, planas, mucoides, brilhantes, transparentes e não hemolíticas (Figura 8). Na microscopia foram observados bacilos gram-negativos, imóveis e com 0,5 mm de espessura, sugestivos de *B. mallei*.

Já as duas amostras encaminhadas para o laboratório da UFRPE, para caracterização molecular por PCR e sequenciamento, foram nomeadas de UFAL1 e UFAL2. Onde a amostra UFAL1 foi positiva apenas na PCR para gênero e não foi possível realizar o sequenciamento. Na amostra UFAL2, foi positiva na PCR de gênero e espécie, e obtivemos uma similaridade de 100% com *Burkholderia mallei* cepa Turkey 10 no sequenciamento.



Figura 8 - Análise Macroscópica da Bactéria *B. mallei*. Presença de colônia puntiforme, translúcida, não hemolítica, sem pigmentação.

3.7.3.4 Prova de Strauss

As amostras de *B. mallei* (01 e 02), foram positivas na Prova de *Strauss*. Os sinais clínicos observados nos cobaios foram edema testicular, hiperemia testicular, dispneia, diminuição testicular e consistência firme dos testículos (Figura 9). E os achados de necropsia foram orquite purulenta bilateral, abscesso testicular, enterite hemorrágica, eplnomegalia, cordão espermático hemorrágico, edema testicular e pulmões congestionados (Figura 10). E foi possível reisolar a bactéria dos achados de necropsia de todos os cobaios.



Figura 9 – Prova de Strauss positiva: Orquite



Figura 10 – Necropsia dos cobaios, presença de congestão em pulmão.

3.7.4 Discussão

De acordo com Dittmann et al. (2015), a maioria dos equinos positivos para *B. mallei* não apresentam sinais clínicos no momento do diagnóstico. Porém, naqueles em que a evolução da doença não foi interrompida pela eutanásia, os sinais clínicos característicos da forma crônica da enfermidade puderam ser observados. Esses sinais principalmente incluem febre, anorexia, dispneia inspiratória, tosse e secreção nasal catarro purulenta, podendo ter presença de sangue, úlceras nos cornetos e no septo nasal, aumento de tamanho dos linfonodos e linfagite granulomatosa que confere a pele um aspecto de rosário. Os sinais clínicos e achados macroscópicos observados nesse caso corroboram com o descrito na literatura veterinária por Mota et al. (2006) que relata que em suas leituras macroscópicas e microscópicas observou bactérias com as mesmas características, posteriormente confirmadas como *B. mallei*.

Os sintomas respiratórios como secreção nasal purulenta acompanhada ou não de estrias de sangue, dispneia e úlceras na mucosa nasal, e os sintomas linfáticos como hipertrofia dos linfonodos submadibulares e nódulos fechados ou fistulados na trajetória dos vasos linfáticos em equídeos adultos procedentes de regiões endêmicas para mormo, associados à alta letalidade em animais previamente tratados com antibióticos sem sucesso terapêutico, são indicativos para a suspeita de mormo (MOTA et al. 2000)

De acordo com MAPA (2018), Potros com idade inferior a 6 (seis) meses de idade, filhos de éguas positivas para mormo deverão ser examinados clinicamente e, caso não apresentem sintomas de mormo, devem ser mantidos

isolados e submetidos a testes sorológicos ao completarem 6 (seis) meses de vida.

Segundo Tyler et al. (1995), a aplicação de métodos baseados em biologia molecular apresenta significativo impacto no diagnóstico, especialmente na caracterização molecular de amostras de *B. mallei*, utilizando métodos de tipagem.

De acordo com Silva (2003), os cobaios inoculados poderão apresentar aumento do volume testicular e sinais de septicemia 24 a 48 horas após a inoculação ou abscesso no ponto de inoculação aproximadamente três a cinco dias após. À necropsia observam-se lesões abscedativas em diferentes órgãos de onde coleta-se material para isolamento e identificação bacteriana.

3.7.5 Conclusão

O mormo é uma doença infectocontagiosa de grande importância para saúde animal e humana, devido ao seu caráter zoonótico. Naturalmente não existe um padrão clínico para o diagnóstico do mormo, animais infectados com a mesma cepa de *B. mallei*, podem desenvolver um quadro infeccioso distinto, apenas detectando a infecção precocemente por meio de teste imunológico de elevada sensibilidade. Nos casos de animais assintomáticos e positivos nos testes oficiais, é fundamental a realização de diagnóstico anatomopatológico, microbiológico e molecular confirmatório, dando suporte aos testes oficiais.

Referências Bibliográficas

- Dittmann, L. R. et al.. **Aspectos clínico-patológicos do mormo em equinos: revisão de literatura**. Alm. Med. Vet. Zoo, 2015.
- Khan, I. et al. **Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures**. Transbound Emerg Dis. 2013; 60: 2004 – 21.
- Leopoldino, D. C. C. et al. **Mormo em equinos**. Rev. Cient. Eletron. Med. Vet. 2009; 12.
- MAPA, 2018. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em 30 de abril de 2018.
- Mota, R. A. **Aspectos etiopatológicos, epidemiológicos e clínicos do mormo**. Vet. e Zootec. V. 13, n. 2, p. 117-124. 2006.
- Naureen, A. et al. **Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests**

for diagnosis of equine glanders. Journal of veterinary diagnostic investigation, v. 19, n. 4, p. 362-367, 2007.

Radostits, O. M. et al. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2010.

Mota, R. A; Ribeiro, M. G. Mormo. In: Megid, J.; Ribeiro, M. G.; Paes, A. C. (Eds). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia.** 1. Ed. Rio de Janeiro: roca, 2016. p 423 – 435.

Silva, L. B. G. 2003. **Diagnóstico microbiológico do mormo em equídeos e infecção experimental em cobaios (*Cavia porcellus*) pela *Burkholderia mallei*: aspectos clínicos e anátomo-histopatológico.** 2003. Tese de Doutorado em Ciências Animais. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

3.8 Artigo 2

Pesquisa Veterinária Brasileira



Avaliação Imunológica de Equídeos Naturalmente Infectados por *Burkholderia mallei*

Journal:	<i>Pesquisa Veterinária Brasileira</i>
Manuscript ID:	PVB-6135
Manuscript Type:	Topic of General Interest
Date Submitted by the Author:	18-Sep-2018
Complete List of Authors:	Rocha, Larissa; Universidade Federal de Alagoas, Unidade Educacional Viçosa Silva, Karla Patrícia; Universidade Federal de Alagoas, Unidade Educacional Viçosa Araújo, Dayane Kelly; Universidade Federal de Alagoas, Unidade Educacional Viçosa Lima, Luiz André; Agência de Defesa Agropecuária de Alagoas Lages, Sonia Luisa; Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento de Alagoas Silva Júnior, Luiz Cosme da; Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária Castro, Roberto; Universidade Federal Rural de Pernambuco, Mota, Rinaldo; UFRPE, Medicina Veterinária
Area:	Livestock Diseases
Keyword:	Animals de Produção/Livestock Diseases, Doenças Infecciosas/Equinos, Diagnóstico/Mormo

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>

Avaliação Imunológica de Equídeos Naturalmente Infectados por *Burkholderia mallei*

Larissa O. da Rocha¹; Karla P. C. da Silva²; Dayane K. G. O. Araújo²; Luíz André R. Lima³; Sônia L. S. Lages⁴; Luiz C. Silva Júnior⁵; Roberto S. Castro⁵; Rinaldo A. Mota⁵

ABSTRACT.- Rocha, L. O.; Silva, K. P. C.; Araújo, D. K. G. O.; Lima, L. A. R.; Lages, S. L. S.; Silva Júnior, L. C.; Castro, R.S.; Mota, R. A. [Immunological Evaluation of Equidae Naturally Infected by *Burkholderia mallei*.] Avaliação Imunológica de Equídeos Naturalmente Infectados por *Burkholderia mallei*. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):000-000. Laboratório de Doenças Infecciosas, Unidade Educacional Viçosa, Universidade Federal de Alagoas, Faz. São Luiz s/nº, Viçosa, AL 57000-160, Brasil. E-mail: larissarocha_medvet@yahoo.com.br

Glanders is an infectious and often lethal disease that mainly affects equidae, but can also affect humans and other animal species. The diagnosis of the disease consists of the association of clinical-epidemiological, anatomical-histopathological aspects, bacterial isolation, biological test and immunological tests such as complement fixation (FC), ELISA and WB. FC is based on the detection of specific antibodies against *B. mallei*, in which they can be observed one week post infection. The ELISA has higher results than the FC in which it is not influenced by the complement activity. There are currently some gaps regarding the pattern of immunological response of the equines in different phases of infection during the natural development of the disease. The objective of this study was to evaluate the immunological response in equine animals naturally infected with *B. mallei* in a farm in the state of Alagoas. Eleven samples of equids naturally infected with *B. mallei* were collected. Of these, 54.54% were positive in the two ELISAI tests, in different periods of infection. And 45.46% were negative. ELISAI is a test used to detect glanders in equines at different stages of infection, since it is a new technique with more purified antigens, obtaining reliable results

INDEX TERMS: Equine, glanders, ELISA, diagnosis

¹Laboratório de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Faz. São Luiz s/nº, Viçosa, AL 57000-160, Brasil. *Autor para correspondência: larissarocha_medvet@yahoo.com.br

² Laboratório de Doenças Infecciosas, Universidade Federal de Alagoas (UFAL), Faz. São Luiz s/nº, Viçosa, AL 57000-160, Brasil.

³ Agência de Defesa Agropecuária de Alagoas (ADEAL), Av. Comendador Leão, nº720, Maceió, AL 57025-000, Brasil

⁴ Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento de Alagoas (MAPA/AL), Av. Ferneendes Lima, nº72, Maceió, AL 57050-900.

⁵ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manuel de Medeiros s/nº, Recife, PE 52171-900 – Dois Irmãos, Brasil.

RESUMO. - O mormo é uma enfermidade infectocontagiosa e frequentemente letal que acomete principalmente os equídeos, mas também pode acometer os humanos e outras espécies animais. O diagnóstico da doença consiste na associação dos aspectos clínico-epidemiológicos, anátomo-histopatológicos, isolamento bacteriano, prova biológica e testes imunológicos como a Fixação de Complemento (FC), ELISA e WB. O FC se baseia na detecção de anticorpos específicos contra *B. mallei*, no qual podem ser observados uma semana pós infecção. O ELISA apresenta resultados superiores aos da FC no qual não sofre influência da atividade do complemento. Atualmente existem algumas lacunas referentes ao padrão de resposta imunológica dos equídeos em diferentes fases de infecção durante o quadro natural de desenvolvimento da doença. Objetivou-se avaliar a resposta imunológica em equídeos naturalmente infectados por *B. mallei* em uma propriedade foco no estado de Alagoas. Foram colhidas 11 amostras de equídeos naturalmente infectados por *B. mallei*. Destes, 54,54% foram positivos nos dois testes ELISAI, em diferentes períodos de infecção. E 45,46% foram negativos. O ELISAI é um teste indicado para detectar mormo em equídeos em diferentes fases de infecção, por ser uma técnica nova com antígenos mais purificados, obtendo resultados fidedignos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Equídeos, mormo, ELISA, diagnóstico

INTRODUÇÃO

O mormo é uma enfermidade infectocontagiosa e frequentemente letal que acomete principalmente os equídeos, mas também pode acometer os humanos e outras espécies animais. Tem como agente etiológico a bactéria *Burkholderia mallei*, que é um bacilo gram-negativo não esporulado, imóvel e aeróbio. (MOTA, 2006; MEGID et al., 2016). É transmitida principalmente pelos solípedes infectados com descarga nasal purulenta, pelos alimentos e água contaminados (SILVA, 2014).

Nos últimos anos, foi evidenciado no Brasil, um aumento no número de casos de mormo em equinos. Atualmente, a doença que antes era restrita mais à região norte e nordeste do país, é identificada também nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, abrangendo grande parte do país (WAHIS, 2016). O mormo é considerado uma das mais graves ameaças à equídeocultura brasileira, pois sua notificação submete o Brasil a uma série de restrições referentes à exportação de animais vivos ou de carne. No país, a doença pertence à lista de enfermidades passivas das ações de defesa sanitária, de sacrifício obrigatório, sem indenização e faz parte do Plano Nacional de Sanidade de Eqüdeos (PNSE) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (MOTA, 2006; VARGAS et al., 2015; MEGID et al., 2016)

Segundo Moraes (2011), o diagnóstico da doença consiste na associação dos aspectos clínico-epidemiológicos, anátomo-histopatológicos, isolamento bacteriano, prova biológica (inoculação em animais de laboratório) e testes imunológicos como a Fixação de Complemento (FC), *Western Blotting* (WB) e Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), sendo os oficiais pelo MAPA, o FC ou ELISA, como teste de triagem, e WB, como confirmatório.

Segundo Mota (2006), o FC se baseia na detecção de anticorpos específicos contra *B. mallei*, no qual podem ser observados uma semana pós infecção, entretanto, de acordo com alguns estudos, entre 4 e 12 semanas seria o melhor período para realização do exame. Eventualmente, resultados falso-negativos podem aparecer em soro de animais jovens, gestantes e idosos mesmo o FC apresentando uma sensibilidade de 90% a 95%. Já os resultados falso-positivos, são observados em aproximadamente 1% dos soros testados onde atribui-se ao uso de antígeno composto por células inteiras (TELES, 2012).

O ELISA tem sido largamente empregado no diagnóstico de diferentes patologias, apresentando alta sensibilidade e especificidade, além de boa reprodutibilidade. Por detectar anticorpos nos estágios iniciais da doença, ele também pode ser utilizado para o diagnóstico. Ele apresenta resultados superiores aos da Fixação de Complemento no qual não sofre influência da atividade do complemento (MOTA, 2006).

Atualmente existem algumas lacunas referentes ao padrão de resposta imunológica dos equídeos em diferentes fases de infecção durante o quadro natural de desenvolvimento da doença. Havendo a necessidade de esclarecer essas dúvidas que por vezes podem comprometer a confiabilidade das técnicas de diagnóstico, além de avaliar técnicas de maior sensibilidade e especificidade para aplicação do diagnóstico oficial do mormo, objetivou-se avaliar a resposta imunológica em equídeos naturalmente infectados por *B. mallei* em uma propriedade foco no estado de Alagoas.

MATERIAL E MÉTODOS

Local da realização do experimento. A coleta das amostras foi realizada em uma propriedade localizada na cidade de São Luiz do Quitunde, Região Leste do Estado de Alagoas. A pesquisa foi realizada no Laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de Alagoas (UFAL) em parceria com o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) durante um período de um ano.

Amostras. As amostras foram colhidas de 11 equídeos naturalmente infectados por *B. mallei*, proveniente de uma propriedade considerada foco para mormo pela Agência de Defesa Agropecuária e Inspeção Agropecuária de Estado (ADEAL) e MAPA. Foram colhidas 99 amostras sanguíneas, em diferentes etapas com intervalo de aproximadamente 10 dias entre cada coleta, no total de nove coletas, após a confirmação dos primeiros animais positivos nos testes oficiais realizados pela ADEAL. Estas amostras foram obtidas através da venopunção asséptica da jugular utilizando tubos de plásticos e agulhas individuais do tipo Vacutainer®, de cada animal foi colhido 4 ml.

Processamento das Amostras. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas para o laboratório de Doenças Infecciosas da UFAL para extração do soro. O soro foi extraído por centrifugação, em centrífuga de ângulo fixo para tubos de 15 ml, durante 10 minutos. . Em seguida, o soro obtido foi passado para tubos do tipo eppendorf, por meio do uso de micropipeta de volume variável PEGUET®, identificados

devidamente e congelados a -20°C e, em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, enviados para processamento ao Laboratório de Virologia da UFRPE. As amostras foram utilizadas para detecção de anticorpos anti-*B. mallei*, utilizando-se os testes de diagnóstico ELISA indireto (ELISAI).

ELISA. A pesquisa foi desenvolvida em parceria com o Laboratório de Virologia da UFRPE. A avaliação da curva de resposta imunológica contra a infecção por *B. mallei* foi realizada em dois testes de ELISA indireto, com dois antígenos diferentes, antígeno um (A1), apresentando 99% de sensibilidade e 98,5% de especificidade, com ponto de corte de 35 partes de positividade (pp), e antígeno dois (A2), com 99% de sensibilidade e 99,9% de especificidade e com ponto de corte de 15pp. Todos os animais foram confirmados como positivos ou negativos no WB, teste de referência confirmatório para o diagnóstico do mormo.

RESULTADOS

Dos 11 animais estudados, seis (6/11) foram positivos nos testes, onde no teste A1, a titulação teve variação de 42 a 99pp (gráfico 1), e no teste A2, variou de 15 a 91 pp (gráfico 2). Demonstrando que em diferentes períodos de infecção, os animais apresentaram-se sempre positivos, mesmo variando de titulação. Os cinco animais negativos (5/11), obtiveram uma variação mínima de titulação durante todo período de coleta, no A1 a titulação variou de 11 a 34pp, e no A2 a variação foi de 7 a 12pp.

Dos seis animais positivos no ELISAI, desde a primeira coleta, apenas três já eram conhecidos por serem positivos nos testes oficiais, FC e WB, e foram isolados dos demais para acompanhamento experimental e posterior eutanásia, permanecendo durante todo período de experimentação reagentes em ambos os testes de ELISAI (E1, E2 e E3).

No entanto, os outros três animais que foram negativos no teste oficial de triagem, FC, mas reagentes desde a primeira colheita experimental nos dois testes de ELISAI. Dos três animais, dois passaram a serem reagentes no teste de triagem FC (E4 e E5), 90 dias após a primeira colheita do experimento, apresentando titulações de 42 a 74pp (A1) e de 18 a 40pp (A2), e o terceiro animal (E6), após sete meses do fim do estudo, foi inconclusivo no FC, tendo titulação no ELISAI de 45 a 70pp (A1) e no 15 a 18pp (A2).

Os testes de ELISAI foram de maior sensibilidade para detectar animais verdadeiramente positivos no início da infecção. Esses animais permaneceram sem sintomatologia de mormo durante o experimento (E1, E2, E3, E4, E6), entretanto um foi a óbito subitamente (E5). Os cinco animais negativos no ELISAI, durante o experimento, permaneceram também negativos nos testes oficiais, sendo o ELISAI um teste eficiente também na detecção de animais verdadeiros negativos.

DISCUSSÃO

O teste de FC é confiável em populações com baixa prevalência de mormo, sendo o mesmo considerado o teste de eleição para confirmar os verdadeiros negativos, ou seja, a ausência de infecção por *B. mallei* (SPRAGUE et al. 2009). No entanto, de acordo com os resultados encontrados no estudo, onde mais de 50% dos animais da propriedade foram positivos no ELISAI, demonstra que a região estudada tem uma alta prevalência para a doença, demonstrando o ELISA como teste de eleição para triagem, possibilitando detectar precocemente os animais no início da infecção.

Por ser uma técnica desafiadora, o teste de FC necessita de um intenso controle de suas variáveis, como o complemento, o antígeno e seus diluentes, além de possuir um custo elevado e a necessidade de pessoal capacitado e treinamento para realizá-lo. (POESTER et al, 2010; SILVA et al., 2013). Devido a estas variáveis, havia uma preocupação com a metodologia utilizada para diagnosticar a doença, além do retorno do resultado dos exames e documento obrigatório para o trânsito de animais. Essa insegurança trouxe uma problemática a cerca da confiabilidade dos resultados, gerando questionamentos por parte dos criadores, já que resultados positivos obrigam a eutanásia dos animais e interdição da propriedade, gerando grandes prejuízos financeiros. Para fazer frente a este problema do diagnóstico, foi publicada uma portaria (Portaria nº35) pelo MAPA que valida e adota a utilização da técnica Elisa como teste oficial para o diagnóstico do Mormo Equino no país (MAPA, 2018).

Segundo Tizard (2002), o ELISA trata-se de um teste que mede a interação entre antígeno e o anticorpo, não dependendo de um segundo fenômeno como precipitação, aglutinação ou fixação do complemento. O ELISAI é bastante utilizado com a finalidade de identificar, inclusive quantificar anticorpos em amostras de soro, recebendo destaque especial quando se trata de estudos soropidemiológicos (MADRUGA et al., 2001).

Existe uma boa similaridade dos resultados da aplicação do ELISA comparada ao FC, ainda que esse possua alta sensibilidade e boa especificidade, baseado na detecção de anticorpos específicos contra *B. mallei*, os quais podem ser observados uma semana após a infecção. Estudos comprovam que o melhor período para realizar os exames é de quatro a 12 semanas após infecção, podendo o FC apresentar reações falso-negativas ocasionalmente observadas em animais jovens, gestantes ou idosos, além de reações falso-positivas em soros testados ao utilizar antígeno de células inteiras (CRAVITZ e MILLER, 1950; VERMA et al. 1990; MOTA et al., 2006; RADOSTITS et al., 2010; MORAES, 2011; FALCÃO et al., 2013). Já o ELISA possui a capacidade de detectar quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, tendo uma elevada precisão (TELES, 2012).

Todos os equídeos, independente da idade, são susceptíveis a doença, porém os mais acometidos são animais idosos, debilitados e submetidos a estresse, em virtude de trabalho excessivo, má alimentação e habitação em ambiente com condições sanitárias inadequadas (MOTA, 2000; RADOSTITS et al., 2010). Essa análise corrobora com a situação da propriedade estudada, onde os animais eram utilizados para tração e transporte, viviam em condições sanitárias inapropriadas, onde não havia separação dos fômites utilizados nos animais infectados confirmados e os negativos, e alimentação precária, favorecendo o desenvolvimento da doença.

CONCLUSÃO

Os animais infectados, independente da fase da doença, não apresentaram variação de titulação que comprometa a identificação dos verdadeiros positivos. Sendo o ELISA um teste indicado para detectar mormo em equídeos em diferentes fases de infecção, como prova de triagem de diagnóstico, por ser uma técnica nova com antígenos mais purificados, obtendo resultados fidedignos, uma vez que não existe atualmente nenhum tratamento eficaz para a doença e a eutanásia e controle dos focos dependem dos testes de diagnóstico oficiais.

REFERÊNCIAS

- Cravitz, L.; Miller, W. R. 1950. Immunologic studies with *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei* I: Serological relationships between *M. mallei* and *M. pseudomallei*. J. Infect. Dis., 86:46-51.
- Falcão, M. V. D.; Santana, V. L. A.; Vasconcelos, C. M.; Leão E Silva, C. M. S.; Souza, M. M. A.; Silva, L. E. et Al. 2013. Padronização de Western Blotting para Diagnóstico do Mormo (*Burkholderia mallei*) em equídeos. In: Anais do XIII Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão; 2013. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- Madruga, C. R.; Araújo, F. R.; Soares, C. O. **Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária**. 360p. EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande – MS, 2001.
- Megid, J., 2016. Ribeiro, M. G., Paes, A. C. Doença Infeciosas em Animais de Produção e de Companhia. 1. Ed. Roca: Rio de Janeiro.
- Moraes, D. D. A. Prevalência de Mormo e Anemia Infeciosa Equina em Equídeos de Tração do Distrito Federal. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 85 p. Dissertação de Mestrado. 2011.
- MOTA, R. A. et al. 2000. Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 20, n. 4, p. 155 – 159.
- MOTA, R. A. 2006. Aspectos etiopatológicos, epidemiológicos e clínicos do mormo. Veterinária e Zootecnia v. 13, n.2, p.117-124.
- OIE-WAHIS. 2016. In World Animal Health Information System of OIE 2016. <http://www.oie.int>. Acessado em 30 de agosto de 2018.
- Poester, F.P.; Nielsen, K.; Samartino, L.E.; YU, W.L. 2010. Diagnosis of Brucellosis. The Open Veterinary Science Journal, 4, 46-60 - 1874-3188/10. Bentham Open.
- Radostits, O. M. Et al. 2010. Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737p.
- Silva, C. M. S. L. 2014. Avaliação da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e ELISA indireto para o Diagnóstico do Mormo. Mestrado em Ciência Animal Tropical. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE.
- Silva, C. M. S. L.; Santana, V. L. A.; Souza, M. M. A.; Silva, D. M. F.; Falcão, M. V. D.; Vasconcelos, C. M.; Gomes, M. A. 2013. Avaliação do ELISA Indireto para o Diagnóstico da *Burkholderia mallei* (Mormo). XIII Jornada de Ensino, Pesquisa E Extensão – JEPEX 2013 – UFRPE: Recife.

- Sprague, L. D. et al. 2009. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. *BMC Veterinary Research*, v.5, n. 32, p1-6.
- Teles, J. A. A. 2012. Desenvolvimento e avaliação de um teste Elisa indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Morfologia Animal, Recife.
- Tizar, I. R. 2002. *Imunologia Veterinária. Uma Introdução*. 6. Ed. Roca, São Paulo – SP.
- Vargas, R. T.; Oliveira Júnior, C. A.; Silva, N. 2015. Situação atual do mormo no Brasil. *Revista V&Z em Minas*, n. 127, p. 43 – 51.
- Verma, R. D.; Sharma, J. K.; Venkateswaran, K. S.; Batra, H. V. 1990. Development of an avidin-biotin dot enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with other serological tests for diagnosis of glanders in equines. *Vet Microbiol.*, 25 77-85 77. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.

Legendas das Figuras

- Fig.1. Gráfico demonstrando a resposta imunológica dos animais positivos no ELISAi A1 (35pp)
- Fig.2. Gráfico demonstrando a resposta imunológica dos animais positivos no ELISAi A2 (15pp)
- Fig.3. Gráfico demonstrando a resposta imunológica dos animais negativos no ELISAi A1 (35pp).
- Fig.4. Gráfico demonstrando a resposta imunológica dos animais negativos no ELISAi A2 (15pp).

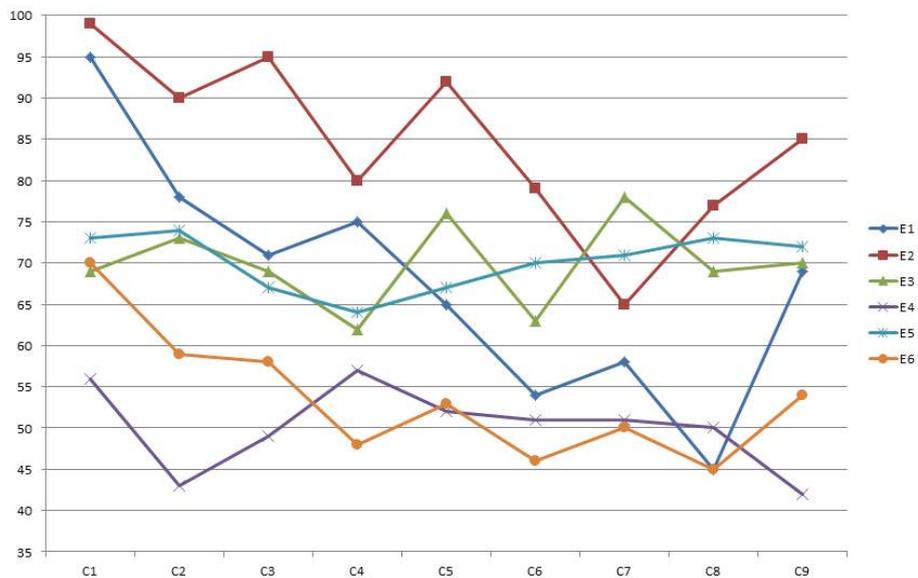


Fig.1. Gráfico demonstrando a resposta imunológica dos animais positivos no ELISAi A1 (35pp).
*C: Coletas; *E: equinos

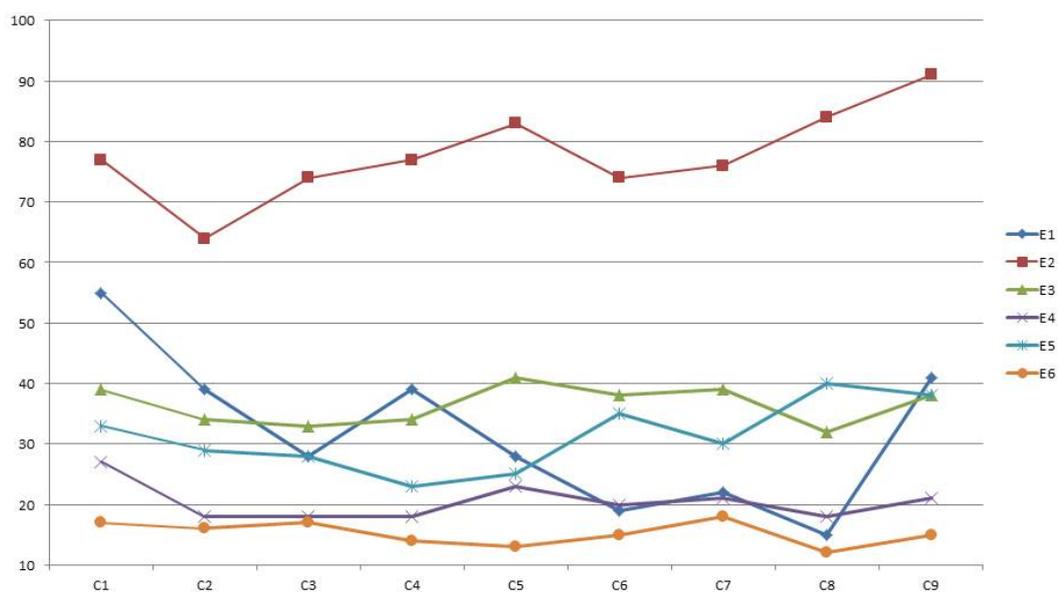


Fig.2. Gráfico demonstrando a resposta imunológica dos animais positivos no ELISAI A2 (ponto de corte: 15pp). * C: Coletas; *E: equinos.

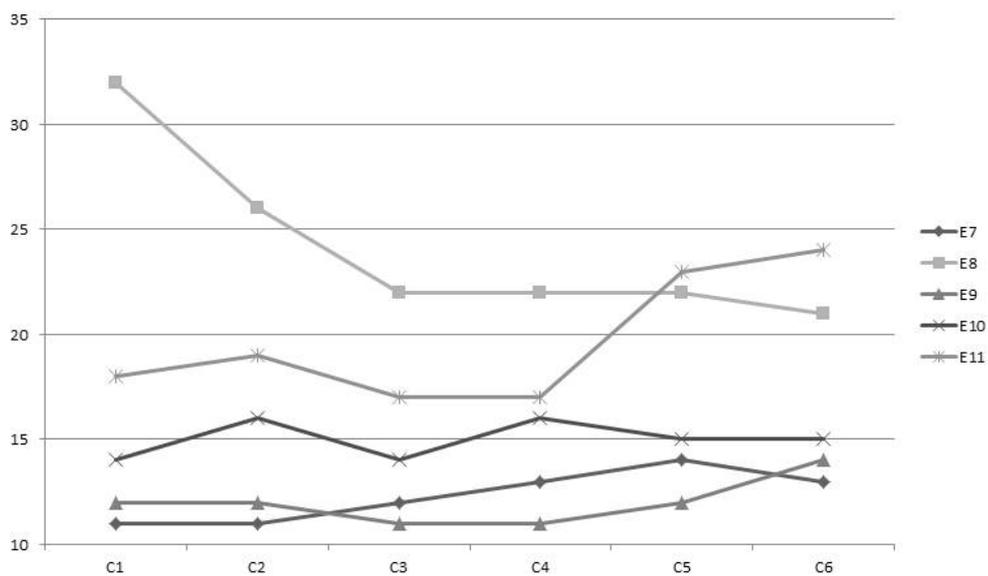


Fig.3. Gráfico demonstrando a resposta imunológica dos animais negativos no ELISAI A1 (ponto de corte: 35pp). *C: Coletas; *E: equinos.

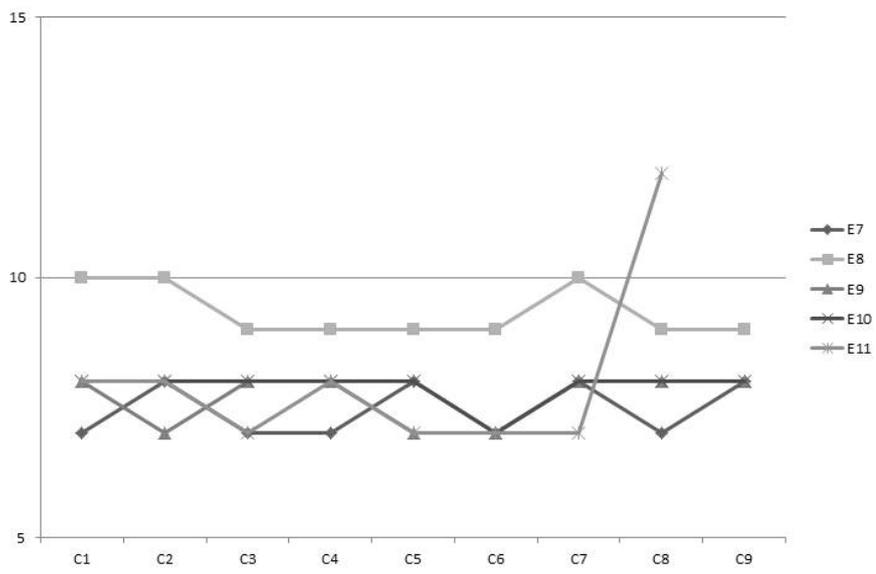


Fig.4. Gráfico demonstrando a imunológica dos animais negativos no ELISAI A2 (ponto de corte: 15pp).
 *C: Coletas; *E: equinos

4. CONCLUSÃO

O mormo é uma doença infectocontagiosa de grande importância para saúde animal e humana, devido o seu caráter zoonótico. Sendo de fundamental importância a vigilância ativa dos animais, controle das barreiras sanitárias e epidemiologia constante por meio dos órgãos de defesa animal oficiais, para que seja feito um monitoramento e identificação das áreas foco, eutanásia dos animais infectados e interdição das propriedades.

Naturalmente não existe um padrão clínico para o diagnóstico do mormo, animais infectados com a mesma cepa de *B. mallei*, podem desenvolver um quadro infeccioso distinto, apenas detectando a infecção precocemente por meio de teste imunológico de elevada sensibilidade. Nos casos de animais assintomáticos e positivos nos testes oficiais, é fundamental a realização de diagnóstico anatomopatológico, microbiológico e molecular confirmatório, dando suporte aos testes oficiais. E cabe aos profissionais da área (Médicos Veterinários), juntamente com os órgãos oficiais, conscientizar a população e criadores de equinos para a biossegurança da equideocultura, visando minimizar os impactos na saúde animal e humana.

5. COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

* 2ª Via

Certificamos que a proposta intitulada “Infecção por *Burkholderia mallei* em humanos, cobaias (*Cavia porcellus*) e Equídeos: avaliação da resposta imune humoral e da transmissão genital nos animais machos”, registrada com o nº 92/2016, sob a responsabilidade da pesquisadora **Profa. Dra. Karla Patrícia Chaves da Silva**, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), **para fins de pesquisa científica** encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alagoas (CEUA/UFAL), em reunião de 10.2.2017.

Vigência da autorização	27.02.2017 a 27.02.2018
Espécie/linhagem/raça	Cobaia / <i>Cavia porcellus</i> Equídeo/ <i>Equus caballus</i>
Nº de animais	Cobaia: 10; Equídeo: 10
Peso/idade	Cobaia: 1Kg; Equídeo: 400 Kg
Sexo	Machos
Origem/Local de manutenção	Casas de venda de animais de companhia “Pet Shop” e Propriedades rurais de criação de equídeos /Biotério de Experimentação Animal da Unidade Educacional de Viçosa - UFAL
Colaboradores	Larissa O. da Rocha; Dayane K. G. de O. Araujo; Claudijane de C. Matos; Maria N. S. Ferreira; Anderson S. de Oliveira.

Maceió, 12 de setembro de 2018

Elvan Nascimento dos Santos Filho

Coordenador da CEUA

SIAPE 1756479

*Revogada 1ª via do parecer emitido em 22/02/2017 e aprovado na reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais em 10/02/2017.