

JOSÉ ANDREEY ALMEIDA TELES

Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos

Recife – PE
2012

JOSÉ ANDREEY ALMEIDA TELES

Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Aprovada em: 11 de fevereiro de 2012

Banca examinadora

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Prof^a. Dr^a. Karla Patrícia Chaves da Silva
Universidade Federal de Alagoas – UFAL

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

Recife – PE
2012

Ficha Catalográfica

T269d Teles, José Andreey Almeida
Desenvolvimento e avaliação de um teste Elisa indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em eqüídeos / José Andreey Almeida Teles. -- Recife, 2012.
62 f. : il.

Orientador (a): Rinaldo Aparecido Mota.
Dissertação (Mestrado em Biociência Animal) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia Animal, Recife, 2012.
Referências.

1. Biotecnologia 2. Burkholderia mallei 3. Sorologia 4. Elisa
5. Diagnóstico I. Mota, Rinaldo Aparecido, Orientador II. Título

CDD 636.089

JOSÉ ANDREEY ALMEIDA TELES

Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Orientador:
Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Recife – PE
2012

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos, esposa e filho.

Jailton Teles e Sandra Teles exemplo de seriedade, justiça, humildade, respeito ao próximo.

Andrezza Teles, Ananda Teles e Andreevyd Teles pessoas importantes e exemplo de esforço e fé no futuro.

Savanna Teles e João Pedro Teles. Esposa e filho... é preciso dizer algo mais? – Somos uma família.

AGRADECIMENTOS

Ao nosso bom Deus pai criador de todas as coisas, Jesus Cristo irmão maior e aos espíritos de luz e de paz que me permitiram resistir às adversidades, dando-me forças, energia e persistência ao longo desta caminhada;

Aos meus pais (Sandra Maria de Almeida Teles e José Jailton Teles) e irmãos (Andrezza Almeida Teles, Ananda Almeida Teles e Andreevyd Almeida Teles) pela força, apoio, credibilidade e amizade. A minha amada esposa Savanna Simões Siqueira Teles pela compreensão e esforço em manter-se só enquanto eu viajava e ao nosso filhão João Pedro Siqueira Teles o qual é um presente de valor e de importância incalculáveis. Amo todos vocês;

Ao professor orientador Rinaldo Aparecido Mota pela competência, pelo auxílio na construção do conhecimento, por acreditar na realização dessa pesquisa, pela hospedagem concedida algumas vezes, pela flexibilidade e compreensão nos momentos difíceis. Obrigado pelos alertas de escrita, de pesquisa, de conduta enquanto aluno de mestrado – isso definirá o profissional do futuro! Foram muito importantes as dicas profissionais, isso é o diferencial. Muito obrigado.

Ao professor Roberto Soares de Castro pelas dicas, ensinamentos profissionais e éticos, bem como pelo incentivo durante essa pesquisa e por estar sempre à disposição;

Ao professor Lêucio Câmara Alves pela disponibilização dos equipamentos que foram de grande importância na realização dessa pesquisa, assim como pela vontade de ajudar, deixando o laboratório sempre à disposição;

Aos professores Leonildo Bento Galiza da Silva (grande Léo), Andrea Alice da Fonseca Oliveira, José Wilton Pinheiro Júnior (Júnior Galego), pela atenção dispensada frente às consultas técnicas feitas eventualmente e pela participação dos dois primeiros na minha banca de qualificação;

Ao companheiro e amigo Edisio Oliveira Azevedo pelo apoio e força constantemente prestados, assim como pelos ensinamentos (esses são de valor incalculável);

A Ana Cláudia Campos (minha amiga Dr^a. Ana), Sérgio Santos (Serginho), José Cosme, Karin Fontes, Luciana Coutinho, Camila (Camilinha) e outros que fazem o laboratório de viroses (famoso LAVIAN) da UFRPE pela disposição em ajudar sempre;

Ao grande Carlos Magno de Medeiros Moraes por me conceder hospedagem, pela amizade, confiança e por ser um cara arretado que luta em prol dos companheiros mais necessitados sempre na perspectiva de ajudá-los;

A Msc. Elizete de Oliveira, Dr^a. Vânia Lúcia de Assis Santana e Dr^a Marcília Maria Alves de Souza do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pela boa vontade em ajudar fornecendo material biológico para controle do processo a ser desenvolvido. A atenção e disposição de vocês foram essenciais. Obrigado.

Ao companheiro de algumas horas Judas Tadeu do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento pelas conversas esporádicas de corredor e pela força que me dava sempre que tratávamos da pós-graduação. Valeu graaaaande Tadeu.

Aos queridos colegas do Cesmac (Giulliano Aires, Sílvio Abreu, Mauro Guilherme, Cláudia Alessandra, Haldson Tabosa, Francètte Moura) que flexibilizaram horários, concederam dispensa ao compreenderem a necessidade de ausentar-me e, portanto, acabaram por contribuir direta e/ou indiretamente com a realização desse trabalho. Especialmente aos que dispunham um momento de conversa e ensinamento pessoal e profissional. “*Os agradecimentos são importantes Andreey*” – Giulliano Aires. Valeu!

Obrigado aos Técnicos de Laboratório do Curso de Medicina Veterinária do Cesmac, Josenildo Francisco da Silva e Rubimary Morgana Marques pela

compreensão e nos momentos em que precisei me ausentar para a realização desse trabalho.

Aos companheiros Roberto Rômulo Ferreira da Silva (Rob Jóia), Francisco Feliciano da Silva Júnior (Chico), Rômulo Menna Barreto Valença (Galego), Sandra Regina Fonseca de Araújo Valença, Thiago Augusto Pereira de Moraes (famoso Thiago Leite), pelas palavras de apoio nos momentos de “turbulência mestradiana”, pela disposição em ajudar cientificamente, pelas alíquotas de soro concedidas e por outras ajudas prestadas;

Aos companheiros da Comissão de Biossegurança da FCBS/CESMAC Sônia Maria Soares Ferreira, Maria da Glória Freitas, Maria Célia Albuquerque Torres, Beatriz Jatobá Pimentel, Carmen Silvia Tavares de Santana, Daniela Cristina de Souza Araújo, Edriane Texeira da Silva, Izabelle Quintiliano Montenegro Bomfim e Jair Faé pela compreensão e apoio nos momentos em que necessitei me ausentar para desenvolver o mestrado. Muito obrigado!

A Karla Patrícia Chaves da Silva (UFAL), Wagner Porto (UFAL), Elizabeth Sampaio de Medeiros (UFAL) e a outros colegas que trabalharam de forma significativa para a realização desse trabalho. A velha e sempre por mim lembrada frase de Karla no primeiro e-mail que me enviou quando eu fui morar em Alagoas “*Sou UFAL, mas sou legal*” demonstrou que esta estava sempre disposta a ajudar-me.

Grande Mauro José Gonçalves Bezerra, as minhas palavras para com você vai além do que posso expressar, afinal de contas lhe conheci no mestrado e em menos de dois anos pude ver em você uma pessoa sensata, sincera, sensível, que demonstra preocupação e dispensa grande importância para com os colegas principalmente nos momentos difíceis. Você é nota dez. Obrigado por tudo.

Ao camarada Sílvio Gomes de Sá pelas conversas aleatórias sobre diversos assuntos, relatos de experiências que sempre me ajudava em algo, afinal de contas eu viajava refletindo sobre os assuntos que abordávamos. Pela disposição em

ajudar-me já no final do trabalho praticamente para a correção do inglês, direcionando-me a um camarada de sua confiança. Obrigado.

Aos amigos André de Souza Santos (aquelas hospedagens e a boa vontade de me receber nos horários mais estranhos possíveis de chegada - nem o *master* paga), Orestes Luiz de Souza Neto (pela conversa diária e disponibilidade em ajudar sempre), Pedro Paulo Feitosa de Albuquerque (conterrâneo de coração – Paraibano gente fina);

Aos demais colegas do Laboratório de Bacterioses dos Animais Domésticos Acidália Machado (essa é a verdadeira residente – pense numa mulher organizada), Marcela Samico (pessoa mais hospitaleira e solícita não há – é igual à irmã – querida Erika Samico. Vocês são joia!). Sandrinha dos micoplasmas, Rodolfo Godoy, Vanessa Anny, Pomy Kim e a todos os outros que sempre me receberam bem e com disposição para ajudar-me;

Ao Luciano Gomes dos Santos pelas nossas conversas quase que diárias, pelos ensinamentos para a vida e pelo grande auxílio prestado acerca das dificuldades/entraves encontradas no mestrado. Obrigado meu amigo;

A Guiomar pelo café, aperreio (brincadeira) e a Edna Izabel Cherias pela imensa contribuição e prestatividade mesmo nos horários pós-expediente de trabalho. Muito obrigado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (processo nº 578044/2008-0) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco – FACEPE (processo nº APQ- 0772-5.05/06) pelo financiamento desta pesquisa.

EPÍGRAFE

"A humildade exprime, uma das raras certezas de que estou certo: a de que ninguém é superior a ninguém." (Paulo Freire)

Lista de abreviaturas

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
G	Gramas
g/L	Gramas por litros
H ₂ S	Ácido sulfídrico
µm	Micrômetro
µL	Microlitro
µg	MicroGrama
mm	Milímetros
mL	Mililitros
BHI	Brain Heart Infusion
ELISA	Ensaio imuno enzimático
FC	Fixação do Complemento
IN	Instrução Normativa
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NaCl	Cloreto de Sódio
OIE	Organização Internacional de Epizootias
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPD	Proteína Purificada Derivada
PPM	Partes Por Milhão
SDS-PAGE	Eletroforese de Gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio
SSA	Serviço de Sanidade Animal
UF	Unidade Federativa
UFC	Unidade Formadora de Colônias
DO	Densidade óptica

Lista de tabelas

Revisão

Tabela 1 - Características bioquímicas das cepas de *Burkholderia mallei* 18

Tabela 2 - Relação entre as formas de apresentação do mormo e as características observadas conforme a porta de entrada no hospedeiro 24

Artigo

Quadro 1 - Resultado dos testes de 300 amostras séricas de equinos submetidas aos testes de fixação do complemento e ELISA para pesquisa de anticorpos contra o Mormo 46

Lista de figuras

Artigo

Figura 1 - Resposta imunológica de equinos sensibilizados com *B. mallei* inativada, avaliada no teste ELISA-i, nos dias zero, 15 e 60 pós- 47 inoculação da bactéria.

Resumo: O mormo é uma enfermidade infecto-contagiosa de caráter agudo ou crônico que acomete principalmente os equídeos, causando enormes prejuízos na cadeia produtiva do cavalo. Para controlar a enfermidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu medidas sanitárias obrigatórias em todo território nacional que incluem o diagnóstico oficial pela fixação do complemento (FC), maleinização e sacrifício dos animais positivos. Os kits atuais utilizados no diagnóstico da doença são importados, dificultando e encarecendo sua aplicação na rotina. Objetivou-se com este estudo padronizar um teste de ELISA indireto utilizando o extrato protéico de *Burkholderia mallei* isolada a partir de equídeo portador no estado de Pernambuco. As amostras foram cultivadas em ágar sangue 10%, incubada por 48h a 37°C; posteriormente caracterizou-se fenotípica e genotipicamente uma das colônias isoladas, e em seguida a cultivou em BHI para enriquecimento; logo após, esta foi repicada para o meio Dor-set Henley o qual foi incubado a 37°C sob 60rpm por oito semanas. Para padronização do teste utilizou-se o conjugado Proteína G Peroxidase Sigma na diluição de 1:90.000, com soros diluídos em 1:100 e o antígeno em 1:400. Utilizou-se 60 soros como controle negativo testados frente à FC para determinação do ponto de corte o qual ficou em 0,042nm. Feitas as padronizações, foram testadas 300 amostras, onde 99% (297) foram concordantes com os resultados obtidos na FC. Ao final, o ensaio apresentou 100% de sensibilidade e 98,2% de especificidade, com valores preditivo positivo e negativo de 97,7% e 100% respectivamente. O teste de concordância *kappa* foi 0,98 e a repetibilidade intra e interplaca ficaram em 8,8% e 10,3% respectivamente. Diante dos resultados obtidos durante os ensaios, atesta-se que o teste de ELISA indireto pode ser utilizado como uma ferramenta de diagnóstico eficiente. Entretanto, mais ensaios devem ser realizados visando consolidar a confiabilidade do referido teste.

Palavras-chave: *Burkholderia mallei*, sorologia, ELISA, diagnóstico.

Summary:

Glanders is an infectious-contagious disease of acute or chronic character which principally affects horses, causing enormous losses in the productive chain of this animal. To control the disease, the Ministry of Agriculture, Husbandry and Supply instituted mandatory sanitation measures in the entire national territory which include an official diagnosis through the complement fixation (CF) test, maleinization and sacrifice of the animals that are positive. Nowadays the kits used for the diagnosis of the disease are imported, making their routine application difficult and more expensive. The objective of this study was to standardize an indirect ELISA test, using the proteic extract of *Burkholderia mallei* isolated from a carrier horse in the state of Pernambuco. The samples were cultivated in 10% blood agar and incubated for 48h at 37°C; later, one of the isolated colonies was characterized phenotypically and genotypically and immediately cultivated in brain heart infusion (BHI) for enrichment; then it was peaked (repicada) for the Dor-set Henley medium which was incubated at 37°C under 60rpm for eight weeks. To standardize the test the Protein G Peroxidase Sigma Conjugate was used in the dilution of 1:90.000, with serums diluted in 1:100 and the antigen in 1:400. Sixty serums were used as negative controls, tested before the CF to determine the cutting point which was 0.042nm. After establishing the standardization, 300 samples were tested, of which 99% (297) were in agreement with the results obtained in the CF. At the end, of assay presented 100% sensibility and 98.2% specificity, with predictive (preditivo) positive and negative values of 97.7% and 100% respectively. The *Kappa* concordance test was 0.98 and the intra and interplac repeatability were 8.8% and 10.3% respectively. From the results obtained, it is possible to affirm that the indirect ELISA test can be used as an efficient diagnosis tool. However, more essays must be carried out to consolidate the reliability of this test.

Key words: *Burkholderia mallei*, sorology, ELISA, diagnosis.

SUMÁRIO

1.	Introdução	14
2.	Revisão bibliográfica	16
2.1.	Aspectos gerais e histórico do mormo.....	16
2.2.	Etiologia.....	17
2.3.	Epidemiologia.....	20
2.4.	Patogenia.....	22
2.5.	Sinais clínicos.....	23
2.6.	Diagnóstico.....	26
2.7.	Controle e profilaxia.....	32
3.	Objetivos	33
3.1.	Geral.....	33
3.2.	Específicos.....	33
4.	Referências	34
5.	Artigo científico	
5.1.	Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos	43
	Conclusão.....	48

1. Introdução

No Brasil, a criação de equídeos é uma atividade explorada em diversas regiões e destina-se às mais diversas finalidades como atividades militares e de esporte. O tipo de atividade a qual o animal é submetido é um fator que muitas vezes irá determinar o seu tempo de vida útil, uma vez que associados a isso estão as condições de manejo e sanidade, que são fundamentais para garantir a saúde do animal (LIMA et al., 2006). O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a partir de levantamento estatístico realizado no ano de 2009, divulgou que o rebanho brasileiro de equídeos soma um total de 7.803.598 cabeças, das quais 2.937.207 se concentram na região Nordeste do país.

O mormo é uma enfermidade infecto-contagiosa que acomete equídeos, podendo se manifestar de forma aguda ou crônica e tem geralmente um desfecho fatal. A primeira descrição da doença no Brasil foi feita em 1811 com a introdução da doença a partir da importação de animais infectados da Europa (PIMENTEL, 1938). Na ocasião os animais apresentavam sintomatologia de catarro e úlceras nasais (LANGENEGGER et al., 1960). No ano 2000, Mota et al. relataram os aspectos microbiológicos, epidemiológicos, clínicos, patológicos e de diagnóstico do mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas, confirmando a re-emergência da doença no país.

Oficialmente a doença é diagnosticada no Brasil pelos testes de Fixação do complemento (FC) e maleinização (Instrução Normativa nº 24 de 05 de abril de 2004). O teste de triagem é o de FC que detecta anticorpos específicos contra *Burkholderia mallei* no sangue de animais com clínica aparente ou aqueles na fase crônica da doença. Possui baixa especificidade, o que muitas vezes contribui com o surgimento de resultados falsos-positivos, e uma alta sensibilidade (MOTA, 2006). Animais que após serem testados na FC mostrem-se positivos e sem sintomas clínicos ou ainda que tenham sintomas clínicos se comportem como negativos poderão ser submetidos ao teste confirmatório que é o teste da maleína. Essa prova consiste numa reação imunoalérgica decorrente da inoculação do extrato protéico da *B. mallei* (PPD-maleína) por via intradermopalpebral; é desencadeada por células, caracterizando uma reação de hipersensibilidade do tipo IV (VERMA, 1994).

O derivado protéico purificado (PPD) de bactérias possui grande importância enquanto imunógeno no diagnóstico, uma vez que demonstra boa aplicabilidade para o diagnóstico de doenças que desencadeiam baixa resposta humoral e maior imunidade celular, aumentando assim a especificidade no diagnóstico da doença (DALL' STELLA et al. 2007).

Atualmente os *kits* utilizados no diagnóstico sorológico do mormo no Brasil são importados, pois não há produto similar nacional, o que pode agravar a situação do diagnóstico e controle da doença face à decisão do MAPA, com base na Legislação em vigor (Decreto Nº 5.053, de 22 de abril de 2004) de não autorizar a importação do antígeno para FC por não ser registrado no Brasil.

Na perspectiva de substituir a prova de FC por um teste que possua elevada sensibilidade e especificidade, reduzindo com isso o número de reações falso-positivas, aumentando os atuais valores preditivos e, visando ainda, reduzir o custo do diagnóstico que atualmente é feito com antígeno importado, realizou-se este estudo para desenvolver um ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Aspectos gerais e histórico do mormo

Das doenças que acometem os equídeos, o mormo é uma das mais antigas, sendo descrita por Aristóteles e Hipócrates nos séculos III e IV a.C. (BLANCOU, 1994). A doença é responsável por altas taxas de mortalidade em equídeos, ocorrendo em diferentes partes do mundo, tendo sido descrita no Iraque, no Egito e em certas partes da África, na Itália, na Índia, na China e na Rússia (HENNING, 1956 (a); GANGULEE et al., 1966; BATTELLI et al., 1973; SHUMILOV, 1974; ZHANG & LÚ, 1983; AL-ANI et al., 1987; VERMA et al., 1994).

Desde a descoberta do mormo, o seu agente etiológico foi incluído em diversos gêneros (*Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Loefflerella*, *Pfeifferella*, *Malleomyces*, *Actinobacillus* e *Pseudomonas*), até ser finalmente classificado no gênero *Burkholderia* com base no sequenciamento do rRNA, aspectos de biologia molecular, composição de ácidos lipídicos e características fenotípicas (YABUUCHI et al., 1992).

Alguns países da Europa Ocidental, Austrália e América do Norte já erradicaram a doença, contudo ainda há relatos de surtos na Turquia, Emirados Unidos Árabe, Iraque, Irã, Índia, Paquistão, Mongólia, China, Brasil e mais recentemente no Bahrein (HENNING, 1956(a); BAZARGANI et al., 1996; OIE, 2008; KOHLER, 2006).

No Brasil, a doença foi introduzida pela importação de equídeos da Europa. Apesar de ter sido considerada extinta desde 1968 no território nacional, data da última notificação oficial, suspeita-se que a doença nunca tenha sido extinta, ao que pode-se atribuir a sub-notificação e/ou falhas no diagnóstico. A implantação de planos e programas de controle sanitário, bem como a diminuição do uso de equídeos como animais de tração foram fatores que contribuíram para a redução do número de casos (MOTA et al., 2000; SILVA, 2010).

2.2. Etiologia

O mormo tem como agente etiológico a *Burkholderia mallei*, bactéria Gram negativa que possui formato bacilar, medindo 0,3µm a 0,6µm de largura por 1,5µm a 4µm de comprimento. É imóvel, cresce na presença de oxigênio, entretanto na presença de nitrato comporta-se como anaeróbia facultativa, não esporula, apesar de se observar em microscopia de varredura eletrônica uma superfície constituída por carboidratos, a qual tem função de proteger o agente contra condições ambientais adversas (HIRSH e ZEE, 2003).

A morfologia colonial pode variar conforme as condições de cultivo, uma vez que a bactéria cresce de maneira abundante em meios que contenham sangue ou glicerol (SANFORD, 1995; SILVA et al., 2005).

Ao cultivá-lo em ágar enriquecido com 5% a 10% de sangue de ovino e incubar a 37°C, após 48 horas surgem colônias pequenas, cremosas e de coloração acinzentada e não hemolíticas. Quando o cultivo é feito em ágar batata glicerinado ou ágar glicerol incubado sob as mesmas condições, as colônias produzem uma pigmentação amarelada e, caso permaneçam incubadas por mais 24 horas apresentarão tonalidade achocolatada (MOTA et al., 2000).

Burkholderia mallei apresenta apenas um operon e a amplificação de apenas uma banda da região intergênica 16S-23S rRNA é padrão para espécie, podendo observar-se outras, de acordo com o polimorfismo das cepas. Foi verificado ainda que há uma relativa homologia entre a extensão da região espaçadora intergênica (ISR) de *B. mallei* e a ISR de *B. pseudomallei*, confirmando a similaridade de DNA em mais de 80% entre as duas espécies (SILVA et al., 2009).

De acordo com Bauernfeind et al. (1998), as amostras de *B. mallei* submetidas à ribotipagem-PCR geram produto de amplificação de 1.051pb, servindo como modelo de rDNA da *B. mallei* e *B. pseudomallei*, mas não para outras espécies de *Burkholderia*.

As duas espécies possuem interesse internacional, visto que já foram utilizadas em guerras como arma biológica, com eficiência por apresentarem elevado potencial de infectividade e disseminação entre os susceptíveis, além de causar a morte de humanos. Segundo o Centro de Controle de Doenças (CCD),

estes agentes encontram-se classificados na lista B (ROTZ et al., 2002, VOSKUHL et al., 2003 e MOTA, 2006).

Estudos realizados por Al-Ani et al. (1998) e Mota et al. (2000) demonstraram que a *B. mallei* apresenta características bioquímicas particulares, uma vez que ao submeter colônias suspeitas às provas de identificação dessa natureza, estas se comportam de maneira similar, contudo pequenas variações bioquímicas podem ser observadas entre os isolados de determinadas regiões. A tabela 1 apresenta as características bioquímicas de *B. mallei* de amostras isoladas no estado de Pernambuco. Uma característica bastante importante para diferenciar a *B. mallei* da *B. pseudomallei* é a motilidade, pois enquanto a primeira comporta-se como imóvel, a segunda é móvel (WINSTANLEY et al., 1998).

Tabela 1 – Características bioquímicas das cepas de *Burkholderia mallei*

Provas bioquímicas	Comportamento
Indol	+
Vermelho de Metila	-
Voges-Proskauer	-
H ₂ S (TSI)	Fraco
Oxidase	+
NH ₃	Fraco
Nitrato	-/fraco
Gelatina (22°C)	-
Produção de pigmento	-
Arginina-Dihidrolase	+
Catalase	+
Galactose	+
Maltose	Variável
Gás de D-Glucose	+
Lactose	+/lenta
Sucrose	-
D-Manitol	+
Frutose	+/lenta
Manose	+/lenta

Fonte: Al-Ani et al. (1998); Mota et al. (2000)

No que diz respeito aos fatores de virulência, estes ainda são pouco conhecidos, contudo estudos experimentais comprovam que há formação de cápsula lipopolissacarídica com propriedade antifagocitária essencial para a virulência da bactéria em cobaios (*Cavia porcellus*), hamsters (*Cricetulus griseus*) e

ratos (*Rattus* spp.). A mutabilidade adquirida por algumas cepas as tornou sem cápsula e conseqüentemente avirulentas para animais de laboratório (DESHAZER et al., 2001; WOODS, 2002).

O lipopolissacarídeo é um componente fundamental para a sobrevivência do agente no hospedeiro, uma vez que atua promovendo resistência contra os componentes sorológicos bactericidas, além de desencadear o choque endotóxico, acontecimento este responsável pela rápida evolução da doença bem como pelo seu desfecho fatal (BURTNICK et al., 2002).

Apesar de a *B. mallei* comportar-se como imóvel quando avaliada em provas bioquímicas, uma vez que esse agente encontra-se dentro de uma célula, o mesmo apresenta motilidade e dessa forma transfere-se de uma célula para outra sem ter contato com fatores antimicrobianos nem com o espaço intercelular por intermédio do gene *bimA_{BM}*. Essa característica, associada à presença de proteínas que são sintetizadas e liberadas pelo agente, estimula o organismo a produzir uma resposta imune do tipo IV conhecida como tardia ou retardada, o que origina a formação de granulomas (STEVENS et al., 2005; RIBOT e ULRICH, 2006). Vários produtos de genes, como *bim_A*, efetores do sistema de secreção do tipo 3 e secreção de proteínas do tipo 6 foram demonstrados como sendo o ponto chave nesse processo. Contudo, os mecanismos utilizados pela *B. mallei* para aderir às células eucarióticas ainda são pouco esclarecidos (ST GEME, 1997; SAMRAKANDI et al., 2002). No entanto, em 2006 Amemiya et al. foram capazes de destacar a importância da IL-12 e IFN- γ na promoção de uma resposta imune efetiva contra *B. mallei*.

Para a desinfecção, o benzalcônio clorado (1:2000), hipoclorito de sódio (500ppm), iodo, mercúrio clorado em álcool e permanganato de potássio são efetivos contra este microrganismo; o fenol é menos efetivo e os desinfetantes à base de cresol ineficientes. Em termos de resistência no ambiente quando eliminado em material potencialmente infectante, o agente não suporta mais que duas semanas sob condições adversas, sendo pouco resistente ao calor, dessecação e luz solar (OIE, 2000; HIRSH e ZEE, 2003; OIE, 2007).

2.3. Epidemiologia

Entre os anos de 2005 e 2010, a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), recebeu 152 notificações oficiais de ocorrência do mormo em equídeos no Brasil através do Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Os registros foram oriundos dos Estados de Alagoas (11,18%), Pernambuco (27,63%), Paraíba (26,32%), Rio Grande do Norte (21,71%), Ceará (5,26%), Piauí (0,66%), Maranhão (0,66%), Pará (3,29%), Amazonas (1,32%) e São Paulo (1,97%). O último registro de mormo em equino no Brasil ocorreu no dia 21 de abril de 2010 no Distrito Federal (OIE, 2010a).

Os casos de infecção humana por *B. mallei* estão relacionados com a atividade ocupacional, onde técnicos de laboratório, pesquisadores, médicos veterinários, cavaleiros, tratadores de cavalos e funcionários de abatedouros de equídeos são os grupos potencialmente mais expostos ao risco de infecção. A doença entre os seres humanos decorre a partir do contato com a bactéria em atividades laboratoriais ou com animais infectados e apresenta sintomatologia pouco específica com morbidade baixa mesmo nas regiões onde a doença é endêmica nos equídeos (KÖHLER, 2006).

A infecção em humanos ocorre por meio de aerossóis contaminados ou através de lesões de pele, e o risco de contrair a doença é proporcional à concentração de *B. mallei* ou *B. pseudomallei* presente na fonte de infecção. O período de incubação varia normalmente entre 1 a 14 dias. Todavia, existem relatos de infecções manifestadas somente após muitos anos. A secreção proveniente do sistema respiratório e linfático são fontes de infecção da bactéria para animais sadios e homem (BALDER et al., 2010; SILVA, 2010). A transmissão homem-homem, através de objetos, água ou alimentos contaminados é rara (ARUN et al., 1999; WOODS, 2002). As taxas de mortalidade em humanos são elevadas (19% a 51%), mesmo utilizando-se uma terapia antimicrobiana agressiva (NIUMSUP e WUTHIEKANUN, 2002).

Os animais portadores assintomáticos e os sintomáticos representam as principais fontes de infecção, contudo, a mais importante via de infecção é a oral, seguida da respiratória, genital e cutânea (MOTA, 2006). As mais importantes vias de excreção da *B. mallei* são a respiratória e a digestiva, uma vez que as lesões

pulmonares crônicas nos brônquios se rompem infectando as vias aéreas superiores, eliminando a bactéria no ambiente (RADOSTITS et al., 2002).

Os estábulos coletivos, o manejo inadequado que leva muitas vezes os animais ao estresse e a idade avançada são potenciais fatores de risco para a disseminação da doença, contribuindo de maneira significativa para o aparecimento da forma clínica na infecção natural (LANGENEGGER et al., 1960; MOTA et al., 2000). A transmissão pode se dar de forma direta por inalação de aerossóis infectados ou contato da pele lesionada com o agente, ou indireta através da ingestão de água ou alimentos contaminados (LANGENEGGER et al., 1960; RADOSTITS et al., 2002; HIRSH & ZEE, 2003).

Todo e qualquer tipo de instrumental de uso coletivo nos animais tais como kit de ferramentas para limpeza de cascos, chicotes, arreios, escovas, entre outros podem veicular o agente. A transmissão vertical natural da égua para o feto já foi confirmada embora não seja comum, bem como a transmissão sexual (ALIBASOGLU et al., 1986; BATTS-OSBORNE et al., 2001; WOODS, 2002; MOTA, 2006).

O surgimento da doença em rebanhos pode ocorrer tanto pela introdução de animais portadores oriundos de unidades criadoras onde não há um controle sanitário adequado, como também pela presença de animais portadores originários de locais onde há grande aglomeração como em feiras e exposições (AL-ANI e ROBERSON, 2007).

A bactéria pode permanecer viável em estábulos contaminados por até seis semanas e em água de torneira por até quatro semanas. Sem condições favoráveis de sobrevivência no ambiente, o agente geralmente não resiste por mais de duas semanas (MILLER et al., 1948; HENNING, 1956(b); SANFORD, 1995; SILVA et al., 2005).

2.4. Patogenia

O agente penetra principalmente por via digestiva, mas também pode penetrar por via respiratória, cutânea e genital. Após um período de incubação que pode variar de 7 a 30 dias, a doença pode apresentar-se nas formas aguda ou crônica. Quando a via de entrada é a respiratória, o microrganismo localiza-se nos pulmões, entretanto a pele e a mucosa nasal também são sítios comuns de localização (RADOSTITS et al., 2002; WOODS, 2002; RABELO et al., 2006).

Trata-se de um patógeno intracelular facultativo que pode sobreviver e se multiplicar em células fagocitárias graças aos vacúolos citoplasmáticos que evitam que haja manifestação da resposta imune humoral (HARLEY et al., 1998; RIBOT e ULRICH, 2006; SILVA, 2010).

Inicialmente a *B. mallei* coloniza a mucosa intestinal e posteriormente atinge o sistema circulatório chegando à fase septicêmica (estágio agudo), seguida de bacteremia (estágio crônico). São visualizadas lesões primárias na porta de entrada utilizada pelo agente e com o acometimento da cadeia linfática adjacente verifica-se a presença de lesões nodulares. Há surgimento de lesões metastáticas nos pulmões e em outros órgãos como baço, fígado e pele. O septo nasal pode apresentar lesões de origem hematogena (primária) ou secundária a um acometimento pulmonar. Na infecção por meio de feridas cutâneas, o agente passa para o sangue sendo transportado para diferentes órgãos (pulmões, baço e fígado) nos quais formam-se úlceras e nódulos mormosos (HUTYRA et al., 1973; RADOSTITS et al., 2002).

Os nódulos originam-se a partir de lesões granulomatosas e piogranulomatosas formadas inicialmente por neutrófilos, fibrina e hemácias. Os neutrófilos degeneram-se e uma área necrótica central é circundada por células gigantes, células epitelióides, linfócitos infiltrados no tecido de granulação, plasmócitos e elevada quantidade de tecido conjuntivo. Pode haver ainda calcificação do tecido necrótico (MOTA et al., 2000; HIRSH & ZEE, 2003).

2.5. Sinais clínicos

A doença pode se apresentar nas formas pulmonar, nasal e cutânea normalmente de maneira simultânea em um mesmo animal o que pode culminar com descargas nasais mucopurulentas, lesões pulmonares, nódulos hepáticos e esplênicos, além de nódulos firmes na pele (SCHLATER, 1992; JUBB et al., 1993).

Os sinais clínicos do mormo podem variar conforme a porta de entrada, assim como a fase em que a doença se encontra, ou seja, nas fases aguda ou crônica. Estágios agudos da infecção resultam em febre alta (39,5°C a 40,5°C), emagrecimento, ulceração do septo nasal acompanhado por secreção nasal mucopurulenta. No entanto, alguns sintomas como descarga nasal purulenta (figura 1) geralmente bilateral, presença de estertores, hipertrofia de linfonodos submandibulares, caquexia, apatia e edema de membros independem da fase em que a doença se encontra (RABELO et al., 2006; WHITLOCK et al., 2007).



Figura 1 – Secreção nasal mucopurulenta em equino com mormo

Cortesia: Prof. Rinaldo Mota, UFRPE

A forma nasal tem sintomatologia mais complexa, pois o processo infeccioso inicia-se com a formação de nódulos inflamatórios que ulceram podendo confluir e posteriormente fecham-se dando origem à cicatriz em forma de estrela, porém pode ocorrer ainda a destruição do septo nasal. Nessa forma, normalmente surge corrimento nasal que varia de sero-mucoso a muco-purulento uni ou bilateral,

podendo ou não apresentar-se com estrias de sangue. Além disso, ainda há um aumento significativo no volume dos linfonodos submandibulares. Além desses achados clínicos, os animais que estão nessa fase crônica apresentam dispnéia, estertores pulmonares, respiração com ruídos, inapetência e emagrecimento progressivo (LANGENEGGER et al., 1960; WINTZER, 1990; JUBB et al., 1993; MOTA et al., 2000; RADOSTITS et al., 2002).

A infecção pulmonar resulta ainda em pneumonia e pleurite com presença de abscessos e por fim um quadro de tosse, dispnéia e febre (FRITZ e WOODS, 2003; MOTA, 2006; RABELO et al., 2006).

A infecção cutânea se dá por ferimentos na pele onde o agente penetra, migrando em seguida para a corrente sanguínea e transportando-se para os órgãos de predileção. Após essa fase há o surgimento de pequenos nódulos (0,5cm a 2,5cm) endurecidos na face medial dos membros posteriores e região dorsal do animal. Os nódulos evoluem para abscessos que se rompem, transformando-se em úlceras que por fim originam áreas alopecicas e cicatrizam em forma de estrela. Devido à interligação desses nódulos à cadeia linfática, os mesmos adquirem um formato sugestivo de colar de pérolas (WINTZER, 1990; MOTA et al., 2000; RADOSTITS et al., 2002). Verifica-se ainda o aumento de volume dos linfonodos que se encontram firmes, podendo ainda fistular (ocorrência rara). A cadeia linfática dos membros pélvicos é mais atingida, além de haver formação do edema com maior frequência quando comparada à cadeia linfática dos membros torácicos (PRITCHARD, 1995; SHARRER, 1995; RABELO et al., 2006).

Alguns animais podem apresentar claudicação de apenas um membro pélvico, o qual se mantém suspenso e semi-flexionado, sendo denominado de “posição de bailarina” (MANNINGER e MOCSY, 1968).

Os animais acometidos podem ainda desenvolver quadros de cólica, diarreia aquosa, dispnéia acentuada, prostração, colapso cardiovascular e por fim vir a óbito (GREGORY e WAAG, 2009).

As características da infecção pela *B. mallei* conforme a porta de entrada e a forma de apresentação encontram-se na tabela 2.

Tabela 2 – Relação entre as formas de apresentação do mormo e as características observadas conforme a porta de entrada no hospedeiro

Tipo de apresentação		Características
Aguda	Localizada	- Infecção aguda local com ulceração dos tecidos orais, nasais e/ou olhos.
	Pulmonar	- Infecção dos pulmões após inalação de aerossóis contendo <i>B. mallei</i> ou pela disseminação do agente através do sangue; - Pode resultar em derrame pleural, pneumonia e abscessos pulmonares.
	Septicêmica	- Infecção sistêmica na circulação sanguínea. - A morte ocorre de 7 a 10 dias após o surgimento repentino dos sintomas.
Crônica	Assintomática	- Caracteriza-se por surtos de infecções ao longo dos anos; - O sintoma mais comum é o abscesso que pode ocorrer na pele ou de forma intra-muscular nos membros; - Fígado, baço e pele podem também ser afetados.

Fonte: www.upmc-biosecurity.org

2.6. Diagnóstico

Para o diagnóstico do mormo é importante considerar as informações epidemiológicas associadas aos sinais clínicos e os achados anátomo-histopatológicos. Contudo, o isolamento bacteriano, a prova biológica de Strauss (inoculação em animais de laboratório), reação imunoalérgica (maleinização), fixação do complemento (FC), ELISA (ensaio imunoenzimático), contra imunoeletroforese, hemaglutinação indireta (HI), imunofluorescência indireta (IFI) e o teste de rosa bengala em placa constituem-se como exames complementares no fechamento do diagnóstico (AL-ANI et al., 1998; MOTA et al., 2000; NAUREEN et al., 2007).

Para cultivo e isolamento do agente, a amostra deve ser obtida de maneira asséptica em animais suspeitos por meio de punção aspirativa de abscessos fechados (material de eleição), através de suabes nasais ou por meio de coleta de secreção oriunda de nódulos pulmonares, hepáticos ou esplênicos durante procedimentos de necropsia. O material deve ser imediatamente acondicionado em caixas isotérmicas contendo gelo e remetido a um laboratório de microbiologia veterinária para que seja cultivado em ágar base enriquecido com 10% de sangue ovino, ágar batata glicerinado e ágar glicerol. Em seguida, incubam-se as placas em estufa bacteriológica a 37°C por 48h a 72h em uma atmosfera aeróbica. No processo de identificação bacteriana devem ser levados em conta primeiramente os aspectos morfológicos das colônias, bem como características tintoriais quando corados pela técnica de Gram, assim como o comportamento do agente frente às provas bioquímicas (KRIEG e HOLT, 1984; GILARDI, 1985; SILVA et al., 2005; MOTA et al., 2006; MOTA et al., 2010).

O diagnóstico diferencial deve ser feito com outras doenças crônicas que acometem a mucosa ou seios nasais como a linfangite ulcerativa causada pelo *Corynebacterium pseudotuberculosis*, a adenite equina ou garrotilho (*Streptococcus equi*), a pseudotuberculose causada pela *Yersinia pseudotuberculosis*, esporotricose (*Sporothrix* spp.) e ainda da linfangite epizoótica causada pelo *Histoplasma farciminosum*, uma vez que todas essas patologias possuem aspectos semelhantes aos do mormo (OIE, 2008).

A utilização do teste de ELISA como teste diagnóstico para diversas doenças vem aumentando gradativamente, graças à sua elevada especificidade e sensibilidade. O seu princípio básico é a imobilização de um dos reagentes em uma fase sólida, enquanto outro reagente pode ser ligado a uma enzima, com preservação da atividade enzimática e imunológica do anticorpo. O ELISA desempenha um papel muito importante no laboratório clínico, pois apresenta elevada sensibilidade, além de poder ser adaptado tanto a testes simples como à automação sofisticada. Trata-se de um tipo de ensaio que mede a interação entre o antígeno e o anticorpo, não dependendo de um segundo fenômeno como precipitação, aglutinação ou fixação do complemento (TIZARD, 2002).

No teste de ELISA, o antígeno também se liga ao anticorpo, entretanto, o diferencial em relação a outros testes sorológicos é que, para se fazer a interpretação é preciso utilizar reagentes colorimétricos, sendo que na ocasião a coloração do meio se dá com base em uma ação de determinada enzima sobre um substrato cromogênico, contudo, antes de se proceder à realização do teste propriamente dito, faz-se necessário preparar as microplacas, nas quais previamente deverá constar uma enzima conjugada à imunoglobulina (ALMEIDA e LIMA, 2001).

O ELISA indireto é bastante utilizado com finalidade de identificar, inclusive quantificar anticorpos em amostras de soro, recebendo destaque especial quando se trata de estudos soropidemiológicos. Em termos de especificidade pode-se afirmar que, no caso dessa prova, ela é garantida especialmente de acordo com a qualidade do antígeno adsorvido aos poços da microplaca (MADRUGA et al., 2001).

O ELISA competitivo (ELISAc) possui sensibilidade e especificidade muito promissoras, comparáveis até às da FC. As principais vantagens do ELISAc são seu potencial para a automatização e sua aplicabilidade nos casos de provas de fixação do complemento inconclusivas (VERMA, 1998; SRINIVASAN et al., 2001).

Alguns trabalhos mostraram que o dot-ELISA, além de apresentar maior sensibilidade, é também superior a outros testes na facilidade de execução, rapidez e facilidade de interpretação, uma vez que este ensaio é capaz de detectar anticorpos na fase inicial (VERMA et al., 1990).

A simplificação do teste de ELISA na forma de dot-ELISA ocorreu sem que houvesse perda de sensibilidade da referida prova, além de estar sendo crescente a

sua aplicação no imunodiagnóstico de doenças virais, bacterianas, fúngicas, entre outras (KUMAR et al., 1985; KUMAR et al., 1986; BLUMBERG et al., 1987; CHAND et al., 1988; TANDON et al., 1988; MATTHEWS e BURNIE, 1988; BATRA et al., 1989). Segundo Sprague et al. (2009), na Alemanha um ELISA indireto (ELISAI) utilizando anticorpo monoclonal específico contra *B. mallei* foi testado; no entanto a sua eficiência ficou abaixo do que foi conseguido com o ELISAc e FC respectivamente, provavelmente devido às reações cruzadas com outras espécies de bactérias com antígenos de parede celular semelhantes.

O teste de ELISA é bastante eficiente no diagnóstico dessa enfermidade, porém por não ser reconhecido como um teste oficial, não tem valor na emissão de laudos e guias de trânsito. A referida prova possui resultados que superam a FC (VERMA, 1998; SRINIVASAN et al., 2001).

A depender da padronização dos reagentes assim como dos parâmetros utilizados na realização do ensaio, associado à capacidade que o teste possui de detectar quantidades extremamente pequenas de antígenos ou anticorpos, este pode apresentar elevada precisão. No entanto, é necessário que haja um elevado grau de pureza do antígeno ou do anticorpo da fase sólida, pois qualquer material heterólogo competirá pelo espaço na placa. Além disso, em se tratando de ELISA indireto, a sua eficiência é garantida de acordo com a quantidade de antígeno adsorvido à microplaca (MADRUGA et al., 2001; TIZARD, 2002).

Apesar da baixa sensibilidade apresentada, a prova de Strauss é um recurso diagnóstico bastante utilizado no diagnóstico do mormo. No entanto, cuidado especial deve-se ter na interpretação do resultado desta prova uma vez que não se trata de um teste específico para essa doença, fato este que pode gerar resultados falsos-positivos. Essa técnica consiste na inoculação de secreção nasal, conteúdo de abscessos subcutâneos ou a bactéria isolada em cultivo em hamsters, ratos ou cobaios machos por via intraperitoneal no volume de 0,1mL, onde após 24 a 48 horas pós inoculação estes apresentarão sinais de septicemia e num prazo de 3 a 5 dias haverá formação de abscesso local, seguido de orquite purulenta acentuada (FRITZ et al., 1999; FRITZ et al., 2000; MOTA et al., 2000; OIE, 2008).

Observados esses sinais procede-se à necropsia onde serão verificadas lesões abscedativas em diferentes órgãos a partir dos quais são coletadas amostras para cultivo e identificação bacteriana (NEUBAUER et al., 1997; SILVA et al., 2005).

A reação verificada na prova de Strauss não é específica para o mormo e outros microrganismos podem provocar reação semelhante. Portanto, recomenda-se fazer o exame bacteriológico do exsudato proveniente dos testículos infectados para confirmar a especificidade da resposta obtida (OIE, 2008).

O diagnóstico anátomo-histopatológico do mormo em animais necropsiados inclui a presença de úlceras, nódulos e/ou cicatrizes em forma de estrela nas fossas nasais, traquéia, laringe e faringe. Nos pulmões verifica-se a presença de piogranulomas com uma média de 2cm a 3cm de diâmetro, bem como abscessos e acometimento da pleura visceral por petéquias e equimoses. Os nódulos formados ao longo dos vasos linfáticos ulceram originando feridas cutâneas as quais cicatrizam profundamente. Em casos crônicos os nódulos ficam aderidos à pele e apresentam textura fibrosa (MOTA et al., 2000; CFSPH, 2007).

Macroscopicamente são visualizados no tecido necrótico nódulos acinzentados granulados ou piogranulosos, firmes, redondos, com cerca de 1cm de diâmetro. Microscopicamente observa-se grande quantidade de elementos inflamatórios (macrófagos, células gigantes e epitelióides, linfócitos e plasmócitos) circundando os nódulos além de grande área formada por tecido conjuntivo e pontos caseosos ou calcificados. O epitélio nasal apresenta-se comprometido e inflamado de forma grave e difusa, bem como a cartilagem septal e glândulas da região. Ainda são observadas alterações como vasculite, focos de fibrina e trombose dos vasos do epitélio nasal (MOTA et al., 2000).

Nos pulmões observa-se a presença de congestão moderada a acentuada, além de pequenos focos de hemorragia, edema e fibrina interlobular e intra-alveolar com inflamação granulomatosa focal. Os linfonodos podem apresentar necrose, congestão e hemorragia com numerosos focos de inflamação piogranulomatosa.

No baço são vistas áreas de necrose fibrinóide, associadas à inflamação piogranulomatosa e extensas áreas de fibrose. As lesões hepáticas constituem-se de necrose e infiltração granulomatosa focal com presença de células gigantes e pericolangite granulomatosa. Pode-se verificar ainda a existência de infiltração granulomatosa multifocal intersticial com alguns focos de necrose tubular nos rins (MOTA et al., 2000).

Segundo a Instrução Normativa nº 24 de 05 de abril de 2004, publicada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o diagnóstico do

mormo é recomendada a realização da prova de fixação do complemento e da PPD-maleína, sendo esta última complementar à primeira. A FC é um teste diagnóstico oficial para trânsito internacional de equídeos, graças à sua capacidade de detecção de animais clinicamente sadios ou na fase crônica da doença, embora reações falso-positivas sejam observadas ocasionalmente em 1% dos soros de animais jovens, gestantes e desgastados (CRAVITZ e MILLER, 1950). Recentemente a sua especificidade tem sido questionada, principalmente quando comparada aos testes de maleína e imunoelektroforese (SCHLATER, 1992; BRASIL, 2004; NEUBAUER et al., 2005; NAUREEN et al., 2007).

A FC apresenta elevado grau de sensibilidade, porém menor especificidade quando comparada à maleinização; detecta anticorpos específicos contra *B. mallei* a partir da primeira semana de infecção apesar de algumas pesquisas recomendarem que o melhor momento para a realização do teste situa-se entre a 4ª e a 12ª semanas após a infecção. A referida prova deve ser realizada em Laboratórios Oficiais ou Credenciados pelo MAPA.

O teste da PPD-maleína começou a ser utilizado por volta de 1905 nos Estados Unidos e Canadá. Essa prova é realizada apenas por Médicos Veterinários oficiais e identifica o animal positivo a partir da 3ª semana após a infecção. Consiste na aplicação de 0,1mL de maleína por via intradermopalpebral (onde o olho oposto serve de controle), por via oftálmica ou subcutânea (VERMA et al., 1994; OIE, 2007). Contudo, para o diagnóstico mais eficiente é necessário que o animal infectado seja hipersensível à maleína; equinos com sintomas clínicos avançados e nos casos mais graves em burros e mulas, o resultado pode ser inconclusivo, sendo necessária a realização de testes diagnósticos complementares (BRASIL, 2004; OIE, 2008; GREGORY e WAAG, 2009).

No teste intradermopalpebral realiza-se a leitura após 48 horas da aplicação da maleína. O resultado é considerado positivo se o olho do animal apresentar uma conjuntivite acentuada, acompanhada de descarga purulenta, inchaço da pálpebra e blefaroespasmo (figura 3). Uma reação negativa caracteriza-se por um leve avermelhamento da conjuntiva e pálpebra inferior, seguida de um fraco lacrimejamento que desaparecem após 24h (OIE, 2008). Em equinos com mormo, o diagnóstico por meio da maleína possui eficiência em torno de 95%, porém em casos mais avançados não se mostra eficiente, pois os animais podem se comportar

como anérgicos. Normalmente o diagnóstico diferencial não se apresenta como um problema devido às características clínicas e sintomas da doença e pela elevada resposta frente aos testes de FC e maleína. Esta tem sido a prova de diagnóstico a campo mais recomendada pelos programas de erradicação desde o ano de 1960 (BRASIL, 2004; MOTA et al., 2006; GREGORY e WAAG, 2009).

O teste oftálmico possui confiabilidade menor que o teste intradermopalpebral e consiste em instilar algumas gotas da maleína no canto de um dos olhos, onde no animal infectado haverá inchaço das pálpebras, podendo atingir em menor proporção, o olho controle. Já o diagnóstico do mormo pela inoculação intradérmica da maleína além de ser mais trabalhoso não é aceito em alguns países e pode apresentar resultados falsos, devendo ser executado novamente 14 dias após o primeiro teste (OIE, 2008). Após testar animais com a maleína, os testes sorológicos podem apresentar resultados imprecisos por até cerca de seis semanas (MOTA, 2006).

Segundo Tyler et al. (1995), a utilização de métodos que se baseiam em biologia molecular como é o caso da ribotipagem representa um impacto significativo no que diz respeito ao diagnóstico, principalmente quando se refere aos agentes com elevada periculosidade como a *B. mallei* e *B. pseudomallei*.

B. mallei apresenta apenas um operon e a amplificação de apenas uma banda da região intergênica 16S-23S rRNA é padrão para espécie, podendo ser observadas outras, de acordo com o polimorfismo das cepas (TYLER et al., 1995; BAUERNFEIND et al., 1998).

O sequenciamento de DNA e a utilização de primers na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a amplificação do genoma de bactérias tem sido desenvolvidos para auxiliar na diferenciação do mormo frente à melioidose e de outros microrganismos (YABUUCHI et al, 1992; GEE et al, 2003; GODOY et al, 2003).

A utilização da PCR para diagnóstico do mormo representa um grande avanço no que diz respeito à redução no tempo de execução, minimização de resultados falso-positivos, diferenciação intra-espécies (principalmente *B. mallei* de *B. pseudomallei*), além de permitir que o controle da referida doença seja feita de maneira mais eficiente (ULRICH et al., 2006; SHOLTZ et al., 2006; SILVA et al., 2009).

2.7. Controle e profilaxia

Além de regulamentar os métodos de diagnóstico, a IN 24 de 2004 estabelece medidas de controle e prevenção para o mormo e consideram como foco a propriedade que apresente um ou mais animais com diagnóstico positivo conclusivo, devendo esta ser imediatamente interditada e submetida a um regime de saneamento. Os animais diagnosticados como positivos devem ser imediatamente sacrificados e incinerados ou enterrados no próprio local. Deve ainda ser realizada a desinfecção das instalações e fômites sendo, portanto, todos os procedimentos feitos sob supervisão do serviço veterinário oficial. Os demais equídeos negativos deverão ser submetidos a dois testes de fixação de complemento (FC) num intervalo de 45 a 90 dias. O controle de trânsito animal no âmbito internacional, interestadual e intermunicipal deve ser feito de forma eficiente e para participação de equídeos em eventos hípicas deve ser exigida a apresentação do exame negativo para mormo, obedecendo ao prazo de validade e que estes não apresentem sintomas clínicos da doença (BRASIL, 2004).

Não se recomenda tratar os animais infectados pela *B. mallei*, pois essa bactéria é intracelular facultativa, o que dificulta a atuação de antibióticos, uma vez que as mesmas são capazes de residir nos vacúolos das células eucarióticas (WAAG e DESHAZER, 2004).

Quanto à vacinação, Amemiya et al. (2002) produziram uma vacina experimental reduzindo a patogenicidade do agente por irradiação da cápsula de polissacarídeo; em seguida foi avaliada em camundongos, mas não ofereceu proteção contra as amostras patogênicas do tipo selvagem da *B. mallei*.

Entretanto, segundo Kenny et al. (1999) não existe uma vacina profilática ou terapêutica para a infecção por *B. mallei* disponível para seres humanos ou animais.

Outras medidas eficientes de controle que devem ser adotadas para evitar a disseminação do agente nas criações é o isolamento dos animais recém adquiridos ou que tenham sintomas sugestivos da doença até que se tenha a confirmação laboratorial do diagnóstico; aquisição de animais comprovadamente livres da doença, desinfecção das instalações, evitar as baias e os cochos coletivos, fornecer alimentação e mineralização adequados (MOTA et al., 2000).

3. Objetivos

3.1. Geral:

Desenvolver e avaliar um teste ELISA indireto a partir de extrato protéico de *Burkholderia mallei* isolada de equídeo no estado de Pernambuco para diagnóstico sorológico do mormo.

3.2. Específicos:

Isolar e identificar fenotípica e genotipicamente amostras de *Burkholderia mallei* no estado de Pernambuco;

Produzir e extrair a PPD-maleína a partir de amostra de *Burkholderia mallei* isolada de equídeo com mormo;

Calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, além da concordância entre o ELISA indireto e o teste de fixação do complemento para o diagnóstico da doença.

4. Referências

AL-ANI F.K., AL-DELAIMI A.K. & ALIA. H. 1987. Glanders in horses: clinical and epidemiological studies in **Iraq. Pakist. Vet. J.** 7:126-129.

AL-ANI F.K., AL-RAWSASHDEH O.F., ALI H.A., HASSAN F.K. 1998. Glanders in horses: clinical, biochemical and serological studies in **Iraq. Vet. Archiv** 68, 155-162.

AL-ANI F. K., ROBERSON J. 2007. Glanders in horses: A review of the literature **Vet. Archiv** 77 (3), 203-218.

ALIBASOGLU M., CALISLAR T., INAL T., CALSIKAN U. 1986. Malleus outbreak in lions in the Istanbul Zoological Garden. Berl **Munich. Tier. Wschr.** 99, 57–63.

ALMEIDA A.M.R. e LIMA J.A.A. 2001. Princípios e técnicas de diagnose em fitovirologia. Brasília/Fortaleza: Publicação **SBF**.

AMEMIYA K., BUSH G.V., DESHAZER D., WAAG D.M. 2002. Nonviable *Burkholderia mallei* induces a mixed Th1 and Th2 – like cytokine response in BALB/c mice. **Infect Immun.** 70, 2319-2325.

ARUN S., NEUBAUER H., GUREL A. 1999. Equine glanders in Turkey. **Vet. Rec.** 144, 255–258.

BALDER R., LIPSKI S., LAZARUS J.J., GROSE W., WOOTEN R.M., HOGAN R.J., WOODS D.E. e LAFONTAINE E.R. 2010. Identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* adhesins for human respiratory epithelial cells. **BMC Microbiology**. 10:250 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/250>.

BATRA H.V., CHAND P., GANJU L., MUKHERJEE R. and SADANA J.R., 1989. Dot-enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies in cattle brucellosis. **Res. Vet. Sci.**, 46:143-146.

BATTS-OSBORNE D., REGA P.P., HALL A.H., MCGOVERN T.W. 2001. Glanders and melioidosis. **Emedicine J.** 48, 1–12.

BAUERNFEIND A., ROLLER C., MEYER D., JUNGWIRTH R. & SCHNEIDER I. 1998. Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **J. Clin. Microbiol.** 36(9):2737-2741.

BAZARGANI T.T., TADJBAKHS H., BADII A., ZAHRAEI T. 1996. The outbreak of glanders in some racehorses in three states of Iran. **J. Eq. Vet. Sci.** 16:232-236.

BLANCOU J. 1994. Les anciennes methodes de surveillance et de controle de la morve. **Bulletin Societé Vétérinaire Prat. de France.** v. 78, n. 01, p. 35-54.

BLUMBERG R.S., HARTSHORN K.L., ARDMAN B., KAPLAN J.C., PARADIS T., VOGT M., HIRSCH M.S. and SCHOOLEY R.T., 1987. Dot immunobinding assay for detection of human immunodeficiency virus-associated antigen. **J. Clin. Microbiol.**, 25:1989-1992.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 24 de 05 de abril de 2004. Brasília, DF – 2004.

BURTICK M.N., BRETT P.J., WOODS D.E. 2002. Molecular and physical characterization of *Burkholderia mallei* O antigens. **J. Bacteriol.** 184 (3), 849-852.

Center for Food Security and Public Health (CFSPH) – Iowa State University. Glanders (Farcy, Malleus, Drees). August, 31 de 2007.

CHAND P., BATRA H.V. and SADANA, J.R., 1988. Detection of brucella specific protein-A reactive antibodies in buffaloes by dot-enzyme-linked immunosorbent assay. **Vet. Rec.**, 122:162-163.

Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV. **Decreto N.º 5.053, de 22 de Abril de 2004.** Aprova o Regulamento de Fiscalização de Produtos de Uso Veterinário e dos Estabelecimentos que os Fabriquem e/ou Comerciem, e dá outras providências.

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.

DALL'STELLA R., KRIEGER M.A., BURGER M., AGOTTANI .B., CHAHAD-EHLERS S., THOMAZ-SOCCOL V. 2007. Development of bioprocess for the production of purified protein derivative with Brazilian strains of *M. tuberculosis* for diagnosis use. **J Biotec**, 127, 278-287.

DESHAZER D., WAAG D.M., FRITZ D.L., WOODS D.E. 2001. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and

demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. **Microb. Pathog.** 30, 253–269.

FRITZ D.L., VOGEL P., BROWN D.R., WAAG D.M. 1999. The Hamster Model of Intraperitoneal *Burkholderia mallei* (Glanders). **Vet. Pathol.** 36, 276–291.

FRITZ D.L., VOGEL P., BROWN D.R., DESHAZER D., WAAG D.M. 2000. Mouse Model of Sublethal and Lethal Intraperitoneal Glanders (*Burkholderia mallei*). **Vet. Pathol.** 37, 626–636.

FRITZ M.T., WOODS D.E. 2003. Characterization of experimental equine glanders. **Microb. Infection.** 5, 1125-1131.

GANGULEE R.C., SEN G.P. & SHARMA G.L. 1966. Serological diagnosis of glanders by haemagglutination test. **Ind. Vet. J.** 43(5):386-391.

GEE E.J., SACCHI C.T., GLASS M.B., DE B.K., WEYANT R.S., LEVETT P.N., WHITNEY A.M., HOFFMASTER A.R., POPOVIC T. 2003. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **J. Clin. Microbiol.** 41 (10), 4647-4654.

GILARDI G.L. 1985. *Pseudomonas*. En: **M. Clin. Microb.** Fourth Edition, Lenette E.H., Bulawo A., Hausler W.J. & Shadomy H.J., eds. American Society for Microbiology, Washington DC, USA, 350–372.

GODOY D., RANDLE G., SIMPSON A.J., AANENSEN D.M., PITT T.L., KINOSHITA R., SPRATT B.G. 2003. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **J. Clin. Microbiol.** 41, 2068-2079.

GREGORY B.C., WAAG D.M. 2009. Glanders. **Med. Aspect. of Biolog. Warf.** 6, 121-146.

HARLEY V.S., DANCE D.A.B., DRASAR B.S., TOVEY G. 1998. Effects of *Burkholderia pseudomallei* and other *Burkholderia* species on eukarotic cells in tissue culture. **Microb.** 96, 71–93.

HENNING M.W. 1956(b). Glanders, Farcy, Dries, Malleus. Animal diseases in South Africa being an account of the infectious diseases of domestic animals. Third edition (completely revised) including a description of a number of diseases not reported in the previous edition. Johannesburg (South Africa): **Central News Agency Ltd.**

HENNING M.W. 1956(a). Animal Diseases in South Africa. 3rd ed. **Central News Agency**, Kelvin.

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

HUTYRA F., MAREK J., MANNIGER R. 1973. Patologia y terapêutica especiales de los animales domesticos. 11 ed., v. 1, **Barcelona: Editorial Labor**, Barcelona, 800p.

IBGE, 2009. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso 17/03/2011.

JUBB K.V.F., KENNEDY P.C. & PALMER N. 1993. Pathology of domestic animals. 4ª ed. Vol. 2. **Preas**, Inc.

KENNY D.J., RUSSELL P., ROGERS D., ELEY S.M., TITBALL R.W. 1999. *In vitro* susceptibilities of *Burkholderia mallei* in comparison to those of other pathogenic *Burkholderia* spp. **Antimicrob. Agents Chemother.** 43:2773–2775. [PubMed: 10543761].

KÖHLER W. 2006. Killed in action: Microbiologists and clinicians as victims of their occupation. Part 4: Tick-borne Relapsing Fever, Malta Fever, Glanders, SARS. **Intern. J. of Med. Microbiol.**, v.296, p.1-4.

KRIEG N.R., HOLT J.G. 1984. Gram–negative aerobic rods and cocci. En: **B. Man. Syst. Bacteriol.** Vol. 1. Williams & Wilkins, Baltimore, USA & London, UK, 174–175.

KUMAR S., BAND A.H., SAMANTARAY J.C., DANG N. and TALWAR G.P. 1985. A dot-enzymelinked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Entamoeba histolytica*. **J. Immunol. Methods**, 83: 125-133.

KUMAR S., MOUDGIL K.D., BAND A.H., NARAYANAN P.R., GUPTA S.K., SHARMA A.K. and TALWAR G.P., 1986. A dot-enzyme immunoassay for detection of IgM antibodies against phenolic glycolipid-I in sera from leprosy patients. **Indian J. Lepr.**, 58:185-190.

LANGENEGGER J., DÖBEREINER J. & LIMA A.C. 1960. Foco de mormo (*Malleus*) na região de Campos, estado do Rio de Janeiro. **Arqs Inst. Biol. Animal**, Rio de J., 3:91-108.

LIMA R.A.S., SHIROTA R., BARROS G.S.C. 2006. Centro de estudos avançados em economia aplicada ESALQ/USP – Estudo do complexo do agronegócio cavalo. Relatório Final, Piracicaba-SP.

MADRUGA C.R., ARAÚJO F.R. de, SOARES C.O. 2001. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. 360p. **EMBRAPA Gado de Corte**, Campo Grande-MS.

MANNINGER S. e MOCSY J. 1968. Patología y terapéutica especiales de los animales domesticos. 2 ed. BARCELONA: Editorial Labor, 600p.

MATTHEWS, R. and BURNIE, J., 1988. Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. **J. Clin. Microbiol.**, 26: 459-463.

MILLER W.R., PANNELL L., CRAVITZ L., TANNER W.A., INGALLS M.S. 1948. Studies on certain biological characteristics of *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei*: I. morphology, cultivation, viability, and isolation from contaminated specimens. **J. Bacteriol.** 55:115–26.

MOTA R.A., BRITO, M.F., CASTRO, F.J.C., MASSA, M. 2000. Mormo em equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesq. Vet. Bras.* v. 20, n. 4, p. 155-159.

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

MOTA R.A., OLIVEIRA A.A.F., PINHEIRO JÚNIOR J.W., SILVA L.B.G. et al. 2010. Glanders in donkeys (*Equus asinos*) in the state of Pernambuco, Brasil: A Case Report. **Braz. J. Microbiol.** 41, 146-149.

NAUREEN A., SAQIB M., MUHAMMAD G., HUSSAIN M.H., MUHAMMAD N. 2007. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. **Asi. J. Vet. Diagn. Invest.** 19, 362–367.

NEUBAUER H., FINKE E.-J. & MEYER H. 1997. Human glanders. *International Review of the Armed Forces Medical Services*, LXX, 10/11/12, 258–265.

NEUBAUER H., SPRAGUE L.D., ZACHARIA R., TOMASO H., AL DAHOUK S., WERNERY R., WERNERY U. & SCHOLZ H.C. 2005. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. **J.Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.**, 52, 201–205.

NIUMSUP P., WUTHIEKANUN V. 2002. Cloning of the class D beta-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and -resistant strains. **J. Antimicrob. Chemother** 50(4):445-455.

OIE – WAHID, World Animal Health Information Database Interface. 2000 - online version. [<http://www.oie.int>].

OIE – WAHID, World Animal Health Information Database Interface. 2007 - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. **Oie.int/eng/en_index.htm**. 01:01-17.

OIE – WAHID, World Animal Health Information Database Interface. 2008 - **Glanders**. Chapter 2.5.11.

OIE – WAHID, World Animal Health Information Database Interface. 2010a – Animal Health Information-Incidência de la enfermedad por país 2005-2010, **<http://www.oie.int/wahis/public.php>**, acesso em 04/06/2010.

OIE – WAHID, World Animal Health Information Database Interface. **Glanders**. Cap. 2.5.8, acesso em maio de 2010. <http://www.oie.int/eng/normes>

PIMENTEL W. 1938. História e organização do serviço veterinário do exército. **Revista Militar Medicina Veterinária**. v. 01, n. 04, p. 283-322.

PRITCHARD D.G. Glanders. **Equine Vet. Educ.** v. 07, p. 29, 1995.

RABELO S.S.A., SOARES P.C., MOTA R.A. 2006. Indicadores clínicos em muareis naturalmente infectados pela *Burkholderia mallei*. **Vet. Zootec.** 13, 54-62.

RADOSTITS O.M., GAY C.C., BLOOD D.C. e HINCHCLIFF K.W. 2002. **Clínica veterinária**. 9. (ed.). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 800p.

RIBOT W.J., ULRICH R.L. 2006. The animal pathogen-like type III secretion system is required for the intracellular survival of *Burkholderia mallei* within J774.2 macrophages. **Infect. Immun.** 74, 4349–4353.

ROTZ L.D., KHAN A.S., LILLIBRIDGE S.R., OSTROFF S.M. and HUGHES J.M. 2002. Public Health Assessment of Potential Biological Terrorism Agents. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA. **Emerging Infectious Diseases** Vol. 8, No. 2, February.

SAMRAKANDI M.M., RIDENOUR D.A., YAN L., CIRILLO J.D. 2002, Entry into host cells by *Legionella*. **Front. Biosci.** 7:d1-11.

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

SCHLATER L.K. 1992. Glanders, in Current Therapy in Equine Medicine. **W.B. Saunders**, St. Louis, MO.

SHARRER G.Y. 1995. The great glanders epizootic USA, In: **A Civil War legacy. Agric. History.** V. 69, p. 79-97.

SHOLTZ, H.C.; JOSEPH, M.; TOMASO, H.; DAHOUK, S.; et al. 2006. 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. **Diag Microbiol Infect Dis.** 54, 241-247.

SHUMILOV K.V. 1974. Comparative study of methods of diagnosis of glanders in horses in Mongolia. Trudy, Veses. Nogo. **Inst. Eksperiment. Vet.** 42:272-282.

SILVA, L.G.B.; SILVA NETO, J. B.; BRITO, M. F.; et al. 2005. Lesões anátomo-histopatológicas em cobaias (*cavia porcellus*), experimentalmente infectados pela *Burkholderia mallei*. **Arq. Inst. Biol.**, 72, (1), 23-28.

SILVA K.P.C., MOTA R.A., CUNHA A.P., SILVA L.B.G. et al. 2009. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** 29(5), 439-444.

SILVA K.P.C. **Produção e avaliação da proteína derivada (PPD) de *Burkholderia mallei* para o diagnóstico imuno-alérgico do mormo em equídeos.** 2010. 98f. Tese. (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

SPRAGUE L.D., ZACHARIAH R., NEUBAUER H., WERNERY R., JOSEPH M., SCHOLZ H.C. and WERNERY U. 2009. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. **BMC Veterinary Research**, 5:32.

SRINIVASAN A., KRAUS C.N., DESHAZER D., BECKER P.M., DICK J.D., SPACEK L., BARTLETT J.G., BYRNE W.R., THOMAS D.L. 2001. Glanders in a military research microbiologist. **N. Engl. J. Med.** 345:256-8.

STEVENS J.M., ULRICH R.L., TAYLOR L.A. et al. 2005. Actin-binding proteins from *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* can functionally compensate for the actin-based motility defect of a *Burkholderia pseudomallei* bimA mutant. **J. Bacteriol.** 187, 7857–7862.

ST GEME J.W. 1997. Bacterial adhesins: determinants of microbial colonization and pathogenicity. **Adv. Pediatr.** 44:43-72.

TANDON A., MURTHY P.K., SAXENA R.P., SEN A.B. and SAXENA K.C. 1988. Dot-ELISA for diagnosis of lymphatic filariasis. **Indian J. Med. Res.**, 87: 429-433.

TIZARD I.R. 2002. *Imunologia Veterinaria. Uma Introdução.* 6.ed. Roca, São Paulo-SP.

TYLER S.D., STRATHDEE C.A., ROZEE K.R., and JOHNSON W.M. 1995. 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.

ULRICH R.L., ULRICH M.P., SCHELL M.A., KIM H.S., DeSHAZER, D. 2006. Development of a polymerase chain reaction for the specific identification of *Burkholderia mallei* and differentiation from *Burkholderia pseudomallei* and others closely related Burkholderiaceae. **Diag Microbiol Infect Dis.**, 55, 37-45.

University Pittsburgh Medical Center – UPMC. Fact Sheet *Burkholderia mallei* Glanders and *Burkholderia pseudomallei* Melioidosis. Available at www.upmc-biosecurity.org Updated 11/08/2007.

VERMA R.D., SHARMA J.K., VENKATESWARAN K.S. and 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. Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam.

VERMA R.D., VENKATESWARAN K.S., SHARMA J.K. & AGARWAL G.S. 1994. Potency of partially purified malleo-proteins for mallein test in the diagnosis of glanders in equines. **Vet. Microbiol.** 41:391-397.

VERMA R.D. Diagnosis and control of glanders in equids. 1998. **Proceedings...** Conference on a International equine infection diseases, p. 99-101.

VOSKUHL G.W., CORNEA P., BRONZE M.S., GREENFIELD R.A. 2003. Other bacterial diseases as a potential consequence of bioterrorism: Q fever, brucellosis, glanders, and melioidosis. **J. Okla. State. Med. Assoc.** 96, 214–217.

WAAG D.M., DESHAZER D. 2004. Glanders: new insights into an old disease. *In*: LINDLER L.E., LEBEDA, F.J., KORCH G.W. editors. Biological Weapons Defense: Infectious Diseases and Counterbioterrorism. NJ, **USA: Humana Press Inc.**; p. 209-237.

WHITLOCK G.C., ESTES D.M. and TORRES A.G. 2007. Glanders: of to the races with *Burkholderia mallei* – minireview. Federation of European Microbiological Societies - **FEMS Microbiol. Lett.** 277:115–122.

WINSTANLEY C. et al., 1998. Flagellin gene variation between clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei* contraststs with the invariance among clinical isolates. **J. Med. Microbiol.**, v. 47, p. 689-694.

WINTZER H.J. 1990. Doenças dos equinos. São Paulo: Manole, 438p.

WOODS D.E. 2002. The use of animal infection models to study the pathogenesis of melioidosis and glanders. **Trends in Microbiol.** v. 10, n. 11, p. 483-485.

YABUUCHI E., KOSAKO Y., OYAIZU H., YANO I., HOTTA H., HASHIMOTO Y., EZAKI T., ARAKAWA M. 1992. Proposal of *Burkholderia* genus and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus. **J. Microbiol. Immunol.** 36, 1251-1275.

ZHANG W.D. & LÚ Z.B. 1983. Application of an indirect haemagglutination test for the diagnosis of glanders and melioidosis. **Chin. J. Vet. Med.** 9:8-9.

5. Artigo

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DO MORMO EM EQUÍDEOS

(Artigo formatado para o periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos

ABSTRACT.- [Standardization and evaluation of an indirect ELISA for the serological diagnosis of glanders in horses.] Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):000-000. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Av. Dom Manuel de Medeiros s/nº, Recife, PE 52171-900 – Dois Irmãos, Brasil. E-mail: rinaldo.mota@hotmail.com

Glanders is an infectious-contagious disease of acute or chronic character which principally affects horses, causing enormous losses in the productive chain of this animal. To control the disease, the Ministry of Agriculture, Husbandry and Supply instituted mandatory sanitation measures in the entire national territory which include an official diagnosis through the complement fixation (CF) test, maleinization and sacrifice of the animals that are positive. Nowadays the kits used for the diagnosis of the disease are imported, making their routine application difficult and more expensive. The objective of this study was to standardize an indirect ELISA test, using the proteic extract of *Burkholderia mallei* isolated from a carrier horse in the state of Pernambuco. The samples were cultivated in 10% blood agar and incubated for 48h at 37°C; later, one of the isolated colonies was characterized phenotypically and genotypically and immediately cultivated in brain heart infusion (BHI) for enrichment; then it was peaked (repicada) for the Dor-set Henley medium which was incubated at 37°C under 60rpm for eight weeks. To standardize the test the Protein G Peroxidase Sigma Conjugate was used in the dilution of 1:90.000, with serums diluted in 1:100 and the antigen in 1:400. Sixty serums were used as negative controls, tested before the CF to determine the cutting point which was 0.042nm. After establishing the standardization, 300 samples were tested, of which 99% (297) were in agreement with the results obtained in the CF. At the end, of assay presented 100% sensibility and 98.2% specificity, with predictive (predictivo) positive and negative values of 97.7% and 100% respectively. The *Kappa* concordance test was 0.98 and the intra and interplac repeatability were 8.8% and 10.3% respectively. From the results obtained, it is possible to affirm that the indirect ELISA test can be used as an efficient diagnosis tool. However, more essays must be carried out to consolidate the reliability of this test.

INDEX TERMS: *Burkholderia mallei*, serology, ELISA, diagnosis.

RESUMO.- O mormo é uma enfermidade infecto-contagiosa de caráter agudo ou crônico que acomete principalmente os equídeos, causando enormes prejuízos na cadeia produtiva do cavalo. Para controlar a enfermidade o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) instituiu medidas sanitárias obrigatórias em todo território nacional que incluem o diagnóstico oficial pela fixação do complemento (FC), maleinização e sacrifício dos animais positivos. Os kits atuais utilizados no diagnóstico da doença são importados, dificultando e encarecendo sua aplicação na rotina. Objetivou-se com este estudo padronizar um teste de ELISA indireto utilizando o extrato protéico de *Burkholderia mallei* isolada a partir de equídeo portador no estado de Pernambuco. As amostras foram cultivadas em ágar sangue 10%, incubada por 48h a 37°C; posteriormente caracterizou-se fenotípica e genotipicamente uma das colônias isoladas, e em seguida a cultivou em BHI para enriquecimento; logo após, esta foi repicada para o meio Dor-set Henley o qual foi incubado a 37°C sob 60rpm por oito semanas. Para padronização do teste utilizou-se o conjugado Proteína G Peroxidase Sigma na diluição de 1:90.000, com soros diluídos em 1:100 e o antígeno em 1:400. Utilizou-se 60 soros como controle negativo testados frente à FC para determinação do ponto de corte o qual ficou em 0,042nm. Feitas as padronizações, foram testadas 300 amostras, onde 99% (297) foram concordantes com os resultados obtidos na FC. Ao final, o ensaio apresentou 100% de sensibilidade e 98,2% de especificidade com valores preditivo positivo e negativo de 97,7% e 100%, respectivamente. O teste de concordância *kappa* foi 0,98 e a repetibilidade intra e interplaca ficaram em 8,8 e 10,3%, respectivamente. Diante dos resultados obtidos durante os ensaios, conclui-se que o teste de ELISA indireto pode ser utilizado como uma ferramenta de diagnóstico eficiente. Entretanto, mais ensaios devem ser realizados visando consolidar a confiabilidade do referido teste.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Burkholderia mallei*, sorologia, ELISA, diagnóstico.

INTRODUÇÃO

O mormo é uma doença bacteriana causada pela *Burkholderia mallei*, sendo considerada uma das mais antigas doenças que acometem os equídeos. A bactéria causa lesões primárias na porta de entrada e na cadeia linfática adjacente (Mota 2006). O diagnóstico do mormo pode ser realizado por meio da associação dos aspectos clínico-epidemiológicos e anátomo-histopatológicos. Entretanto, a identificação microbiológica, inoculação em animais de laboratório, reação imunoalérgica (maleinização), testes sorológicos como fixação do complemento (FC), ensaio imuno-enzimático (ELISA), contra imunoelctroforese, hemaglutinação indireta, reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e o teste de rosa bengala são exames complementares que auxiliam no fechamento do diagnóstico (Naureen et al. 2007). A doença ressurgiu no Brasil após várias décadas sem relatos oficiais (Mota et al. 2000). Para o diagnóstico oficial e controle do mormo no país, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) aprovou a Instrução Normativa nº 24 em abril de 2004, a qual preconiza a FC e o teste da maleína como exames complementares para a identificação de animais infectados (Brasil 2004).

Embora a FC tenha uma sensibilidade de aproximadamente 90% a 95%, as reações falso-negativas são ocasionalmente observadas no soro de animais jovens, gestantes e idosos e reações falso-positivas também ocorrem em aproximadamente 1% dos soros testados onde atribui-se ao uso de antígeno composto por células inteiras (Cravitz & Miller 1950, OIE 2008a). Além disso, existem entraves quanto a padronização insuficiente do antígeno, o que pode comprometer a qualidade da reação, resultando em limitações no que diz respeito à especificidade e sensibilidade da técnica. Alguns pesquisadores ainda questionam a eficácia e aplicabilidade do referido ensaio (Jana et al. 1982, Verma et al. 1990, Neubauer et al. 2005, Naureen et al. 2007).

O teste de ELISA indireto é bastante utilizado com finalidade de identificar, inclusive quantificar anticorpos em amostras de soro, recebendo destaque especial quando se trata de estudos soroepidemiológicos (Madruga, Araújo & Soares 2001). Trata-se de um tipo de ensaio que mede a interação entre o antígeno e o anticorpo, não dependendo de um segundo fenômeno como precipitação, aglutinação ou fixação do complemento (Tizard 2002).

Considerando a necessidade de ampliar as possibilidades de diagnóstico do mormo no Brasil, realizou-se com esta pesquisa com o objetivo de desenvolver e avaliar um ensaio imunoenzimático (ELISA indireto) para o diagnóstico do mormo em equídeos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção da amostra de *Burkholderia mallei*. As amostras de *Burkholderia mallei* utilizadas no ensaio imunoenzimático foram obtidas por meio da punção aspirativa do conteúdo purulento de nódulos cutâneos de três equídeos com diagnóstico clínico de mormo no estado de Pernambuco. Para o isolamento da bactéria, as amostras biológicas foram cultivadas em ágar enriquecido com sangue de ovino a 10%. Posteriormente, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48h (OIE 2008a). As colônias que apresentaram características morfológicas semelhantes à *B. mallei* foram coradas pelo método de Gram e submetidas às provas bioquímicas e moleculares de identificação (Burtnick, Brett & Woods 2002, Mota et al. 2005).

Caracterização fenotípica e genotípica da *B. mallei*. As colônias isoladas foram submetidas a testes de identificação bioquímica de oxidase, catalase, Voges Proskauer (V.P.), Vermelho de Metila (V.M.), produção de H₂S (gás sulfídrico), motilidade, indol, hidrólise da arginina, gás de D-glucose, liquefação da gelatina, urease, fermentação de carboidratos (glicose, maltose, galactose, lactose, frutose, manose, sacarose e manitol) de acordo com Mota et al. (2005). Após a caracterização fenotípica, as amostras foram submetidas à técnica de ribotipagem-PCR e RAPD-PCR utilizando-se o *primer* 5'-TGC CGA GCT G-3' (Leelayuwat et al. 2000).

Produção e extração da PPD-maleína. Para a produção do derivado protéico purificado (PPD-maleína), as amostras foram ressuscendidas em solução salina (0,85%) e inoculadas em caldo Dorset Henley. Posteriormente, o meio foi incubado a 37°C sob agitação durante oito semanas. Após o período incubação, realizou-se a esterilização em banho-maria a 100°C por três horas e em seguida a filtração em membrana 0,22µm para remover as células bacterianas e substâncias indesejadas.

Adicionou-se ao filtrado o ácido tricloroacético para precipitação das proteínas, permanecendo em repouso por 24 horas em temperatura ambiente. O sobrenadante da mistura foi decantado e descartado e o precipitado foi centrifugado por 15 minutos a 2.500g. O precipitado foi lavado quatro vezes em solução de NaCl a 5% (pH 3,0). Em seguida o precipitado foi dissolvido com um mínimo de solvente alcalino, resultando em um pH 6,7. O produto final foi um líquido castanho escuro, o que caracteriza a maleína concentrada (Silva 2010).

A maleína concentrada foi centrifugada e o sobrenadante diluído em igual quantidade de solução tampão de glicose. A PPD-maleína de concentração 1,69mg/mL (dosado no Qubit® Fluorometer Invitrogen) foi então colocada em ampolas esterilizadas, rotuladas e refrigeradas (Verma et al. 1994, OIE 2008b).

Sensibilização dos animais. Para obtenção de soros controle positivo, cinco éguas foram sensibilizados por via sub-cutânea (SC) com 1mL do antígeno inativado na concentração de 5mg/mL e tiveram seu sangue coletado nos momentos zero (dia da inoculação), com 15 e 60 dias após a inoculação.

Padronização do ELISA. O ELISA-i foi padronizado de forma a se obter as melhores condições de diferenciação entre soros positivos e negativos e maior rendimento dos reagentes. O antígeno utilizado foi a maleína diluída seriadamente (1/100, 1/200, 1/400 e 1/800) e titulada frente às diluições 1/50, 1/100 e 1/200 dos soros. Como controles foram utilizados um pool de cinco soros negativos e de cinco soros positivos definidos através do teste de fixação do complemento. O conjugado de proteína-G peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) foi titulado frente ao antígeno e aos soros nas diluições 1/80000, 1/90000 e 1/100000.

O teste foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços com alta capacidade de adsorção (Greiner Bio-one). As placas foram sensibilizadas com o antígeno (PPD-maleína) e incubadas em câmara úmida durante duas horas a 37°C. Foram realizadas três lavagens com PBS contendo 0,1% tween 20 (v/v) (PBS-T) e as reações foram bloqueadas pela adição de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo leite em pó desnatado (LPD) a 4% (p/v) seguida de incubação por 1 hora a 37°C em câmara úmida. Após três lavagens com PBS-T, 100µL das amostras de soros diluídas em PBS contendo LPD a 2% (p/v) e 10mM de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) (p/v) foram distribuídas em cada poço e as placas foram incubadas em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Após nova lavagem com solução salina tamponada com fosfato contendo Tween 20 (PBS-T), 100µL do conjugado de proteína G-peroxidase diluído foram distribuídos por poço e as placas foram incubadas por mais uma hora e posteriormente lavadas cinco vezes com PBS-T. Em seguida, 100µL de solução tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 5,0 contendo 0,1mg/mL de 3,3', 5,5'- tetramethylbenzidine (TMB) e 0,02% de peróxido de hidrogênio (v/v) foram adicionados à reação. Após 15 minutos, a reação foi bloqueada com 100µL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em leitor de microplacas com filtro ajustado em 450nm.

A repetibilidade do teste foi avaliada pelo cálculo do coeficiente de variação entre cinco repetições numa mesma placa (intraplaca) e entre cinco placas (interplacas), utilizando cinco soros negativos e cinco positivos, conforme recomendações da OIE (2010).

Para estimativa preliminar do ponto de corte foi realizada uma análise do desvio padrão das médias de 60 soros classificados como negativos no teste de fixação do complemento, empregando o teste *t* de Student (Frey, Canzio & Zurakowski 1998) com intervalo de confiança de 95%.

Após a padronização das concentrações dos antígenos, soro e conjugado, o ELISA foi avaliado considerando-se seus valores intrínsecos (sensibilidade e especificidade), bem como o indicador de concordância ajustado (*Kappa=k*) (Pereira 1995), com base no teste de 300 amostras de soros equinos classificadas previamente como positivas (129 amostras) e negativas (171 amostras) na fixação do complemento (FC), obtidas em dois laboratórios de diagnóstico credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para diagnóstico do mormo.

RESULTADOS

Características fenotípicas e genotípicas. A interpretação dos testes fenotípicos demonstrou que o agente comportou-se como oxidase (+), catalase (+), Voges Proskauer (-), Vermelho de Metila (-), produção de H₂S (-), motilidade (-), indol (-), hidrólise da arginina (+), gás de D-glucose (+), liquefação da gelatina (-), urease (-), glicose (+), maltose (-), galactose (+), lactose (+), frutose (+), manose (+), sacarose (-) e manitol (+). Genotipicamente, a cepa selecionada para o ELISA apresentou padrão de amplificação de 1000pb da região espaçadora intergênica 16S-23S rRNA.

Padronização do ELISA. Após a realização de ensaios confrontando as diversas diluições possíveis tanto do antígeno quanto dos soros e do conjugado, verificou-se que as melhores diluições foram 1/400 do antígeno, com os soros diluídos em 1/100 e o conjugado de proteína-G peroxidase na diluição de 1/90000. Com isso, obteve-se uma intensa diferenciação entre as amostras positivas e negativas com razão positivo/negativo (P/N) de 47. A razão P/N foi calculada a partir da divisão da média do valor das amostras positivas pela média das amostras negativas.

Quanto à dosagem protéica da maleína concentrada, o valor observado foi de 1,69mg/mL e a mesma após ter sido distribuída nos poços das microplacas apresentou concentração de 0,0004mg/µL.

O ponto de corte estimado a partir do teste de 60 soros classificados como negativos na fixação do complemento (FC) foi de 0,042nm. O ELISA demonstrou boa repetibilidade com coeficiente de variação (CV) intraplaca de 8,8% e interplacas de 10,3%.

Os resultados dos soros testados no ELISA-i estão apresentados no Quadro 1, onde se observou sensibilidade de 100% e especificidade de 98,2% com ótima concordância ($k= 0,98$ - concordância ótima) com a técnica de FC. Com relação aos valores preditivo positivo e negativo, estes foram 97,7% e 100% respectivamente.

Quadro 1. Resultado dos testes de 300 amostras séricas de equinos submetidas aos testes de fixação do complemento e ELISA-i para pesquisa de anticorpos contra o Mormo.

Teste		Fixação do Complemento		Total
		Positivo	Negativo	
ELISA	Positivo	129	3	132
	Negativo	0	168	168
Total		129	171	300

Quanto à leitura realizada nos soros dos cinco animais obtidos na segunda coleta, observou-se um aumento dos anticorpos em todos os animais quando comparado com a primeira, seguido de um decréscimo aos 60 dias (terceira leitura) da inoculação da bactéria inativada. O animal número 02 apresentou uma resposta imune diferente dos demais nos três momentos. Este animal apresentou-se ainda como negativo frente ao teste de FC, porém ao ser analisado no ELISA-i o mesmo apresentou resultado positivo.

Os valores das densidades ópticas (DO) dos cinco soros de equinos submetidos à inoculação da bactéria inativada estão representados na figura 1.

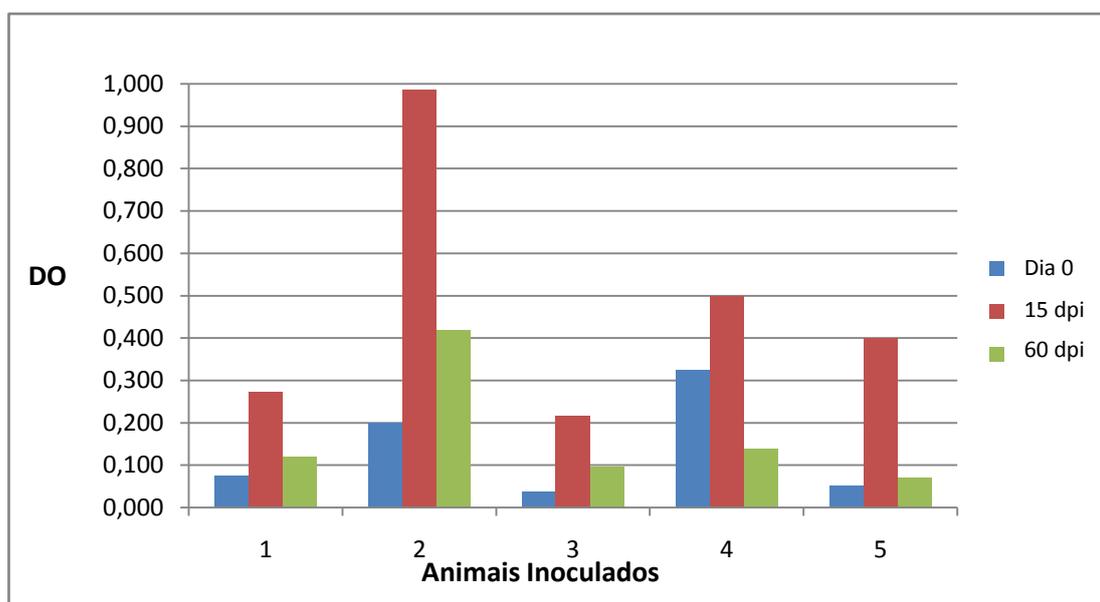


Figura 1 – Resposta imunológica de equinos sensibilizados com *Burkholderia mallei* inativada, avaliada no teste ELISA-i, nos dias zero, 15 e 60 pós-inoculação da bactéria.

DISCUSSÃO

O resultado obtido na análise fenotípica permitiu identificar os isolados como *B. mallei*, pois as colônias apresentaram características bioquímicas idênticas às observadas anteriormente por Yabuuchi et al.

(1992), Al-Ani, Al-Rawashdeh & Hassan (1998), Mota et al. (2005), Silva et al. (2008) e Silva et al. (2009). Os achados genotípicos também foram compatíveis com os achados descritos por Silva et al. (2009).

Nesse estudo, a concentração proteica da PPD-maleína utilizada para sensibilizar as placas do ELISA foi de 1,69mg/mL, mostrando-se suficiente para uso no teste sorológico. Valor semelhante também foi observado por Santurio et al. (2006) que padronizaram um ELISA indireto (ELISA-i) para o diagnóstico da pitiose equina e utilizaram 1mg/mL, contudo, Dantas (2004) ao padronizar um ELISA indireto para Maedi-Visna utilizou concentração de 0,5mg/mL e conseguiu obter resultados satisfatórios em sua pesquisa.

Os valores do coeficiente de variação (CV) tanto intra quanto interplaca apresentaram compatibilidade com as informações da OIE (2006) que preconiza que um teste com boa repetibilidade deve apresentar CV com valores abaixo de 20%, o que é necessário para ser padronizado.

Os valores de sensibilidade e especificidade encontrados nesse estudo foram de 100% e 98,2%, respectivamente, caracterizando o teste de ELISA-i como sendo um ensaio que não apresenta resultados falso-negativos. Valores semelhantes também foram encontrados por Médici, Alfieri & Alfieri (2000) que estudaram 983 soros bovinos para avaliar um ELISA comercial para o diagnóstico do Herpesvírus Bovino tipo 1 (HBV-1) e encontraram 100% de sensibilidade e 94,88% de especificidade. Santurio et al. (2006) também estudaram 116 soros de equinos para padronização de ELISA-i para pitiose e encontraram 97,72% de sensibilidade e 90,27% de especificidade. Semelhança com os valores obtidos neste estudo também foi verificado por Paredes et al. (1999) que ao analisaram 937 amostras de soro suíno para a padronização de um ELISA-i para peste suína clássica (PSC) e obtiveram 98,21% de sensibilidade e 92,86% de especificidade, definindo que o ELISA-i é um teste apropriado para o diagnóstico da PSC. Apesar dos valores preditivo positivo (VPP) e preditivo negativo (VPN) terem sido distintos, o elevado percentual do segundo assegura que animais que venham ser negativos no teste de ELISA-i, realmente não tenham a doença. Seguindo-se o que é preconizado pela OIE (2006) quanto à padronização e avaliação de testes diagnósticos, os valores de sensibilidade e especificidade de um ensaio são considerados ótimos quando superam os apresentados pelo *gold test*, como é o caso dessa pesquisa.

Mesmo havendo uma ótima concordância do ELISA-i quando comparado com o teste de fixação de complemento (FC) que possui sensibilidade em torno dos 90% a 95%, este último tem o risco de apresentar reações falso-negativas ocasionalmente observadas no soro de alguns animais (jovens, gestantes ou idosos), além de reações falso-positivas que podem ocorrer em aproximadamente 1% dos soros testados ao se utilizar antígeno de células inteiras, o que o leva a ser superado pelos resultados obtidos no ELISA-i (Cravitz & Miller 1950, Verma et al. 1990). O animal gestante que apresentou resultado positivo no ELISA e negativo na Fixação de Complemento, provavelmente deve-se à limitação desse último teste, que pode apresentar resultados falsos-negativos, especialmente em soros de burros, mulas e animais gestantes (Gregory & Waag, 2008).

A diferença de DO observada nos resultados do ELISA-i frente aos soros dos cinco equinos submetidos à inoculação da bactéria inativada deve-se, provavelmente ao padrão de resposta inflamatória de cada animal. A intensidade dessa resposta irá depender do grau de infecção de cada equino (Amemiya et al. 2002).

A redução na quantidade de anticorpos, observada nos animais 60 dias após a inoculação com a *B. mallei* inativada provavelmente está relacionada ao período de soroconversão causado pelas proteínas desse agente que é de no máximo dois meses (Hagebock et al. 1993). Entretanto, exposições constantes de animais às proteínas do agente podem promover uma soroconversão permanente (Gregory & Waag 2008).

As vantagens do desenvolvimento de um teste sorológico com antígeno nacional é o baixo custo de produção e, conseqüentemente, um provável aumento na aquisição do *kit* para diagnóstico o que poderá promover elevação do número de exames realizados, contribuindo com a redução dos casos da doença e até mesmo acelerar o processo de erradicação da doença no território nacional. Além disso, tendo em vista que espécies do gênero *Burkholderia* podem sofrer alterações em seu genótipo, principalmente quando se trata de cepas oriundas de regiões geográficas distintas (Silva et al. 2009), acredita-se que um *kit* nacional produzido a partir de cepas nacionais possa reduzir significativamente os índices de resultados falso-positivos observados atualmente na FC.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no ELISA-i, acredita-se que o teste é promissor para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos no Brasil. Sua versatilidade e praticidade, além do tempo empregado para realização o classificam como um teste que pode substituir a FC. Entretanto, ainda é necessária a realização de outros ensaios com maior número de amostras para realizar a etapa de padronização.

Agradecimentos.- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (processo nº 578044/2008-0), à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Pernambuco – FACEPE (processo nº APQ- 0772-5.05/06) pelo financiamento desta pesquisa e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA pelo apoio.

REFERÊNCIAS

- Al-Ani F.K., Al-Rawashdeh O.F., Ali A.H. & Hassan F.K. 1998. Glanders in horses: clinical, biochemical and serological studies in Iraq. *Vet. Archiv.* 68, 155-162.
- Amemiya K., Bush G.V., DeSHAZER D. & Waag D.M. 2002. Nonviable *Burkholderia mallei* induces a mixed Th1 and Th2 – like cytokine response in BALB/c mice. *Infect. Immun.* 70, 2319-2325.
- Brasil 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Instrução Normativa nº 24 de 05 de abril de 2004.
- Burtneck M.N., Brett P.J. & Woods D.E. 2002. Molecular and physical characterization of *Burkholderia mallei* O antigens. *J. Bacteriol.* 184 (3), 849-852.
- 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.
- Dantas T.V.M. Desenvolvimento e padronização de ELISA indireto para diagnóstico de maedi-visna vírus em ovinos. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado para o Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária da Universidade Estadual do Ceará. 2004.
- Frey A., Di Canzio J. & Zurakowski D. 1998. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. *Journal of Immunological Methods* 221 35-41.
- Gregory B.C. & Waag D.M. 2008. Glanders. Chapter 6.
- Hagebock J.M., Schlater L.K., Frerichs W.M. & Olson D.P. 1993. Serologic responses to the mallein test for glanders in solipeds. *J. Vet. Diag. Invest.* 5, 97-99.
- Jana A.M., Gupta A.K., Pandya G., Verma R.D. & Rao K.M. 1982. Rapid diagnosis of glanders in equines by counter-immunoelectrophoresis. *Indian Vet. J.* 59, 5-9. 155.
- Leelayuwat C., Romphruk A., Lulitanond A., Trakulsomboon S. & Thamlikitkul V. 2000. Genotype analysis of *Burkholderia pseudomallei* using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD): Indicative of genetic differences amongst environmental and clinical isolates. *Acta Tropica.* 77:229-237.
- Madruga C.R., Araújo F.R. de & Soares C.O. 2001. Imunodiagnóstico em Medicina Veterinária. 360p. EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande-MS.
- Médici K.C., Alfieri A.A. & Alfieri A.F. 2000. Ensaio imunoenzimático comercial no diagnóstico sorológico das infecções por herpesvírus bovino 1. *Ciência Rural, Santa Maria*, v. 30, n. 2, p. 343-346.
- Mota, R. A., Brito M. F., Castro F. J. C. & Massa M. 2000. Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesq. Vet. Bras.* 20 (4), 155-159.
- Mota R.A., Silva L.B.G., Silva K.P.C., Silva Neto J.B., Cunha A.P. & Nascimento Sobrinho E.S. 2005. Caracterización bioquímica y perfil de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de muestras de *Burkholderia mallei* aisladas de équidos de la región nordeste de Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, 72(1), 7-11.
- Mota R.A. 2006. Aspectos etiopatológicos, epidemiológicos e clínicos do mormo. *Vet. e Zootec.* v.13, n.2, p.117-124.
- Naureen A., Saqib M., Muhammad G., Hussain M.H. & Muhammad N. 2007. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *Asi. J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 362-367.
- Neubauer H., Sprague L.D., Zacharia R., Tomaso H., Al Dahouk S., Wernery R., Wernery U. & Scholz H.C. 2005. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public. Health.*, 52, 201-205.
- OIE – Organização Internacional de Epizootias. 2006. Manual de testes diagnósticos e vacinas para animais terrestres. Disponível em: <http://www.oie.int>. acesso: dez/2011.
- OIE – Organização Internacional de Epizootias. 2008(a) - Glanders. Chapter 2.5.11.
- OIE – Organização Internacional de Epizootias. 2008(b). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. Principles of validation of diagnostic assays for infectious diseases. URL: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/1.1.04_valid.pdf, pp.34-45.
- OIE – Organização Internacional de Epizootias. WAHID, World Animal Health Information Database Interface. Disponível em www.oie.int – Acessado em: 06 de junho de 2010.
- Paredes J.C.M., Oliveira L.G., Braga A.C., Trevisol I.M. & Roehe P.M. 1999. Development and standardization of an indirect ELISA for the serological diagnosis of classical swine fever. *Pesq. Vet. Bras.* 19(3/4):123-127, jul./dez.
- Santurio J.M., Leal A.T., Leal A.B.M., Alves S.H., Lübeck I., Griebler J. & COPETTI M.V. 2006. *Pesq. Vet. Bras.* V. 26, nº1, Rio de Janeiro. Jan./mar.
- Silva K.P.C., Mota R.A., Cunha A.P., Silva L.B.G., Leal N.C., Cavalcanti Y.V.N., Teles J.A.A., Pereira M.C.C. & Freitas N.S. 2009. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 29(5), 439-444.
- Silva K.P.C. 2010. Produção e avaliação da proteína derivada (PPD) de *Burkholderia mallei* para o diagnóstico imuno-alérgico do mormo em equídeos. 98f. Tese. (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- Tizard I.R. 2002. *Imunologia Veterinária. Uma introdução.* 6.ed. Roca, São Paulo-SP.
- 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.
- Verma R.D., Venkateswaran K.S., Sharma J.K. & Agarwal G.S. 1994. Potency of partially purified malleo-proteins for mallein test in the diagnosis of glanders in equines. *Vet. Microbiol.* 41:391-397.