

KARLA PATRÍCIA CHAVES DA SILVA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DERIVADA
(PPD) DE *Burkholderia mallei* PARA O DIAGNÓSTICO IMUNO-
ALÉRGICO DO MORMO EM EQUÍDEOS**

RECIFE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

KARLA PATRÍCIA CHAVES DA SILVA

**PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DERIVADA
(PPD) DE *Burkholderia mallei* PARA O DIAGNÓSTICO IMUNO-
ALÉRGICO DO MORMO EM EQUÍDEOS**

Tese apresentada ao proGrama de Pós-graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutora em Ciência Veterinária

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota

Co-orientador: Galba Maria de Campos Takaki

RECIFE- PERNAMBUCO

Julho/2010

Ficha catalográfica

S586p Silva, Karla Patrícia Chaves da

Produção e avaliação da proteína derivada (PPD) de
Burkholderia mallei para o diagnóstico do mormo em
equídeos / Karla Patrícia Chaves da Silva – 2010.

98 f.: il.

Orientador: Rinaldo Aparecido Mota

Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, 2010.

Inclui referências e anexo

1. Doenças bacterianas 2. Diagnóstico 3. Mormo
4. Sanidade eqüídeos I. Mota, Rinaldo Aparecido, orientador
II. Título

CDD 636.0896014

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA DERIVADA (PPD) DE
***Burkholderia mallei* PARA APLICAÇÃO NO DIAGNÓSTICO IMUNO-**
ALÉRGICO DO MORMO

Tese de Doutorado elaborada por

KARLA PATRÍCIA CHAVES DA SILVA

Aprovada em/...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Orientador- Departamento de Medicina Veterinária

Dr^a Tomoe Noda Saukas

Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

Dr Mateus Matiuzzi da Costa

Colegiado Zootecnia - UNIVASF

Dr José Wilton Pinheiro Júnior

Unidade Acadêmica de Garanhuns - UFRPE

Dr Leonildo Bento Galiza da Silva

Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos, esposo e filha Amanda, luz da minha vida, os quais justificam a minha existência, sem vocês não seria possível concretizar esse sonho.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pela minha existência, por estar sempre em tudo que faço nos momentos de alegria celebrando a vida e nas dificuldades me protegendo e auxiliando meu crescimento espiritual.

Aos meus pais Marivaldo Manuel da Silva e Maria de Fátima Chaves da Silva (*in memoriam*) pela família, educação e infância perfeita que me proporcionaram e reflete até hoje em minha vida.

Ao meu esposo e companheiro Vilmar Tomaz da Silva, pelo amor, alegria, confiança, incentivo, apoio incondicional e paciência nos momentos mais difíceis.

À minha filha Amanda Chaves da Silva, o amor mais sublime e por me presentear todos os dias com o mais lindo e inocente sorriso.

Aos meus irmãos, amores e companheiros de toda vida: Andréa Karla e Marivaldo Júnior;

À Rosa, esposa do meu pai, e aos meus mais novos irmãos Victor e Victória, os quais sempre me trazem muita felicidade nesta caminhada.

Ao professor Rinaldo Aparecido Mota (meu mestre), pela orientação de uma vida, pela convivência, sabedoria, serenidade, amor e respeito com que trata o próximo. Por sua confiança e apoio, e cuja ética e visão de futuro estarão comigo como referência de atuação profissional.

Aos meus tios (Ronaldo Faustino e Maria da Conceição) e primos (Ana Mirella e Otávio Wesley), pelo amor, apoio incondicional, carinho, ajuda, hospedagem... em todos os momentos desta trajetória.

À co-orientação imprescindível da professora Galba Maria de Campos Takaki, pela disponibilidade para realização de passos fundamentais deste projeto e conhecimentos transmitidos que auxiliaram na conclusão deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bacterioses da UFRPE, especialmente ao professor Leonildo Bento Galiza (meu grande amigo) por sua disponibilidade e tantas outras qualidades. À Andrey Telles e André Souza pelo auxílio, empenho e espírito de equipe durante a realização dos experimentos; e aos demais que sempre contribuíram com muito carinho.

Aos professores Mateus Matiuzzi (UNIVASF), Wagner Pereira (UNIVASF) e Antônio Flávio Dantas (UFCG), pela contribuição em momentos importantes na realização deste trabalho.

Aos colegas do laboratório do Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais da UNICAP, à Alicia Jará, pela colaboração sempre espontânea e afável.

Aos Professores Wagner Porto (UFAL), Wilson Porto (UFAL) e Flaviana Vanderley (UNCISAL), pela grande amizade, oportunidade de convivência e carinho.

Aos alunos e professores do curso de Medicina Veterinária da UFAL, pelo apoio incentivo e compreensão nos momentos de maior dificuldade.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

Objetivou-se nesse estudo produzir e avaliar PPD-maleína com potencial para aplicação no diagnóstico do mormo a partir da purificação de proteínas imunogênicas de *Burkholderia mallei* isoladas de equídeos com mormo no Brasil. As bactérias foram isoladas e caracterizadas fenotipicamente por meio da detecção da atividade de proteases, polifenoloxidasas e esterases, além da determinação do perfil de resistência à antimicrobianos *in vitro*. Para produção e purificação parcial da maleína foram utilizadas duas estirpes de *B. mallei* brasileiras fenotípica e genotipicamente caracterizadas. Inoculou-se as amostras em caldo Dorset-Henley para metabolizar e obter as proteínas bacterianas. As proteínas foram separadas e precipitadas com ácido tricloroacético e sulfato de amônia. As PPDs maleína foram concentradas em 1,0mg/mL e na avaliação realizada em cobaios previamente sensibilizados com a bactéria foram eficazes na identificação dos animais verdadeiros positivos e na exclusão dos verdadeiros negativos. Avaliou-se a PPD-maleína quanto a sua potência em cinco asininos com sinais clínicos e diagnóstico bacteriológico e sorológico positivo para o mormo e em cinco asininos negativos na sorologia e bacteriologia. As amostras de *B. mallei* estudadas foram sensíveis à gentamicina, ciprofloxacina, norfloxacina, doxiciclina e enrofloxacina, e resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol, amoxicilina e ampicilina. Observou-se a atividade de proteases, ausência de esterases e polifenoloxidasas e o crescimento bacteriano em meio de cultura resultou em metabólitos tóxicos. A análise histológica do local de aplicação da maleína, em cobaias, revelou o desenvolvimento de hipersensibilidade do tipo IV. Os asininos foram testados de acordo com os critérios estabelecidos pela IN nº24 do Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento referente ao diagnóstico do mormo. Após 48 horas da inoculação, observou-se edema na área da injeção, presença de secreção ocular e lacrimejamento, confirmando-se o diagnóstico do mormo. Os outros animais sorologicamente negativos não apresentaram reação inflamatória no local de inoculação da PPD-maleína. Esse imunógeno produzido e em fase de teste no Brasil é uma nova alternativa para o diagnóstico e controle do mormo no país.

PALAVRAS-CHAVE: Mormo, maleína, hipersensibilidade, equídeos.

ABSTRACT

The objective this study produce and evaluate PPD-mallein with potential for application in the diagnosis of glanders from of the the production and purification of immunogenic proteins of *B. mallei* isolates from equines with glanders in Brazil. Were isolated and characterized phenotypically and by detecting the activity of proteases, polyphenol oxidases, esterases and determination of the resistance profile in vitro. Samples of *B. mallei* studied were susceptible to antimicrobial gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin, doxycycline and enrofloxacin and resistant to trimethoprim / sulfamethoxazole, amoxicillin and ampicillin. Was observed the activity of proteases, absence esterases polyphenyloxidase and bacterial growth resulted in toxic metabolites. For the production and purification of the protein partially mallein were used two strains of *B. mallei* Brazilian already characterized phenotypically and genotypically. Was inoculated broth samples Dorset-Henley to metabolize and get the bacterial proteins. Proteins were separated and precipitated with trichloroacetic acid and ammonium sulphate. The PPD-mallein were concentrated at 1.0 mg / mL and evaluation in guinea pigs previously sensitized with bacter were effective for identifying infection in animals truly positive and exclude the animals truly negative. Histological analysis of the application site of mallein revealed the development of Type IV hypersensitivity. Was evaluated the PPD-mallein about their power in five asinines with clinical signs, with bacteriological diagnosis and positive serology for glanders and five asinines negative in serology and bacteriology. The animals were tested according to the criteria established by paragraph IN n°24 regarding the diagnosis of glanders. After 48 hours of inoculation, there was swelling in the area of injection, presence of ocular discharge and tearing confirming the diagnosis of glanders. The other seronegative animals showed no inflammatory reaction at the site of inoculation of PPD-mallein. This immunogen produced and being tested in Brazil was effective being a new possibility for diagnosis and control of glanders in this country.

KEY WORDS: Glanders, mallein, Type IV hypersensitivity, equines.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Artigos Científicos

Artigo 1

- Figura 1- Presença de halo de protease em amostras de *B. mallei* isoladas de eqüídeos com mormo no Brasil 53

Artigo 2

- Figura 1- Perfil eletroforético em SDS PAGE de extrato protéico de *B. mallei* (maleína), onde: M: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Biorad); 1: 10 µL de extrato protéico de *B. mallei*. 68

- Figura 2 – Avaliação da reação imuno-alérgica cutânea em 48 horas após a inoculação das PPDs-maleínas no grupo de cobaios sensibilizados. 69

- Figura 3 – 01: pele. Observa-se trombo e fibras musculares necróticas com discreto infiltrado mononuclear H.E. obj 20X; 02 – foto submacroscópica da pele com área localmente extensa de ulceração da epiderme e restos necróticos limitada por infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico na derme profunda e subcutâneo; 03 - foto submacroscópica da pele apresentando área localmente extensa de ulceração da epiderme com restos necróticos e infiltrado de neutófilos aglomerados na derme profunda e subcutâneo; 04 – foto submacroscópica da pele com abscessos no subcutâneo; 05 – pele íntegra com abscesso no subcutâneo. HE. Obj. 20X e 06 – Pele ulcerada com acentuada presença de infiltrado de neutrófilos na derme superficial e profunda. 70

Artigo 3

- Figura 1- Olho esquerdo de *Equus asinus* negativo para o mormo e inoculado com PPD-maleína brasileira. – ausência de reação inflamatória. 81

- Figura 2- Teste de Maleinização positivo com PPD-maleína brasileira – edema e secreção da pálpebra inferior direita em *Equus asinus* 81

LISTA DE GRÁFICOS

Artigos Científicos

Artigo 2

- Gráfico 1- Avaliação da concentração de proteínas em três momentos na produção da PPD-maleína, PPD-maleína 01 (azul) e PPD-maleína 02 (verde). 68
- Gráfico 2 - Avaliação das reações imunoalérgico-cutâneo resultantes das inoculações intradérmicas de PPD-maleína 01 e PPD-maleína 02. LE: lateral esquerda, LD: lateral direita e mm: milímetros. 69
- Gráfico 3- Descrição da frequência de lesões encontradas na análise histopatológica da pele de cobaios reagentes a maleinização com PPD-maleína 01 e 02. 71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
G	Gramas
g/L	Gramas por litros
H ₂ S	Ácido sulfídrico
Mm	Micrometro
ml	Microlitro
Mg	MicroGrama
Mm	Milímetros
ml	Mililitros
V	Volt
ATCC	American Type Cell Culture
BHI	Brain Heart Infusion
CIP	Colletion de Institut Pasteur
DFA	Delegacia Federal de Agricultura
ELISA	Ensaio imuno enzimático
FC	Fixação do Complemento
HTT	Hipersensibilidade do Tipo Tardia
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Instrução Normativa
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MIC	Concentração Mínima Inibitória

NaCl	Cloreto de Sódio
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standarts
NCTC	National Collection of Type Culture
OIE	World Animal Health Organization
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PPD	Proteína Purificada Derivada
PPM	Partes por milhões
SDS- PAGE	Eletroforese de Gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio
SSA	Serviço de Sanidade Animal
Th-1	Linfócito T Helper
UF	Unidade Federativa
UFC	Unidade Formadora de Colônias
VP	Voges Proskauer
V	Volts

ANEXOS

Normas Brazilian Journal of Microbiology	84
Normas Journal of Biotechnology	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Geral.....	18
2.1 Específicos.....	18
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
3.1 Definição.....	19
3.2 Etiologia.....	19
3.3 Epidemiologia.....	20
3.4 Patogenia e Sinais Clínicos.....	22
3.5 Patologia.....	25
3.6 Diagnóstico.....	26
3.7 Tratamento.....	30
3.8 Controle e Profilaxia.....	30
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
5 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	
5.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, PERFIL DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E TOXICIDADE DE <i>Burkholderia mallei</i> ISOLADAS DE EQUÍDEOS NO BRASIL	40
5.2 PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PPD-MALEÍNA PARA DIAGNÓSTICO DO MORMO EM EQUÍDEOS	54
5.3 AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA MALEÍNA PRODUZIDA NO BRASIL PARA O DIAGNÓSTICO DO MORMO	72
CONSIDERAÇÕES FINAIS	82

1 INTRODUÇÃO

A equideocultura é uma atividade que demanda pequenas áreas para a criação, o que vem atraindo investimentos em todas as regiões brasileiras, mesmo aquelas de alta densidade demográfica. De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2008), a população de equídeos no país está estimada em 8.108.648, sendo 5.602.053 equinos, 1.163.316 asininos e 1.343.279 muares, a região nordeste detém 25,6%, 91,4% e 51,1%, respectivamente, do rebanho nacional. Os equídeos utilizados nos serviços de carga e sela apresentam menor tempo de vida produtiva útil que gira em torno de quatro anos, dependendo das condições de manejo e sanidade (GREGORY e WAAG, 2009).

Quanto aos aspectos sanitários dos rebanhos, as afecções do trato respiratório acompanhadas de complicações sistêmicas determinam elevado índice de mortalidade, contribuindo negativamente na cadeia produtiva da equideocultura. Nas últimas décadas verificou-se um aumento significativo na frequência e gravidade das doenças do sistema respiratório, relacionadas ao ambiente, estado geral dos animais e agentes patogênicos, destacando-se as bactérias, vírus e fungos (ADDO, 1983; AL-ANI e AL-DELAIMI 1988; THUMMAKUL et al., 1999). Nesse contexto destaca-se o mormo que é uma doença infecto-contagiosa causada pela *Burkholderia mallei* e que acomete principalmente o sistema respiratório, linfático e cutâneo dos equídeos e na última década dizimou populações de animais, principalmente na região Nordeste do Brasil (MOTA et al., 2000).

A doença é diagnosticada por meio da detecção de anticorpos no sangue, utilizando-se a técnica de fixação do complemento (FC) como teste de triagem. A limitação da técnica está relacionada à baixa especificidade do teste conduzindo algumas vezes a resultados falso-positivos, sendo sua maior vantagem a boa sensibilidade. Para confirmar os casos suspeitos ou positivos na FC utiliza-se a maleinização que tem como princípio a resposta imune celular (reação de hipersensibilidade tipo IV). A especificidade da maleína é superior aos demais testes já padronizados para o diagnóstico do mormo. Para realização desse teste, o extrato protéico de *B. mallei* (Proteína Purificada Derivada - PPD-maleína) é inoculado por via

intradérmica na pálpebra inferior do equídeo suspeito (VERMA et al., 1994; BRASIL, 2004).

A PPD-maleína atualmente usada para confirmar os casos suspeitos da doença no Brasil apresenta algumas limitações, pois esse imunógeno é importado, gerando alguns entraves quanto aos trâmites na importação de derivados biológicos de outros países. Essa maleína é fiscalizada e utilizada pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), a partir da solicitação de prova confirmatória pelo proprietário ou de Serviço de Defesa Sanitária Animal. Esse teste é realizado por órgão oficial de cada Estado.

De acordo com Dall’Stella et al. (2007), o desenvolvimento da PPD bacteriana tem ampla utilidade como imunógeno em métodos de diagnóstico, aplicável em geral a doenças de baixa resposta humoral e maior imunidade celular, aumentando assim a especificidade no diagnóstico da doença. PPD-maleína é obtida através do bioprocessamento de produção protéica a partir das cepas bacterianas.

Os esforços voltados para viabilizar o diagnóstico do mormo no Brasil são de grande importância para as ações de controle da doença. Nesse sentido, o desenvolvimento e a padronização de técnicas de diagnóstico de alta sensibilidade e especificidade são de grande relevância para erradicar a doença do território nacional.

Considerando a necessidade de contribuir para o diagnóstico e controle da doença no país com o objetivo de baratear os custos de produção e importação da PPD-maleína realizaram-se experimentos para produzir, purificar e avaliar a PPD-maleína, utilizando estirpes de *B. mallei* isoladas no Brasil. Acredita-se que esse imunógeno poderá viabilizar a rotina da aplicação da técnica e contribuir para uma maior eficiência no diagnóstico da doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Produzir e avaliar uma PPD-maleína com potencial para aplicação no diagnóstico do mormo a partir da purificação de proteínas imunogênicas de *B. mallei* isoladas de equídeos no Brasil.

2.2 Específicos

- Caracterizar fenotípica e genotipicamente os isolados de *B. mallei* recuperados de equídeos naturalmente infectados nos estados de Pernambuco e Alagoas;
- Avaliar a resposta de anticorpos por meio da reação de fixação do complemento em cobaios sensibilizados com *B. mallei* inativada;
- Avaliar a inocuidade, segurança e potência da PPD-maleína em cobaios previamente sensibilizados;
- Estudar as reações histológicas da derme de cobaios inoculados com PPD-maleína;
- Avaliar a resposta da aplicação intradermopalpebral da PPD-maleína em equídeos comprovadamente positivos e negativos para o mormo no teste de fixação do complemento.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Definição

O mormo é uma enfermidade infecto-contagiosa causada pela *Burkholderia mallei*. Acomete de forma grave os equídeos e o homem, sendo que outras espécies de mamíferos também podem ser afetadas de forma menos agressiva pela doença (HIRSH e ZEE, 2003).

3.2 Etiologia

B. mallei, anteriormente classificada nos gêneros *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Loefflerella*, *Pfeifferella*, *Malleomyces*, *Actinobacillus* e *Pseudomonas*, foi incluída no gênero *Burkholderia* sp em 1992 (YABUUCHI et al., 1992). É um bacilo Gram-negativo que se cora em tom rosa claro e mede de 2-5µm de largura. Na microscopia eletrônica nota-se uma cobertura similar à cápsula composta de carboidratos com função de proteção celular contra condições ambientais desfavoráveis; não esporula e é imóvel, característica usada para diferenciá-la de *B. pseudomallei* (MUHAMMAD et al., 1998; MOTA et al., 2005; NAUREEN et al., 2007; SILVA et al., 2009).

O bacilo do mormo é aeróbio, oxidase e catalase-positivo, reduz nitrato, hidrolisa a ureia, descarboxilisa a lisina, não produz pigmento, cresce a 37°C em 48 horas e reduz a glicose por oxidação (AL-ANI et al., 1998). Vários fatores de virulência de *B. mallei* foram identificados e caracterizados destacando-se o lipolissacarídeo capsular (DeSHAZER et al., 2001; ULRICH e DeSHAZER, 2004; RIBOT e ULRICH 2006).

B. mallei é agente infeccioso considerado pela OIE (2007) de alto potencial de virulência para os animais e o homem. Foi utilizada por alguns países como arma biológica em ações de bioterrorismo (ROTZ et al., 2002; VOSKUHL et al., 2003; SILVA et al., 2008); a manipulação da bactéria ou material potencialmente infectado deve seguir os requisitos de segurança para patógenos do grupo 3 (OIE 2007).

No ambiente, o microrganismo é pouco resistente à dessecação, luz solar, calor, desinfetantes, e em condições adversas à sobrevivência não passa de duas semanas; entretanto em condições favoráveis de crescimento pode resistir por meses. O hipoclorito de sódio (500 ppm), iodo, mercúrio e álcool, desinfetantes amoniacais e permanganato de potássio são os desinfetantes mais eficazes contra *B. mallei*. Os fenólicos são menos efetivos (HIRSH e ZEE, 2003).

3.3 Epidemiologia

O mormo é naturalmente esporádico em equídeos e raro em humanos e a maioria dos países já erradicaram essa doença. Há relatos de sua ocorrência no norte da África, Oriente Médio, África do Sul, América e Europa Oriental (OIE, 2003).

No século passado, a doença foi erradicada do oeste da Europa, Austrália e América do Norte por uma política rigorosa de eliminação de animais positivos nos testes de Fixação do Complemento (FC), Soroaglutinação e teste imunoalérgico (NEUBAUER et al., 2005).

A doença é conhecida há vários séculos e foi introduzida no Brasil por meio da importação de equídeos da Europa. Foi considerada extinta desde 1968 no território nacional quando foi feita a última notificação oficial (MOTA et al., 2000). A redução da frequência dos casos foi associada à progressiva substituição da tração animal pela motorizada e o emprego de medidas de controle e erradicação da doença no mundo.

Inquéritos sorológicos e microbiológicos conduzidos em 1999 e 2000 detectaram a presença da infecção em alguns estados da região nordeste do Brasil, e de acordo com a OIE (2010), o mormo se distribui em várias regiões do país. Suspeita-se que a doença nunca tenha sido extinta no Brasil e que essas descrições sejam apenas a identificação de focos que vinham ocorrendo nos últimos anos (MOTA et al., 2000).

Segundo notificações oficiais realizadas pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) sobre o mormo em equídeos, entre 2005 e 2010 foram registrados 152 casos no Brasil nos Estados de Alagoas (11,18%), Amazonas (1,32%), Ceará (5,26%), Maranhão (0,66%), Paraíba (26,32%), Pernambuco (27,63%), Piauí (0,66%), Pará (3,29%), Rio Grande do Norte (21,71%) e São Paulo (1,97%). O caso mais recente de mormo em equino foi registrado em Sobradinho – Distrito Federal, confirmado no dia 21 de abril de 2010.

Na Bahia foram sacrificados 32 animais suspeitos em 2008, entretanto esses casos não foram confirmados oficialmente (OIE, 2010). Os dados publicados podem não refletir a realidade da doença no Brasil devido a sub-notificação de alguns casos suspeitos e dos animais que morrem sem diagnóstico.

Os equídeos são os reservatórios da *B. mallei* e podem se infectar e disseminar o agente para outros animais aumentando a frequência dos casos. A secreção do sistema respiratório e linfático são fontes de infecção da bactéria para animais sadios e homem. A transmissão geralmente ocorre por contato entre animais, através da inalação ou ingestão da bactéria em alimentos (em comedouros e bebedouros), além dos objetos perfurantes contaminados. O período de incubação varia de poucos dias a meses (MONLUX, 1984; LOPEZ et al., 2003).

A transmissão ocorre com maior frequência em regiões de clima quente e úmido, devido à facilidade de sobrevivência da bactéria que se mantém viável por mais tempo na cama, esterco, ração, comedouros e bebedouros (VERMA, 1981; MOTA, 2006; GREGORY e WAAG, 2009). Equipamentos de uso coletivo dos animais como ferramentas de limpeza de cascos, chicotes, arreios, escovas de limpeza, entre outros podem servir de veículo para o agente (BATTS-OSBORNE et al., 2001; MOTA, 2006). A transmissão vertical natural (intra-uterina) da égua para o proto já foi confirmada embora não seja comum (WOODS, 2002), bem como a transmissão sexual (ALIBASOGLU et al., 1986).

B. mallei se dissemina entre os animais de criações, onde a doença é esporádica, com a introdução de equídeos infectados em propriedades livres, através da movimentação desses animais que participam de eventos hípicas como feira, leilões ou vaquejadas (AL-ANI e ROBERSON, 2007).

A enfermidade pode ocorrer em outras espécies como felídeos silvestres de vida livre e em cativeiro; ainda são susceptíveis os camelos, lhamas e lobos. Os carnívoros podem se infectar por meio da ingestão de carne crua contaminada, contudo os bovinos, ovinos e suínos são resistentes (SRINIVASAN et al., 2001; WAAG e DeSHAZER, 2004; KOHLER, 2006).

Os animais de laboratório são susceptíveis à infecção por *B. mallei* e modelos experimentais já foram realizados em ratos (FRITZ et al., 2000), hamsters (FRITZ et al., 1999) e cobaias (MOTA et al., 2008).

Os asininos são considerados mais propensos a desenvolver a forma aguda do mormo e os equinos são acometidos geralmente pela doença crônica ou latente. Os muares apresentam tanto a forma aguda como a crônica da doença, assim como as infecções latentes (VERMA, 1981; AL-ANI et al., 1998; GREGORY e WAAG, 2009).

Os seres humanos são considerados hospedeiros acidentais. A transmissão da *B. mallei* do equídeo para o homem é rara, mesmo nos casos de estreita convivência com animais infectados, que pode ser explicada pela baixa concentração bacteriana para produzir infecção e a suscetibilidade espécie-específica às estirpes virulentas (DeSHAZER et al., 2001). A transmissão homem-homem, através de objetos, água ou alimentos contaminados também é rara (ARUN et al., 1999; WOODS, 2002). No laboratório, as culturas de *B. mallei* em aerossóis são altamente infecciosas, representando um grave risco para microbiologistas e técnicos de laboratório (BATTS-OSBORNE et al., 2001).

3.4 Patogenia e Sinais Clínicos

A bactéria causadora do mormo é intracelular facultativa e pode invadir, sobreviver e se multiplicar em linhagens de células fagocíticas (HARLEY et al., 1998; RIBOT e ULRICH, 2006). Este patógeno escapa à ação fagocitária em vacúolos no citoplasma onde pode se reproduzir evitando a resposta imune humoral.

B. mallei é a única espécie imóvel do gênero, mas apresenta motilidade intracelular conferida pela habilidade que o microrganismo possui de repolimerizar a actina do citoesqueleto da célula infectada. Esta propriedade é conferida pelo gene *bimA_{BM}* que permite à bactéria transferir-se de uma célula para outra sem ter o contato com outros fatores antibacterianos presentes no espaço intercelular. Essa característica estimula uma resposta imune celular e o desenvolvimento de hipersensibilidade do tipo IV ou tardia com formação de granulomas. Desta forma consegue evadir das defesas do hospedeiro (STEVENS et al., 2005; RIBOT e ULRICH, 2006).

Em infecções experimentais de cobaias comprovou-se que *B. mallei* produz uma cápsula antifagocítica (DeSHAZER et al., 2001), que é um importante fator de virulência para instalação da infecção e ocorrência da doença. A estrutura da cápsula descrita neste estudo ainda é desconhecida, entretanto a sequência de codificação da cápsula de *B. mallei* é 99% idêntica à da *B. pseudomallei* sua possível ancestral (BATTS-OSBORNE et al., 2001; DeSHAZER et al., 2001; RECKSEIDLER et al., 2001). Além disso, cepa mutante sem cápsula é avirulenta em camundongos e hamsters e *B. thailandensis* que é uma espécie apatogênica do gênero é destituída de cápsula (DeSHAZER et al., 2001).

Ulrich et al. (2004) demonstraram por meio de infecção experimental que amostras mutantes desprovidas do aparato de secreção do tipo IV se tornaram avirulentas. Resultados semelhantes foram obtidos por Ulrich e DeShazer (2004) que demonstraram que amostras que sofreram deleção de genes relacionados ao aparato de secreção do tipo III se tornaram avirulentas.

O Lipopolissacarídeo (LPS) é essencial à sobrevivência do agente e confere resistência aos fatores bactericidas do soro. É sabido que em infecções sistêmicas ocasionadas por bactérias Gram-negativas, níveis elevados de LPS na circulação ocasionam o choque endotóxico que muitas vezes é o fator que determina a evolução rápida e fatal da doença (BURTNICK et al., 2002).

O microrganismo tem afinidade por vasos linfáticos e pode ser encontrado dentro e fora das células do hospedeiro. Algumas cepas de *B. mallei* podem produzir uma endotoxina que afeta células musculares lisas de vários órgãos (AL-ANI e ROBERSON, 2007). O curso clínico crônico da doença se deve a sua capacidade de resistir e persistir durante a infecção e escapar do sistema imunológico (DeSHAZER et al., 2001).

As lesões primárias do mormo ocorrem na porta de entrada (faringe) e a infecção se expande ao longo da cadeia linfática produzindo linfangite e nódulos ao longo dos linfonodos. A bactéria causa septicemia (fase aguda) e bacteremia (fase crônica), localizando-se nos pulmões, pele e mucosa nasal e, em alguns casos, em outros órgãos. Na infecção por meio de feridas cutâneas o agente passa para o sangue e é transportado a diferentes órgãos. A infecção pulmonar pode disseminar-se para o baço, fígado e pele (RADOSTITS et al., 2002; MOTA, 2006; RABELO et al., 2006).

Na mucosa respiratória dos equídeos desenvolvem-se nódulos inflamatórios, que fistulam e formam úlceras; a cicatrização dessas úlceras dá origem a lesões na mucosa nasal em forma de estrela. A infecção pulmonar produz pneumonia e pleurite, acompanhada de formação de abscessos que se apresentam junto com uma progressiva debilidade respiratória, tosse, dispnéia e febre. As lesões pulmonares são acentuadamente mais graves nos muares do que nos equinos (FRITZ e WOODS, 2003; MOTA, 2006; RABELO et al., 2006).

Rabelo et al. (2006) demonstraram em estudo realizado em muares no estado de Pernambuco que a descarga nasal purulenta geralmente bilateral, presença de estertores, hipertrofia de linfonodos submandibulares, caquexia, apatia e edema de membros são os sinais clínicos mais frequentes do mormo independentemente da fase da doença.

A infecção do sistema linfático pode levar à linfadenopatia regional, linfangite e formação de nódulos (MUHAMMAD et al., 1998). Tipicamente os vasos linfáticos passam a ser visíveis ou palpáveis. Nódulos, medindo de 0,5 a 2,5cm, ao longo dos vasos linfáticos podem se romper, exsudando conteúdo purulento denso e amarelado (WOODS, 2002). Os linfonodos apresentam-se aumentados e firmes e, dificilmente fistulam. A cadeia linfática dos membros torácicos é menos comprometida que a dos membros pélvicos, onde se observa a formação do edema com maior frequência. Outros sinais do mormo incluem dispnéia, taquipnéia, hiperemia de mucosa nasal, abscesso subcutâneo, edema de prepúcio, edema peitoral, claudicação, artrite e hipertermia (RABELO et al., 2006).

Os muares geralmente morrem na fase aguda da doença dentro de uma semana a 10 dias (ALIBASOGLU et al., 1986; ARUN et al., 1999; GREGORY e WAAG, 2009). Já os equinos são mais acometidos pela infecção crônica que é lenta e progressiva. A recorrência da doença ou a morte vai depender da gravidade das lesões no animal e poderá ocorrer em meses ou anos após o período de latência. A doença se agrava após esforço físico excessivo associado à má alimentação, ocorrência de outras doenças infecciosas, vacinação e até mesmo após realizar o teste da maleína (ARUN et al., 1999).

A septicemia pode ocorrer em qualquer fase da infecção levando à falência múltipla dos órgãos. O animal pode desenvolver cólica, diarreia aquosa, dispnéia acentuada, prostração, colapso cardiovascular e morte (MOHAMMAD et al., 1989; GREGORY e WAAG, 2009).

3.5 Patologia e Patologia Clínica

À necropsia de equídeos com mormo podem ser observadas petéquias e equimoses na pleura visceral. Os pulmões apresentam-se com poucos ou múltiplos abscessos e piogranulomas com 2 a 3 cm de diâmetro; alguns desses nódulos são firmes e outros flácidos. No sistema linfático observam-se nódulos firmes, arredondados e elevados, ao longo do trajeto dos vasos linfáticos formando “rosários”; com a evolução estes se tornam flácidos, fistulam e drenam pus branco-amarelado. Estas lesões são mais frequentes na cabeça, pescoço e membros. Na pele formam-se cicatrizes profundas em decorrência da formação de úlceras cutâneas. Os linfonodos mandibulares, cervicais superficiais, pré-crurais e os relacionados com o trato respiratório geralmente são os mais afetados, apresentando-se aumentados de volume, por vezes fistulados, eliminando material purulento; nos casos crônicos podem desenvolver textura fibrosa (MOTA et al., 2000; GREGORY e WAAG, 2009).

Ao exame histológico são observadas lesões granulomatosas ou piogranulomatosas com necrose de caseificação central circundada por grande quantidade de elementos inflamatórios especialmente macrófagos, células epitelióides, células gigantes, linfócitos, plasmócitos e abundante tecido conjuntivo, com áreas de calcificação no tecido necrótico. Nota-se também grave inflamação purulenta difusa com destruição do epitélio nasal, glândulas e cartilagem septal, hemorragia, focos de fibrina e marcada vasculite, além de trombose de vasos subepiteliais. No pulmão observa-se moderada a acentuada congestão e pequenos focos de hemorragia, presença de edema e fibrina interlobular e intra-alveolar e inflamação granulomatosa focal. Nos linfonodos observa-se necrose, congestão e hemorragia com numerosos focos de inflamação piogranulomatosa. No fígado verifica-se necrose e infiltração granulomatosa focal com presença de células gigantes e pericolangite granulomatosa. O baço apresenta áreas de necrose fibrinóide, associadas à inflamação piogranulomatosa e extensas áreas de fibrose. No rim observa-se infiltração granulomatosa multifocal intersticial com alguns focos de necrose tubular (MOTA et al., 2000).

Os achados de necropsia nos cobaios machos inoculados com *B. mallei* por via intraperitoneal e subcutânea (prova de Strauss) resulta em aumento de volume e hiperemia testicular, aderência do testículo ao saco escrotal, com formação de abscessos e fístulas que drenam exsudato levemente amarelado. O parênquima testicular encontra-

se totalmente destruído e o saco escrotal preenchido por conteúdo purulento. O fígado apresenta bordos arredondados, focos de necrose e múltiplos abscessos. Além da pneumonia abscedativa multifocal, esplenomegalia e abscessos esplênicos. Também se observa a formação de múltiplos abscessos em linfonodos, rins, estômago e no tecido subcutâneo, no ponto da inoculação (SILVA et al., 2005).

Nos cobaios, os achados histopatológicos mais frequentes são: orquite piogranulomatosa grave, necrose e mineralização tubular. A parede abdominal pode apresentar severa inflamação piogranulomatosa e calcificação de fibras musculares. No fígado observa-se moderada degeneração gordurosa difusa de hepatócitos, leve congestão e hepatite piogranulomatosa; no pulmão encontra-se congestão e múltiplos focos de inflamação piogranulomatosa, com presença de numerosos macrófagos e células gigantes e descamação epitelial de brônquios e bronquíolos (FRITZ et al., 1999; SILVA et al., 2005).

3.6 Diagnóstico

O diagnóstico do mormo consiste na associação dos aspectos clínico-epidemiológicos, anátomo-histopatológicos, microbiológico, inoculação em animais de laboratório, reação imunoalérgica (maleinização), testes sorológicos como FC, Ensaio imuno-enzimático (ELISA), Contra Imunoeletroforese, Hemaglutinação Indireta, Imunofluorescência Indireta e Rosa Bengala em placa (NAUREEN et al., 2007).

O diagnóstico microbiológico é fundamental para diferenciar de outras enfermidades bacterianas, fúngicas e virais que acometem os sistemas respiratório e linfático dos equídeos. As enfermidades para as quais se deve se realizar o diagnóstico diferencial são a Adenite Equina (garrotilho), causado pelo *Streptococcus equi*, Influenza Equina (Vírus da Influenza Equina – *Lentivirus*: A/equi/1(H7N7, A/equi/2 (H3N8), Linfangite Epizoótica (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), Linfangite Ulcerativa (*Histoplasma farciminosum*), Melioidose (*Burkholderia pseudomallei*), Esporotricose (*Sporothrix schenckii*), Anemia Infecciosa Equina (Vírus da Anemia Infecciosa Equina – *Lentivirus*) e Arterite Viral Equina (Vírus da Arterite Viral Equina - *Arterivirus*). O diagnóstico diferencial mais importante em humanos é com melioidose

causada por *B. pseudomallei* e que produz quadro clínico e patológico indierenciável do mormo (THUMMAKUL et al., 1999; DANCE, 2000; STEVENS et al., 2005).

O diagnóstico microbiológico se baseia no isolamento e identificação da bactéria em meios de cultivo como o ágar base enriquecido com sangue de ovino, ágar batata glicerinado e ágar glicerol.

B. mallei é dificilmente isolada a partir da secreção nasal devido à contaminação do material com outras bactérias que compõem a microbiota local. As secreções frescas de nódulos linfáticos e cutâneos fechados são mais adequadas para o isolamento bacteriano devido à ausência de contaminantes. A secreção da cavidade nasal ou secreções de lesões antigas são menos utilizadas devido à contaminação por bactérias ambientais (PRITCHARD 1995; AL-ANI et al., 1998; AL-ANI e ROBERSON 2007; MOTA et al., 2010).

O cultivo é realizado preferencialmente em meios que contenham glicerol e o material biológico suspeito deve ser incubado em aerobiose (KRIEG e HOLT, 1984; GILARDI, 1985). A temperatura ótima de crescimento é 37°C durante 48-72 horas (MOTA et al., 2010).

A característica da colônia bacteriana varia de acordo com o tipo de meio e o tempo de cultura. No ágar base, enriquecido com sangue de ovino, as colônias novas são pequenas, transparentes, brilhantes, arredondadas e não hemolíticas. Os cultivos antigos sofrem polimorfismo e as colônias se tornam filamentosas, ramificadas e rugosas. Nos cultivos realizados em ágar batata glicerinado são translúcidas a levemente acastanhadas, de aspecto úmido, lisas e viscosas e nas culturas antigas são observadas estruturas densas, marrom escuro e rugosa (MUHAMMAD et al., 1998; MOTA et al., 2000; NAUREEN et al., 2007).

Para a identificação fenotípica das amostras suspeitas deve-se usar isolados recentes de *B. mallei* devido à possibilidade de alterações em suas características nos cultivos antigos. As provas bioquímicas usadas são: liquefação da gelatina, produção de pigmento, redução de nitratos, catalase, oxidase, indol, produção de H₂S, motilidade, lisina descarboxilase, gás de D-glicose, citrato, hidrólise de uréia, utilização de glicose, arabinose, frutose, galactose, maltose, galactose, lactose, frutose, manose, sacarose e manitol (EVANS, 1966; WOODS et al., 2002; MOTA et al., 2005; SILVA et al., 2005).

O isolamento de *B. mallei* pode ser confirmado a partir da inoculação da bactéria em animais de laboratório como hamster, ratos e cobaias (*Cavia porcellus*). A secreção respiratória, dos nódulos linfáticos ou a bactéria isolada em meio de cultivo pode ser inoculada por via intraperitoneal. Neste caso o animal mais indicado para o re-isolamento bacteriano é o cobaio macho e o material positivo produzirá peritonite, além de orquite purulenta (prova de Strauss). Na dependência da carga microbiana e virulência da cepa bacteriana será determinada a gravidade e letalidade da infecção. As amostras fracamente contaminadas ou de baixa virulência podem causar reações de Strauss negativas ou leves. Isolados antigos no laboratório, após sucessivas passagens *in vitro* também podem perder os fatores de virulência e ser incapazes de produzir a reação de Strauss, sendo necessária a inoculação em animais de laboratório para reativação da virulência bacteriana (AL-ANI et al., 1998; FRITZ et al., 1999; FRITZ et al., 2000; SILVA et al., 2005; MOTA et al., 2008).

A aplicação de métodos baseados em biologia molecular apresenta significativo impacto no diagnóstico, especialmente na rapidez dos resultados, na redução de resultados falso-positivos, principalmente para animais de alto valor zootécnico ou em áreas livres. As técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são utilizadas no diagnóstico, identificação e diferenciação molecular de *B. mallei* e *B. pseudomallei* (ULRICH et al., 2006; SHOLTZ et al., 2006) Na diferenciação de outras espécies de *Burkholderia* sp (GEE et al., 2003), em técnicas de epidemiologia molecular (SILVA et al., 2009), na determinação de genes associados a virulência bacteriana (SCHELL et al., 2007) e caracterização do genoma de *B. mallei* (NIERMAN et al., 2004).

Oficialmente, para fins de diagnóstico e controle da enfermidade, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento recomenda somente a realização dos testes de Fixação do Complemento (FC) e a maleinização.

O teste de FC apresenta alta sensibilidade e boa especificidade e deve ser realizado em laboratórios Oficiais ou Credenciados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Baseia-se na detecção de anticorpos específicos contra a *B. mallei* que podem ser observados uma semana após a infecção. Contudo, alguns estudos demonstram que o melhor período para a realização do exame situa-se entre 4-12 semanas após a infecção. A vantagem do teste está relacionada à detecção de animais com clínica inaparente e aqueles infectados na fase crônica da doença (SCHALATER,

1992). Naureen et al. (2007), relataram que a FC tem alta sensibilidade semelhante a hemaglutinação e o teste de rosa bengala em placa, entretanto apresenta baixa especificidade quando comparado ao teste da maleína e imunoelektroforese. Além disso, a atividade anticomplementar e auto-reação de alguns soros de animais utilizados para o teste inviabilizam o uso da FC.

O teste maleína foi o primeiro teste de diagnóstico do mormo e tem sido a principal técnica de diagnóstico de campo em programas de erradicação desde 1960. Os Estados Unidos e Canadá começaram a utilizá-lo como ferramenta de diagnóstico em 1905 (GREGORY e WAAG, 2009).

Inicialmente a maleína utilizada era uma preparação protéica termicamente obtida contendo endotoxinas e exotoxinas de *B. mallei*. Atualmente existem outros métodos de obtenção e purificação do antígeno, que melhoram a sensibilidade e especificidade do teste aumentando a confiança dos resultados (VERMA et al., 1994).

A inoculação da maleína com fins de diagnóstico é realizada a campo por Médicos Veterinários da Defesa Sanitária Animal. Deve ser indicada como teste confirmatório quando surgem dúvidas no teste sorológico em animais com sinais sugestivos de doença e negativos na FC ou animais assintomáticos e positivos na FC (BRASIL, 2004).

O teste funciona de forma semelhante ao teste tuberculínico. Os animais com mormo desenvolvem hipersensibilidade do tipo IV após a inoculação da maleína. Existem três procedimentos para aplicação da maleína que pode ser inoculada por via intradérmica na pálpebra inferior (teste intradermo-palpebral) ou por via subcutânea na região do pescoço (teste subcutâneo). Um terceiro ensaio pouco confiável é instilar algumas gotas de maleína no olho (teste oftálmico) (VERMA et al., 1994; OIE, 2007).

O teste intradermo-palpebral é o preferido e utilizado oficialmente no mundo, inclusive no Brasil. O ensaio da maleína é realizado através da aplicação de 0,1mL de PPD-maleína por via intradérmica na pálpebra inferior de um dos olhos do equídeo e a leitura é realizada após 48 horas da aplicação. Os animais que apresentarem reação inflamatória edematosa palpebral, com secreção purulenta ou não são considerados positivos (BRASIL, 2004)

O teste maleína tem valor preditivo positivo de 92% na fase aguda e 96% na fase crônica da doença. Em alguns casos, os equídeos com infecção aguda podem apresentar resultado inconclusivo devido ao desenvolvimento lento da resposta celular específica. Além disso, animais com doença crônica podem dar resultados negativos devido ao desenvolvimento de anergia e falso-positivos devido às infecções por *Streptococcus equi* (JANA et al., 1982)

A inoculação da maleína estimula a síntese de anticorpos e resposta sorológica posterior em animais negativos detectada na FC e embora transitória, a soroconversão poderá permanecer por quase dois meses (HAGEBOCK et al., 1993).

3.7 Tratamento

Não existe tratamento efetivo para o mormo em equídeos devido à característica intracelular facultativa da bactéria (THIBAUT et al., 2004; SILVA et al., 2008). Por isso a legislação vigente não permite o tratamento de animais positivos ou suspeitos de mormo, restringindo-se o tratamento aos casos humanos. Tecnicamente, existe grande dificuldade quanto ao tratamento das infecções ocasionadas por microrganismos do gênero *Burkholderia*, devido à característica intracelular facultativa de algumas espécies consequentemente a impossibilidade de cura microbiológica utilizando antibióticos e quimioterápicos. *B. mallei* e *B. pseudomallei* são naturalmente resistentes aos antibióticos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e macrolídeos (MOTA et al., 2005).

3.8 Controle e Profilaxia

O ProGrama Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE) criado pelo Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil visa fortalecer a equideocultura nacional, por meio de ações de vigilância e defesa sanitária animal. Esse ProGrama visa elaborar e propor normas e procedimentos técnicos, acompanhar os estudos epidemiológicos, realizar vigilância epidemiológica e sanitária das principais doenças dos equídeos como o Mormo e a Anemia Infecciosa Equina. Tem como objetivo principal o controle, profilaxia e erradicação destas doenças em todos os Estados da Federação.

Em 24 de Abril de 2004 foi aprovada a Instrução Normativa nº24 do MAPA referente às normas para o Controle e Erradicação do Mormo e todos os aspectos relacionados ao diagnóstico e a conduta nos casos positivos.

No caso do mormo não existem vacinas disponíveis para a imunoprofilaxia de humanos e animais. Dessa forma, o controle da doença consiste basicamente no diagnóstico e sacrifício de animais infectados.

De acordo com a IN nº 24, o resultado negativo da prova de FC tem validade de 180 dias para animais procedentes de propriedades monitoradas e de 60 dias nos demais casos. O resultado positivo deverá ser encaminhado imediatamente ao Serviço de Sanidade Animal (SSA) da Delegacia Federal de Agricultura (DFA) da Unidade da Federação (UF) onde se encontra o animal reagente. Os animais reagentes à prova de FC poderão ser submetidos a teste complementar de diagnóstico (maleína), quando os reagentes ao teste de FC não apresentarem sinais clínicos da doença ou ainda os animais não reagentes no teste de FC que apresentam sinais clínicos da doença.

Os animais com sinais clínicos sugestivos de mormo que não apresentarem reação à maleína deverão, obrigatoriamente, ser retestados, num prazo de 45 (quarenta e cinco) a 60 (sessenta) dias após a primeira maleinização; os que permanecerem sem reação, após a segunda maleinização, terão diagnóstico negativo conclusivo.

A propriedade com um ou mais animais com diagnóstico de mormo positivo conclusivo será considerada foco da doença e imediatamente interditada e submetida ao saneamento. Os animais positivos serão sacrificados imediatamente não cabendo indenização (conforme Decreto nº 24.538, de 03 de julho de 1934), procedendo-se, em seguida, à incineração ou enterro dos cadáveres no próprio local, à desinfecção das instalações e fômites, sob supervisão do Serviço Médico Veterinário Oficial. Todos os equídeos restantes serão submetidos aos testes de diagnóstico para mormo.

O sacrifício dos equídeos positivos é realizado por profissional do Serviço Veterinário Oficial e na presença de duas testemunhas idôneas. A interdição da propriedade somente será suspensa pelo Serviço Veterinário Oficial (retirar) após o sacrifício dos animais positivos e a realização de dois exames de FC sucessivos de todo plantel com intervalos de 45 a 90 dias, com resultados negativos no teste de diagnóstico.

A participação dos equídeos em eventos hípicas realizados em Unidades da Federação onde tenham sido confirmados casos de mormo fica restrita aos animais que sejam comprovadamente negativos ao exame de mormo dentro do prazo de validade, junto com a ausência de sinais clínicos de mormo (BRASIL, 2004; OIE, 2007).

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDO, P. B. 1983. Role of the common house fly (*Musca domestica*) in the spread of ulcerative lymphangitis. **Vet. Rec.** 113, 496-497.

AL-ANI, F. K.; AL-DELAIMI, A. K. 1988. Epizootic lymphangitis in horses: clinical, epidemiological and hematological studies. **Pakistan Vet. J.** 6, 96-100.

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. arhiv** 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.

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

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

BRASIL – MAPA: MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. 2004. **IN nº 12, de 29 de janeiro** - Requisitos de qualidade para credenciamento e monitoramento de laboratórios para o diagnóstico sorológico do mormo.

BRASIL – MAPA: Ministério Da Agricultura Pecuária E Abastecimento. **I.N. nº 24 de 05 de Abril de 2004.** Normas para o Controle e a Erradicação do Mormo.

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

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.

DANCE, D. A. 2000. Melioidosis as an emerging global problem. **Acta. Trop.** 74, 115-119.

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.

EVANS, D. 1966. Utilization of carbohydrates by *actinobacillus mallei*. **Can. J. Microbiol.** 12, 625-639.

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.

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.

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.

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.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. 2003. **Microb Vet**, 1ªed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 446p.

IBGE, 2008. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.ibge.org.br>>. Acesso 10/06/2010.

KOHLER, W. 2006. Killed in action: microbiologists and clinicians as victims of their occupation. Part 4: tick-borne relapsing fever, Malta fever, glanders, SARS. **Int J Med Microbiol** 296, 1-4.

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

JANA, A. M.; GUPTA, A. K.; PANDYA, G.; VERMA, R. D.; RAO, K. M. 1982. Rapid diagnosis of glanders in equine by counterimmunoelectrophoresis. **Indian Vet. J.** 59, 5-9.

LOPEZ, J.; COPPS, J.; WILHELMSSEN, C.; MOORE, R.; KUBAY, J.; ST-JACQUES, M.; HALAYKO, S.; et al. 2003. Glanders in horses. **Centaur.**, 3, 135-138.

MOHAMMAD, T. J.; SAWA, M. I.; YOUSIF, Y. A. 1989. Orchitis in Arab stallion due to *Pseudomonas mallei*. **Indian J Vet Med.** 9, 15-17.

MONLUX, W.S. 1984. Diseases affecting food and working animals. En: **For Anim Diseases**. United States Department of Agriculture, US Government Printing Office, Washington DC, USA, 178-185.

MOTA, R. A.; BRITO, M. F.; CASTRO, F. J. C.; et al., 2000. Mormo em equídeos nos Estados de P 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; et al. .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 Zoot**, 13, 117-124.

MOTA, R. A.; SILVA, L. B. G.; CUNHA, A. P.; SOBRINHO, E. S. N.; et al. 2008. Alterações clínicas em cobaias (*Cavia porcellus*) inoculados experimentalmente com isolados de campo de *Burkholderia mallei* de equídeos com mormo. **Med Vet**, Recife, 2 (1), 1-9.

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

MUHAMMAD, G.; KHAN, M. Z.; ATHAR, M. 1998. Clinico-microbiological and therapeutic aspects of glanders in equines. **J. Equine Vet Sci.** 9, 93–96.

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.; et al., 2005. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.** 52 (5), 201-205

NIERMAN, W. C.; DESHAZER, D.; KIM, H. S.; TETTELIN, H.; et al. 2004. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. **Proc Natl Acad Sci USA** 101, 14246–14251.

OIE - World Animal Health Organisation; 2003. Available at: <http://www.oie.int/hs2/report.asp>. Acesso em 04/06/2010.

OIE – World Animal Health Organisation. 2007 - Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. [Oie.int/eng/en_index.htm](http://www.oie.int/eng/en_index.htm). 01:01-17.

OIE – Office International des Epizootie. 2010 – Animal Health Information-Incidência de la enfermedad por país 2005-2010, <http://www.oie.int/wahis/public.php>, acesso em 04/06/2009.

PRITCHARD, D. C. 1995. Glanders. **Equine Vet. Edu.** 7, 29-32.

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

RADOSTITS, O. M.; GAY, C. C.; BLOOD, D. C.; HINCHCHCLIFF, K. W. 2002. **Clín Vet.** 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737p.

RECKSEIDLER, S. L.; DeSHAZER, D.; SOKOL, P. A.; WOODS, D. E. 2001. Detection of bacterial virulence genes by subtractive hybridization: identification of capsular polysaccharide of *Burkholderia pseudomallei* as a major virulence determinant. **Infect Immun.** 69, 34-44.

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.; HUGHES, J. M. 2002. Public health assessment of potential biological terrorism agents. **Emerg Infect Dis** 8, 225-230.

SCHALATER, L. K. Glanders. In ROBINSON, N. E. 1992. **C Therapy in Eq Med** Philadelphia:Saunders, 3, 761-762.

SCHELL, M. A.; ULRICH, R.L.; RIBOT, W.J.; BRUEGGEMANN, E.E.; et al. 2007. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. **Mol Microb.** 64 (6) 1466-1485.

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.

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.; TAKAKI, G. M. C.; MOTA, R. A.; JARA, A. M. A. T.; et al. 2008. Caracterização fenotípica, perfil da atividade antimicrobiana, identificação de fatores de virulência e toxicidade de *Burkholderia mallei* isoladas no estado de Pernambuco e

Alagoas. **XI Enc Nac Microb Ambiental, X Simp Brasileiro de Microb do Solo**. 01, 30-34.

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.

SRINIVASAN, A.; KRAUS, C.N.; DESHAZER D.; et al. 2001. Glanders in a military research microbiologist. **New Engl. J. Med.**, 345, 256–258.

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.

THIBAUT, F. M.; HERNANDEZ, E.; VIDAL, D. R.; et al., 2004. Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* to 35 antimicrobial agents, **J. Antimicrob. Chemother.** 54 (6), 145-152.

THUMMAKUL, T.; WILDE, H.; TANTAWICHIE, T.; 1999. Melioidosis, an environmental and occupational hazard in Thailand. **Vet. arhiv** 77 (3), 203-218.

ULRICH, R. L.; DeSHAZER, D. 2004. Type III Secretion: a Virulence Factor Delivery System Essential for the Pathogenicity of *Burkholderia mallei*. **Infect and immun**, 72(2), 1150–1154.

ULRICH, R.L.; DESHAZER, D.; HINES, H. B.; JEDDELOH, J. A. 2004. Quorum sensing: a transcriptional regulatory system involved in the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. **Infect Immun** 72, 6589–6596.

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.

VERMA, R.D. 1981. Glanders in India with special reference to incidence and epidemiology. **Indian Vet J.** 58, 177–183.

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(4), 391-7.

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.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H. et al. 1992. Proposal of *Burkholderia* genus and transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus. **J. Microb. Immunol.** 36, 1251-1275.

WAAG, D.M.; DeSHAZER, D. 2004. Glanders: new insights into an old disease. In **Biol Weap Defense: Infect Diseas Counterb.** Lindler, L.E., Lebeda, F.J., and Korch, G.W. (eds). Totowa, NJ: Humana Press, p. 209–237.

WOODS, D. E. 2002. The use of animal infection models to study the pathogenesis of melioidosis and glanders. **Trends in microbiol.** 10 (11), 483-484.

WOODS, D.E.; JEDDELOH, J. A.; FRITZ, D. L.; DESHAZER, D. 2002. *Burkholderia thailandensis* E125 harbors a template bacteriophage specific for *Burkholderia mallei*. **J. Bacteriol.**, 184, 4003–4017.

5.1 ARTIGO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, PERFIL DA RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA, IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E
TOXICIDADE DE *Burkholderia mallei* ISOLADAS DE EQUÍDEOS NO BRASIL**

(Artigo formatado para o periódico Brazilian Journal of Microbiology)

1 **CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA, PERFIL DE RESISTÊNCIA**
2 **ANTIMICROBIANA, IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E**
3 **TOXICIDADE DE *Burkholderia mallei* ISOLADAS DE EQUÍDEOS NO BRASIL**

4 PHENOTYPIC, ANTIMICROBIAL ACTIVITY PROFILE, VIRULENCE AND
5 TOXICITY FACTORS IDENTIFICATION OF *BURKHOLDERIA MALLEI* STRAINS
6 ISOLATED FROM EQUIDAE IN BRAZIL

7 **Karla Patrícia Chaves da Silva¹, Galba Maria de Campos Takaki³, Tomoe Noda**
8 **Saukas², Alícia Maria Andrade Torres Jara³, José Andrey Almeida Teles⁴, Rinaldo**
9 **Aparecido Mota^{2*}**

10 ¹ Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Alagoas (UFAL), ² Departamento de Medicina
11 Veterinária - Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), ³ Núcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais –
12 NPCIAMB; Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP, ⁴ Medicina Veterinária – Fundação Educacional
13 Jayme de Altavila (FEJAL) – Brasil.

14 Submetido em:

15 **RESUMO**

16 Objetivou-se neste estudo isolar e identificar proteínas relacionadas à virulência,
17 toxicidade de metabólitos, além de avaliar o perfil de resistência *in vitro* de amostras de
18 *B. mallei* isoladas de equídeos no Brasil e identificadas molecularmente e através de
19 provas bioquímicas. As amostras clínicas foram colhidas de animais sorologicamente
20 positivos para o mormo e semeadas em ágar base enriquecido com sangue de ovino a
21 10%. As bactérias com características morfológicas e tintoriais sugestivas de *B. mallei*
22 foram submetidas às provas bioquímicas e posteriormente testadas quanto à virulência
23 por meio da atividade de esterase, protease, polifenoloxidasas e efeito da toxicidade em
24 metabólitos. As amostras analisadas apresentaram características fenotípicas comuns à
25 espécie, as duas estirpes de

*Autor para correspondência: Laboratório de Bacteriologia Veterinária – Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural de Pernambuco - Rua Dom Manuel de Medeiros, s/nº CEP: 52171-900 – Dois Irmão, Recife, Pernambuco – Brasil, Tel: (82) 9987-3301; e-mail: rinaldo.mota@gmail.com

26 *B. mallei* foram sensíveis aos antimicrobianos gentamicina, ciprofloxacina,
27 norfloxacina, doxiciclina e enrofloxacina, e resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol,
28 amoxicilina e ampicilina. Observou-se atividade de proteases, ausência de esterases e
29 polifenoloxidasas e o crescimento bacteriano resultou em metabólitos tóxicos. As
30 amostras de *B. mallei* apresentam perfil fenotípico compatível com as cepas de
31 referência, destacando-se a atividade de protease que é um fator de virulência
32 importante nesse estudo. Recomenda-se ainda a utilização de metabólitos antigos para
33 produção de proteínas com atividade imunogênica para diagnóstico imunoalérgico
34 cutâneo do mormo em equídeos.

35 **PALAVRAS-CHAVE:** *B. mallei*, Virulência, Resistência antimicrobiana; Toxicidade.

36

37

ABSTRACT

38 The objective of this study was to isolate and identify proteins related to virulence,
39 toxicity of fluid metabolites and the resistance profile in vitro of sample *B. mallei*
40 isolates characterize from equines in Brazil. Clinical samples were collected from
41 animals serologically positive for glanders and inoculated agar base enriched with sheep
42 blood and 10%. The bacteria with morphologic and staining suggestive of *B. mallei*
43 were subjected to biochemical tests and then tested for virulence by activity of esterase,
44 protease, polyphenol oxidase and the effect of toxic bacterial metabolites in liquids. The
45 samples showed similar phenotypic characteristics, common to the species, the strains
46 of *B. mallei* were sensitive for antimicrobial gentamicin, ciprofloxacin, norfloxacin,
47 doxycycline and enrofloxacin, and resistant to trimethoprim / sulfamethoxazole,
48 amoxicillin and ampicillin. Was observed activity of proteases, esterases absence of
49 polyphenyloxidase and the bacterial growth resulted in toxic metabolites. Samples of *B.*

50 mallei showed the same phenotypic profile consistent with the reference strains and the
51 activity of protease is a virulence factor involved in the infection. This study confirms a
52 high level of sensitivity of bacteria to antimicrobial agents which are to be elected for
53 the treatment of glanders in humans.

54 **KEYWORDS:** *B. mallei*, Virulence, Resistance antimicrobial, toxicity.

55

56

INTRODUÇÃO

57 O mormo é uma séria zoonose bacteriana que acomete principalmente os
58 equinos, asininos e muares. As lesões são observadas no sistema respiratório, linfático e
59 pele (13). A caracterização fenotípica e genotípica incluiu a bactéria do mormo no
60 gênero *Burkholderia* (22). O organismo é um bacilo imóvel, sem esporos, Gram-
61 negativo, aeróbio, fixadora de nitrogênio, medindo de 2-5 µm. As colônias bacterianas
62 são pequenas, translúcidas amorfas e redondas (1). *Burkholderia mallei* apresenta
63 capacidade tóxica ainda pouco conhecida; já foi comprovado que o lipopolissacarídeo
64 capsular é sua principal endotoxina e outras toxinas produzidas por essa bactéria vêm
65 sendo identificadas como co-participantes na patogenia da doença (2, 10, 16, 18).

66 Algumas enzimas bacterianas podem ser indicadoras de virulência e foram
67 identificadas em várias outras espécies de bactérias. São responsáveis direta ou
68 indiretamente por processos patológicos e/ou resistência às condições ambientais.

69 As principais enzimas bacterianas envolvidas na infecção respiratória de
70 humanos por *Pseudomonas* sp são as que desenvolvem atividade de esterase e protease,
71 que estimulam uma resposta imune humoral persistente e crescente em pacientes com
72 fibrose cística pulmonar, sugerindo a relação destas enzimas com o agravamento das

73 lesões respiratórias (5, 8, 17). As polifenoloxidasas são enzimas que contém cobre no
74 centro ativo e catalisam dois tipos de reações, ambas envolvendo oxigênio ativo,
75 resultando em reações bacterianas nocivas. As proteases são enzimas responsáveis pela
76 clivagem hidrolítica da ligação amina entre os grupos carboxila e amina dos
77 aminoácidos formadores de ligação peptídica (4).

78 Dentre as exoenzimas bacterianas estudadas destacam-se as esterases
79 relacionadas à virulência microbiana do gênero *Pseudomonas* sp, um polipeptídeo que
80 compreende 262 aminoácidos. As esterases estão no grupo das enzimas pectinolíticas
81 que desesterificam os grupos metoxila da pectina liberando ácido pécico e as
82 pectinases, que após algumas reações chegam ao produto final que são pectinas de alta
83 massa molar (19); essas enzimas possuem relevante importância na patogenicidade de
84 bactérias sintetizantes de esterases em várias doenças (17).

85 Os metabólitos bacterianos produzidos após o crescimento microbiano podem
86 ser tóxicos ao ambiente, aos animais e homem, sendo comum que dentre esses
87 metabólitos possam existir proteínas com atividade imunogênica (11). A detecção da
88 atividade tóxica dos metabólitos bacterianos inviabiliza a utilização do mesmo em
89 biotecnologias. Não existe informação sobre a produção de enzimas com potencial
90 virulência e atividade tóxica dos metabólitos de *B. mallei*.

91 Objetivou-se nesse estudo isolar, identificar e caracterizar as proteínas
92 relacionadas à virulência, toxicidade de metabólitos e o perfil de resistência *in vitro* de
93 amostras de *B. mallei* isoladas de equídeos no Brasil.

94

95

MATERIAL E MÉTODOS

97 **Isolamento e caracterização fenotípica de *B. mallei***

98 Para o isolamento de *B. mallei* foram colhidas amostras de conteúdo de nódulos
99 cutâneos fechados de equídeos com diagnóstico clínico e sorológico positivo para
100 mormo e provenientes da região da zona da mata dos estados de Pernambuco e Alagoas.
101 As amostras para diagnóstico microbiológico foram colhidas através de punção
102 aspirativa e enaminhadas ao laboratório no mesmo dia. Em seguida as amostras foram
103 semeadas em ágar sangue de ovino a 10% e incubadas a 37°C por 48 horas. As colônias
104 bacterianas isoladas foram identificadas de acordo com suas características
105 macroscópicas, à coloração do Gram, identificação molecular e fenotípica utilizando
106 provas bioquímicas como oxidase, catalase, Voges Proskauer (V.P.), indol, produção de
107 H₂S, motilidade, arginina descarboxilase, gás de D-glucose, liquefação da gelatina,
108 urease, glucose, maltose, galactose, lactose, frutose, manose, sacarose e manitol (15).

109 **Avaliação da Sensibilidade *in vitro* a antimicrobianos**

110 Para a realização do antibioGram foi utilizado o método de difusão em disco
111 (3). O inóculo bacteriano foi preparado com solução salina (0,85%) e a densidade da
112 suspensão foi ajustada em cerca de 10⁸ unidades formadoras de colônias (UFC) por
113 mililitro (escala de MacFarland). Posteriormente foi distribuído utilizando *swab* na
114 superfície do ágar Mueller-Hinton e em seguida foram colocados os discos de
115 antimicrobianos. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após este período
116 realizou-se a leitura por meio da medida dos halos de inibição do microrganismo frente
117 à droga testada (14).

118 Os antimicrobianos utilizados foram: amoxicilina (10µg), ciprofloxacina (5µg),
119 trimetoprim/sulfametoxazol (25µg), gentamicina (10µg), norfloxacina (10µg)
120 vancomicina (30µg), ampicilina (10µg), enrofloxacina (30µg) e doxiciclina(25µg).

121 **Atividade de esterase**

122 Para a detecção da atividade de esterase, (10) utilizou-se ágar contendo peptona,
123 cloreto de cálcio, cloreto de sódio e o indicador púrpura de bromocresol, suplementado
124 com 1% de Tween 80 (monooleato de polioxietileno) como substrato. A bactéria foi
125 inoculada em caldo Brain Heart Infusion (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas;
126 posteriormente discos de papel filtro de 6 mm foram embebidos com 100 µl de cada
127 amostra e depositados no centro da placa de Petri contendo o meio para atividade de
128 esterase. As placas foram incubadas à temperatura de 37°C, sendo observadas após 48
129 horas. O aparecimento do halo púrpura ao redor do disco indicou a atividade de
130 esterase.

131 **Atividade de Protease**

132 A atividade de protease foi verificada (6) em ágar nutriente acrescido da solução
133 de gelatina a 5% como substrato para o desenvolvimento da atividade. As duas amostras
134 foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente
135 discos de papel de 6 mm foram embebidos com 100 µl de cada amostra e depositados
136 no centro da placa de Petri contendo o meio para atividade de protease. As placas foram
137 incubadas a 37°C, observando-se atividade de protease através da formação de halo
138 transparente ao redor do disco após 48 horas de incubação.

139 **Atividade de Polifenoloxidasas**

140 Utilizou-se para determinar a atividade de polifeneloxidase dos metabólitos de
141 *B. mallei* (4) o meio contendo extrato de malte, peptona dextrose, ágar e enriquecido

142 com ácido gálico. As duas amostras de *B. mallei* foram inoculadas em caldo BHI e
143 incubadas a 37°C por 24 horas; posteriormente discos de papel de 6 mm foram
144 embebidos com 100 µl de cada amostra e depositados no centro da placa de Petri
145 contendo o meio para atividade de polifenoloxidase. As placas foram incubadas à 37°C,
146 observando-se após 48 horas o aparecimento do halo marrom ao redor do disco que foi
147 medido e expresso em mm.

148 **Efeito da toxicidade dos metabólitos produzidos pela *B. mallei***

149 Realizou-se o teste de toxicidade utilizando-se (11) duas amostras de *B. mallei*
150 inoculadas em 30 tubos de ensaio contendo caldo BHI para o crescimento em diferentes
151 períodos de incubação, sendo retirado um tubo a cada 24 horas até concluir os 30 dias,
152 as amostras foram incubadas a 37°C. Posteriormente os tubos foram esterilizados e
153 submetidos 100°C/1h e o líquido filtrado em membranas millipores para eliminação da
154 bactéria. Com objetivo de avaliar a toxicidade dos produtos do metabolismo bacteriano
155 foram utilizadas 10 larvas de *Artemia salina* transferidas para cada tubo contendo o BHI
156 esterilizado e filtrado, junto com 5ml de uma solução aquosa de sal marinho sintético
157 (33,3g/L). O controle do teste foi realizado em uma amostra constituída apenas de água
158 salina. A contagem dos microcrustáceos mortos e vivos foi realizada após 24 h de
159 exposição. Os tubos que continham mais que 50% de *A. salina* mortas foram
160 considerados tóxicos.

161

162 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

163 Foram isolados e identificados dois bacilos Gram-negativos, imóveis, não
164 formadores de esporos, aeróbicos, com crescimento a partir de 48 horas e formação de
165 pequenas colônias translúcidas em ágar sangue de ovino. Outras características

166 fenotípicas da bactéria foram: oxidase (+), catalase (+) V.P. (-), indol (-), produção de
167 H₂S (-), arginina dihidrolase (+), gás de D-glucose (-), liquefação da gelatina (-), urease
168 (-), glicose (+), maltose (-), galactose (+), lactose (+), frutose (+), manose (+), sacarose
169 (-) e manitol (+). Essas características são compatíveis com a espécie *B. mallei* (2, 12,
170 14, 20, 22).

171 Nos testes realizados para o estudo do perfil de resistência aos antimicrobianos
172 observou-se que as duas amostras foram sensíveis à gentamicina (100%), ciprofloxacina
173 (100%), norfloxacina (100%), doxiciclina (100%) e enrofloxacina (100%). Foram
174 resistentes a trimetoprim/sulfametoxazol, amoxicilina e ampicilina. Resultados
175 semelhantes foram observados anteriormente (13) em estudo com sete amostras de *B.*
176 *mallei* isoladas nos Estado de Pernambuco e Alagoas.

177 O efeito *in vitro* de antimicrobianos em 17 amostras de referência (ATCC) de *B.*
178 *mallei* indicaram a cefatazina, ciprofloxacina, doxiciclina imipinem e piperacilina
179 como os mais efetivos contra *B. mallei* (9). Em outro estudo da eficácia antimicrobiana
180 através da concentração mínima inibitória (MIC) com 12 cepas de referência (NCTC,
181 ATCC) detectaram os aminoglicosídeos e macrolídeos como mais efetivos e sugeriram
182 ainda a doxicilina como o antibiótico de eleição para o tratamento do mormo em
183 humanos em associação com imipinem por via intravenosa ou com azitromicina por via
184 oral (7).

185 Resultados semelhantes também foram observados no estudo de resistência a 35
186 diferentes antimicrobianos com 15 amostras referência (ATCC, NTCC e CIP) de *B.*
187 *mallei*. Destes, apenas 15 antimicrobianos foram efetivos na neutralização de todas as
188 amostras utilizadas, sugerindo como principais antibióticos o imipinem, doxiciclina,
189 netilmicina, cefazidime, piperacilina e a associação de piperacilina+tazobactam (21).

190 No presente estudo, a resistência das amostras aos antimicrobianos pode ser resultado
191 da tentativa do tratamento com essas drogas no campo, gerando cepas resistentes nos
192 animais e no ambiente ou uma resistência natural.

193 Apesar da observação da atividade antimicrobiana *in vitro* para algumas drogas
194 neste estudo, o tratamento do mormo animal é oficialmente proibido. O perfil de
195 sensibilidade observado poderá ser usado em um possível tratamento de casos de
196 mormo em humanos na região estudada.

197 Quanto à capacidade da *B. mallei* em produzir enzimas relacionadas à virulência,
198 observou-se que as duas amostras apresentaram atividade proteásica (figura 01) e
199 ausência de atividade de esterase e polifenoloxidase. As proteases como as hemolisinas
200 e exotoxinas se destacam como fator de virulência extracelular de *Burkholderia* sp, pois
201 facilitam o rompimento da integridade epitelial durante a colonização dos tecidos
202 possuindo potencial imunogênico. Além disso, outras enzimas podem auxiliar no
203 processo de colonização destacando-se as elastases, fosfolipase C, neuraminidase,
204 exoenzima S e lectina (8).

205 Os líquidos metabólicos das duas amostras apresentaram toxicidade nos tempos
206 de 1 a 15 dias de formação do metabólito o que não ocorreu com metabólitos mais
207 antigos. A utilização de metabólitos com maior tempo de formação em biotecnologias é
208 indicado pela ausência de toxicidade (4).

209

CONCLUSÃO

210 As amostras de *B. mallei* apresentam perfil fenotípico compatível com as cepas
211 de referência, destacando-se a atividade de protease que é um fator de virulência
212 importante e detectada nesse estudo. Recomenda-se ainda a utilização de metabólitos

213 antigos para produção de proteínas com atividade imunogênica com fins de diagnóstico
214 imunoalérgico cutâneo do mormo em equídeos.

215

216

AGRADECIMENTOS

217 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
218 Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
219 Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

220

221

REFERÊNCIAS

- 222 1. Al-Ani, F. K.; Al-Rawsashdeh, O. F.; Ali, H. A.; Hassan, F. K. (1998). Glanders in
223 horses: clinical, biochemical and serological studies in Iraq. *Vet. Archiv.* 68, 155-162.
- 224 2. Al-Ani, F. K.; J. Roberson. (2007). Glanders in horses: A review of the literature.
225 *Vet. Archiv.* 77, 203-218.
- 226 3. Bauer, A.W.; Kirby, E.M.; (1966). Antibiotic Susceptibility Testing by Standardized
227 Single Disk Method. *Amer. J. of Clin. Pathol.* 45, 493-496.
- 228 4. Conceição, D.M.; Angelis, D.A.; Bidoia, E.D.; Angelia, D.F. (2005). Fungos
229 filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de
230 compostos fenólicos. *Arq Inst Biol.* 72, 99 –106.
- 231 5. Döring, G.; Buhl, V.; Hoiby, N.; Schiøtz, P. O.; Botzenhart, K. (1984). Detection of
232 proteases of *Pseudomonas aeruginosa* in immune complexes isolated from sputum of
233 cystic fibrosis patients. *Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 92, 307–312.
- 234 6. Hankin, L.; Anagnostakis, S.L. (1979). The use of solid media for detection of
235 enzymes production by fungi. *Mycologia.*, 67, 597 – 607.

- 236 7. Henry, S. H.; England, M. J.; Waag, D. M.; Russell, W. B. (2001). In Vitro Antibiotic
237 Susceptibilities of *Burkholderia mallei* (Causative Agent of Glanders) Determined by
238 Broth Microdilution and E-Test. *Antimicrobial A. and Chemother.* 45(07), 2119–2121.
- 239 8. Jaffar-Bandjee, M. C.; Lazdunski, A.; Bally, et al. (1995). Production of elastase,
240 exotoxin A, ... cystic fibrosis in patients chronically infect by *P. aeruginosa*. *J Clin*
241 *Microbiol.* 33, 924-929.
- 242 9. Kenny, D. J.; Russell, P.; Rogers, D.; Eley, S. M.; Titball, R. W. (1999). In vitro
243 susceptibilities of *Burkholderia mallei* in comparison to those of other pathogenic
244 *Burkholderia* spp. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2773–2775.
- 245 10. Kortepeter, M; Christopher, G; Cieslak, T. et al. (2001). Glanders and melioidosis.
246 editors. *Med. Manag. Biol. Casualties Handbook [online]*. 4th ed. United States
247 Department of Defense.
- 248 11. Laughlin, M. C.; Saizarbitoria, J.L.; Anderson, T.C.; (1985). Tres biosensayos
249 simples para quimicos de productos naturales. *R. de la Sociedad Venez. de Química*, 18,
250 13-18.
- 251 12. Mota, R. A.; Brito, M.F.; Castro, F.J.C.; Massa, M. (2000). Mormo em equídeos nos
252 estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesq. Vet. Bras.* 20(4), 155-159.
- 253 13. Mota, R.A.; Silva, L.B.G.; Silva, K.P.C.; Silva et al. (2005). Caracterización
254 bioquímica y perfil de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de *Burkholderia mallei*
255 aisladas de équido. *Arq. Inst. Biol.* 72(1),7-11.
- 256 14. National Committee for Clinical Laboratory Standards. (2003) Methods for dilution
257 antimic. bacteria that grow aerobically. *Documents M7-A6/M100-S13*. Pa, USA.
- 258 15. OIE – World Animal Health Organisation. (2007) Glanders (Farcy, Malleus, Dros).
259 In: The center for food security e public health. Oie.int/eng/en_index.htm.em
260 05/02/2010.

- 261 16. OIE – World Animal Health Organisation. (2008) - Manual of Diagnostic Tests and
262 Vaccines for Terrestrial Animals. Oie.int/eng/en_index.htm.em 05/02/2010.
- 263 17. Pascholatti, S. F. (1995). Fitopatógenos: arsenal enzimático. *Manual de*
264 *fitopatologia: princípios e conceitos*. Agronômica Ceres. 01(19), 343-364.
- 265 18. Schell, M. A.; Lipscomb, L.; Deshazer, D. (2008). Comparative Genomics and an
266 Insect Model Rapidly Identify Novel Virulence Genes of *Burkholderia mallei*. *J. of*
267 *Bacteriol.* 190(54), 2306-2313.
- 268 19. Shimada, Y.; Nagao, T.; Sugihara, A.; Iizumi, T.; Yui, T. et al. (1993). Cloning and
269 sequence analysis of an esterase gene from *Pseudomonas* sp. KWI-56. *Biochem.*
270 *Biophys.* 1174, 79-82.
- 271 20. Silva, K. P. C.; Mota, R. A.; Cunha, A. P.; Silva, L. B. G. et al. (2009).
272 Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na
273 Região Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 29(5), 439-444.
- 274 21. Thibault, F. M.; Hernandez, E., Vidal, D. R.; Girardet, M.; Cavallo, J. D. (2004).
275 Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia*
276 *mallei* to 35 antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother.* 54, 1134-1138.
- 277 22. Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Oyaizu, H. et al. (1992). Proposal of *Burkholderia* genus
278 and transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus.
279 *J. Microb. Immunol.* 36, 1251-1275.

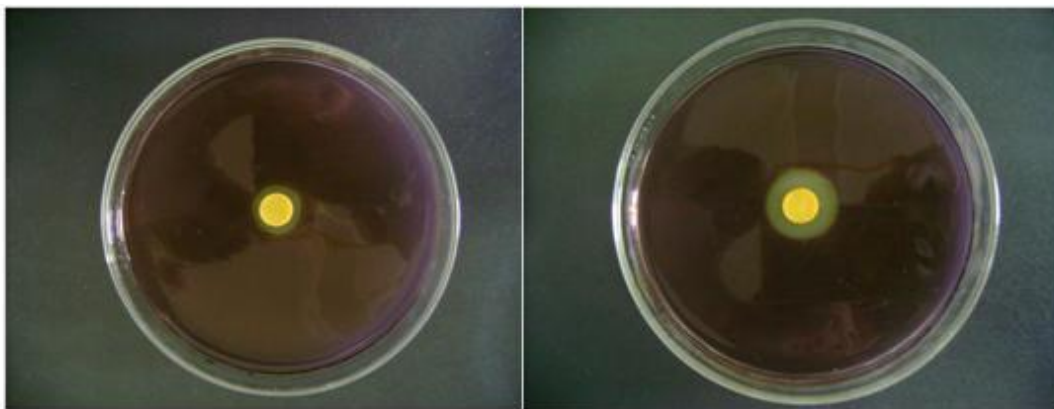


Figura 01. Presença de halo de protease em amostras de *B. mallei* isoladas de equídeos com mormo no Brasil.

5.2 ARTIGO

PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PPD-MALEÍNA PARA DIAGNÓSTICO DO MORMO EM EQUÍDEOS

(Artigo formatado para o periódico Journal of Biothecnology)

1 **PRODUÇÃO E PURIFICAÇÃO PARCIAL DE PPD-MALEÍNA PARA**
2 **DIAGNÓSTICO DO MORMO EM EQUÍDEOS**

3 **PARTIALLY PURIFIED MALLEO-PROTEINS PRODUCTION FOR**
4 **GLANDERS DIAGNOSIS IN EQUIDAE**

5 Karla Patrícia Chaves Silva ^a, Galba Maria de Campos Takaki ^b, José Andrey de Almeida
6 Teles ^c, Antônio Flávio Medeiros Dantas ^d, Mateus Matiuzzi da Costa ^e, Wagner Pereira Felix ^e,
7 Rinaldo Aparecido Mota ^{f*}

8 ^aDepartamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Alagoas - Brasil

9 ^bNúcleo de Pesquisas em Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco – Brasil

10 ^cMedicina Veterinária – Fundação Educacional Jayme de Altavila – Brasil

11 ^dMedicina Veterinária – Universidade Federal de Campina Grande – Brasil

12 ^eColegiado Medicina Veterinária – Universidade Federal do Vale do São Francisco – Brasil

13 ^{f*}Departamento de Medicina Veterinária- Universidade Federal Rural de Pernambuco - Brasil

14

15 **RESUMO**

16 Objetivou-se com este estudo produzir e purificar parcialmente a PPD-maleína a partir
17 de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas de equídeos no Brasil com potencial para
18 uso no diagnóstico do mormo. As linhagens de *B. mallei* fenotipicamente caracterizadas
19 e de virulência comprovada foram inoculadas em caldo Dorset-Henley para crescer e
20 metabolizar. Em seguida, as proteínas foram separadas por precipitação com ácido
21 tricloroacético e precipitadas com sulfato de amônia. As PPDs-maleínas foram
22 concentradas em 1,0mg/mL e na avaliação realizada em cobaios foi eficaz no
23 desenvolvimento da hipersensibilidade do tipo tardia e conseqüentemente na
24 identificação de animais verdadeiro positivos e exclusão dos verdadeiro negativos,
25 sendo uma possibilidade em potencial para utilização no diagnóstico do mormo.

26 **PALAVRAS-CHAVE:** Proteína, imunidade celular, histopatologia, PPD-maleína.

27 **ABSTRACT**

28 The objective of this study was produce and partially purify the Malleo-protein from *B.*
29 *mallei* samples isolates from equine in Brazil with potential for use in the glanders
30 diagnosis. The strain *B. mallei* phenotypically characterized and proven virulence were

*Autor para correspondência: Laboratório de Bacteriologia Veterinária – Departamento de Medicina Veterinária – Universidade Federal Rural de Pernambuco - Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n° CEP: 52171-900 – Dois Irmãos, Recife, Pernambuco – Brasil, Tel: (82) 9987-3301; e-mail: rinaldo.mota@gmail.com

31 inoculated in broth Dorset-Henley to grow and metabolize. Then the proteins were
32 separated by trichloroacetic acid precipitation and ammonium sulfate precipitation. The
33 PPD mallein were concentrated in 1.0 mg/mL and biologically tested in guinea pigs and
34 was effective in the development of delayed-type hypersensitivity and consequently in
35 identifying true-positive animals and to exclude of true negatives, and a possibility for
36 potential use in the glanders diagnosis in equides.

37 **KEYWORDS:** Equides, Glanders, Diagnosis, PPD-mallein.

38

39 1. INTRODUÇÃO

40 O mormo é considerado a principal doença bacteriana dos equídeos, sendo
41 transmissível ao homem e a outras espécies animais. Registrada sua reemergência no
42 Brasil (Mota et al., 2000), atualmente a doença constitui um sério problema sanitário
43 para os equídeos das regiões Norte e Nordeste do País (CNA, 2005, Mota et al., 2005).

44 O Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil (MAPA) indica
45 ara o diagnóstico oficial da doença em equídeos, a técnica de Fixação do Complemento
46 (FC) como teste de triagem e a maleinização para confirmar os casos positivos ou
47 inconclusivos na FC (OIE, 2008).

48 A FC possui o entrave da padronização insuficiente do antígeno que pode
49 comprometer a qualidade do teste (Jana et al., 1982; Verma et al., 1990; Naureen et al.,
50 2007), conduzindo a limitações quanto à especificidade e sensibilidade da técnica e
51 alguns autores questionam sua eficácia e aplicabilidade (Neubauer et al., 2005; Naureen
52 et al., 2007). Outra limitação está relacionada aos soros de muares, asininos e éguas
53 prenhes que devem ser inativados para evitar atividade anticomplementar. Esses fatores
54 são limitantes à exequibilidade do teste uma vez que inviabiliza a amostra e requer uma
55 nova coleta de soro (BRASIL, 2004).

56 A maleinização utiliza como reagente um derivado protéico purificado (PPD-
57 maleína) maleína que se encontra disponível comercialmente. Consiste em uma solução
58 de frações protéicas de *B. malei* solúveis ativamente produzidas durante o crescimento
59 bacteriano em meio líquido e tratadas pelo calor. O ensaio se baseia na reação de
60 hipersensibilidade do tipo IV ou Tardia (HTT) nos equídeos infectados (OIE, 2008).

61 De acordo com Verma et al. (1994) e Neubauer et al. (2005), a maleinização
62 utilizando a PPD-maleína é a técnica de maior especificidade quando comparado a
63 outras técnicas de diagnóstico do mormo. Entretanto o maior entrave para a utilização
64 da maleinização em alta escala é a dificuldade na aquisição e o valor do imunógeno
65 importado, limitando o seu uso na elucidação dos casos suspeitos e positivos.

66 Objetivou-se com esse estudo produzir, purificar e avaliar a PPD-maleína a partir
67 de amostras bacterianas isoladas no território nacional com potencial para uso no
68 diagnóstico do mormo.

69

70 **2. MATERIAL E MÉTODOS**

71 **2.1. Amostras de *B. mallei***

72 As amostras de *B. mallei* foram obtidas a partir do conteúdo purulento de nódulos
73 cutâneos de equídeos com diagnóstico clínico e sorológico positivo para o mormo nos
74 estados de Pernambuco e Alagoas, Brasil. Para o isolamento bacteriano, as amostras
75 clínicas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar base enriquecido com sangue
76 de ovino. Em seguida as placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48
77 horas (OIE, 2008). As colônias bacterianas com características morfológicas
78 semelhantes à *B. mallei* foram confirmadas molecularmente e submetidas à
79 caracterização fenotípica (Burtnick et al., 2002; Mota et al., 2005).

80 As amostras de *B. mallei* foram submetidas às provas bioquímicas como oxidase,
81 catalase, Voges Proskauer (V.P.), indol, produção de H₂S, motilidade, hidrólise da
82 arginina, gás de D-glucose, liquefação da gelatina, urease, glucose, maltose, galactose,
83 lactose, frutose, manose, sacarose e manitol de acordo com Mota et al. (2005).

84 **2.2. Produção e purificação parcial da maleína (PPD-maleína)**

85 Foram produzidas duas PPDs-maleínas, sendo a primeira a partir da estirpe da *B.*
86 *mallei* isolada no estado Pernambuco e a segunda a partir da amostra proveniente do
87 estado de Alagoas.

88 Para a produção da PPD-maleína, as amostras foram ressuspendidas em solução
89 salina (0,85%) e inoculadas em meio Dorset (Henley medium). Posteriormente, o meio

90 foi incubado a 37°C sob agitação durante oito semanas. Após o período incubação,
91 realizou-se a esterilização em banho-maria a 100°C por três horas e em seguida filtrado
92 em membrana (0,2µm) para remover as células bacterianas e substâncias grosseiras.

93 Adicionou-se ao filtrado o ácido tricloroacético para precipitação das proteínas,
94 permanecendo por 24 horas em temperatura ambiente. O sobrenadante da mistura foi
95 decantado e descartado e o precipitado foi centrifugado por 15 minutos a 2.500g. O
96 precipitado foi lavado quatro vezes em solução de NaCl a 5% (pH3,0). Em seguida o
97 precipitado foi dissolvido com um mínimo de solvente alcalino, resultando em um pH
98 de 6,7. O produto final foi um líquido castanho escuro (maleína concentrada).

99 A maleína concentrada foi centrifugada e o sobrenadante diluído em igual
100 quantidade de solução tampão de glicose. A PPD-maleína de concentração conhecida
101 foi então colocada em ampolas esterilizadas e resfriadas (Verma et al., 1994; OIE,
102 2008).

103 **2.3. Cálculo das proteínas totais**

104 Foram utilizados três momentos para monitorar a concentração de proteínas no
105 processo de produção da maleína. O momento um ocorreu após a esterilização e
106 filtração do líquido metabólico; as amostras para compor o momento dois foram obtidas
107 após a precipitação e lavagem das proteínas e o momento três foi realizado depois de
108 concluída a purificação parcial da PPD-maleína.

109 Para dosagem das proteínas utilizou-se o Kit de análise de proteínas totais
110 (Proteínas Totais – Bioquímica Clínica Doles) e a leitura foi realizada em
111 espectrofotômetro (Biochrom – libra S32). A concentração do produto final da maleína
112 foi ajustada de acordo com o preconizado pela OIE (2008) para utilização no teste de
113 diagnóstico.

114 **2.4. Eletroforese em SDS-PAGE da PPD-maleína**

115 O extrato protéico de *B. mallei* foi aplicado em gel de poliacrilamida para
116 eletroforese em condições desnaturantes (SDS-PAGE), conforme descrição de Laemmli
117 (1970). Para tal foi utilizado sistema de eletroforese miniVE (Amershan Biosciences).
118 As condições para corrida foram 80 V sob amperagem constante por aproximadamente

119 1 h. Após a corrida eletroforética o gel foi corado com Coomassie blue para a
120 visualização das bandas protéicas.

121 **2.5. Avaliação da potência e segurança da PPD-maleína**

122 Para controle do produto cada lote de maleína foi testado quanto à segurança,
123 esterilidade e potência. As preparações contendo o fenol como conservante foram
124 padronizadas na concentração de 0,5%.

125 Para avaliar a potência das PPDs-maleínas foram sensibilizados 20 cobaios (*Cavia*
126 *porcellus*) (G1) por via sub-cutânea com 0,1 ml do antígeno inativado de *B. mallei*
127 (concentração de 5mg/ml). Os animais foram mantidos durante 30 dias sob idênticas
128 condições de ambiente e nutrição para posterior avaliação da PPD-maleína.

129 Antes do ensaio da maleína nos cobaios, o sangue desses animais foi colhido para
130 confirmar a infecção por meio da avaliação da resposta imune frente à bactéria inativada
131 através da prova sorológica de fixação do complemento.

132 Para avaliar a potência da PPD-maleína produzida, os animais foram
133 tricotomizados na região intercostal direita e esquerda onde foram inoculadas a PPD-
134 maleína 01 (flanco esquerdo) e PPD-maleína 02 (flanco direito). Inoculou-se 0,1 ml da
135 maleína teste por via intradérmica e a comprovação da inoculação foi feita por meio da
136 observação da formação de pápula intradérmica.

137 A segurança da PPD-maleína foi avaliada em outro grupo de 20 cobaios (G2) não
138 sensibilizados com a bactéria. Esses animais também foram inoculados com 0,1ml de
139 cada PPD-maleína por via intradérmica, utilizando-se o mesmo procedimento
140 empregado no G1. Os animais foram identificados pela sigla “C” (cobaio) seguida pelo
141 número do animal e o lado da inoculação “E ou D” (esquerdo e direito), para posterior
142 avaliação da reação alérgico-cutânea (Verma et al., 1994). Todos os procedimentos de
143 avaliação da PPD-maleína quanto à esterilidade, segurança, potência, concentração do
144 conservante seguiram as recomendações da OIE (2008).

145 As áreas de aplicação foram avaliadas às 24, 48 e 72 horas após a inoculação,
146 medindo-se o diâmetro transverso da área inflamatória palpável, empregando-se uma
147 régua de material plástico transparente com circunferências graduadas em milímetros e
148 de diâmetros variáveis e caneta do tipo piloto. As leituras das reações cutâneas foram
149 realizadas sempre por um mesmo técnico com experiência prévia em leitura de reações
150 em provas intradérmicas e que desconhecia a relação dos pontos de aplicação com o

151 tipo produto (PPD-maleína 01 ou 02) correspondente, assim como os animais que
152 constituíam o G1 e G2.

153 **2.6. Avaliação anátomo-histopatológica da reação imuno-alérgica cutânea**

154 Os fragmentos de pele referente ao local de aplicação das maleínas foram
155 avaliados quanto à consistência, presença e dimensão do edema, sensibilidade à
156 palpação e aumento da temperatura local. Observou-se também o estado geral do
157 animal, anotando-se os achados clínicos.

158 Foram colhidos fragmentos de pele dos cobaias do G1 e G2 que foram fixados
159 em solução de formol tamponado a 10%. Esse material foi clivado, processado
160 rotineiramente e incluídos em parafina. Em seguida foram realizados cortes
161 histopatológicos de aproximadamente 5µm de espessura e as lâminas confeccionadas e
162 coradas pela hematoxilina e eosina para posterior análise histológica.

163

164 **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

165 As bactérias isoladas apresentaram as seguintes características: oxidase (+),
166 catalase (+) V.P. (-), indol (-), produção de H₂S (-), Motilidade (-), arginina dihidrolase
167 (+), gás de D-glucose (-), liquefação da gelatina (-), urease (-), glucose (+), maltose (-),
168 galactose (+), lactose (+), frutose (+), manose (+), sacarose (-) e manitol (+). O
169 resultado obtido na análise fenotípica permitiu identificar os isolados como *B. mallei*,
170 pois as amostras apresentaram características idênticas às observadas anteriormente por
171 Yabuuchi et al. (1992), Mota et al. (2005), Silva et al. (2008) e Silva et al. (2009).

172 Quanto à dosagem das proteínas observou-se que durante o processamento das
173 amostras, a concentração protéica aumentou gradativamente nas duas PPD-maleínas
174 (graf. 1). De acordo com Amemiya et al. (2007), Al-Ani e Roberson (2007), a PPD-
175 maleína deve ter concentração de proteínas ajustadas para uso na maleinização não
176 inferior a 0,95mg/ml e não mais que 1,05mg/ml. Após a produção da PPD-maleína estas
177 foram ajustadas para 1,0mg/ml, de acordo com recomendação da OIE (2008).

178 A precipitação e separação das proteínas com ácido tricloroacético e a
179 precipitação com sulfato de amônia proporcionou a obtenção de um produto final de

180 alto valor maleinogênico. De acordo com Verma et al. (1994) e Naureen et al. (2007) o
181 processo de precipitação e separação induz a produção e isolamento de proteínas ativas
182 de alto peso molecular que são responsáveis pela potência da reação de maleinização
183 sem efeitos colaterais e inespecíficos, ao mesmo tempo em que a presença de proteínas
184 de peso molecular menor é mínima e essas não produzem reação no teste de
185 diagnóstico.

186 No gel de SDS-PAGE foi identificada uma proteína de aproximadamente 36kDa
187 presente em grande quantidade no extrato (fig. 1). Vários antígenos têm sido utilizados
188 para diagnóstico da infecção por *B. mallei*, sendo estes principalmente polipeptídeos
189 (Wuthiekanun et al., 2002; Tyawisutsri et al., 2005). O perfil eletroforético do extrato
190 obtido neste estudo está, em relação ao peso molecular, dentro do parâmetro encontrado
191 nos extratos com alta imunogenicidade e relacionados a exopolissacarídeos de *B. mallei*
192 que ficam entre 26kDa e 48kDa (Verma et al., 1994; Anuntagool e Sirisinha, 2002),
193 implicando na possibilidade de êxito quando utilizado como antígeno em testes de
194 diagnóstico.

195 Tyawisutsri et al. (2007) ao realizar uma busca em bancos de proteínas de *B.*
196 *mallei*, *B. pseudomallei* e *B. thailandensis* encontraram quatro proteínas com potencial
197 imunológico para os equinos, sendo estas proteínas do grupo de autotransportadores
198 “BuHA”, embora o tamanho destas não tenha sido estimado. Um conjunto de 15 genes
199 para produção de proteína capsular está relacionado à virulência de *B. mallei* e a
200 inibição destes genes dá origem a cepas avirulentas (Schell et al., 2007). Estudos futuros
201 são necessários para caracterizar essa proteína, bem como determinar seu potencial
202 imunogênico através de *immunoblotting*.

203 De acordo com Schell et al. (2007) um grupo de proteínas (Hcp-family),
204 produzidas apenas durante a infecção natural e que estão relacionadas à virulência
205 bacteriana podem ser detectadas por anti-soros de cavalos, humanos e camundongos
206 infectados. Na análise isolada desta proteína em SDS-PAGE foram observados
207 polipeptídeos de aproximadamente 22 kDa que estão abaixo do produto encontrado
208 neste estudo.

209 Segundo Verma et al. (1994), a produção de maleína a partir da precipitação e
210 purificação ácida com tricloroacético gera uma PPD de alto valor maleinogênico com

211 peso molecular alto e poucos fragmentos de baixo peso molecular sem atividade
212 imunogênica no teste de maleinização.

213 Os cobaios sensibilizados com *B. mallei* apresentaram anticorpos fixadores do
214 complemento após 30 dias de inoculação confirmando a infecção. As duas proteínas
215 (PPD) produziram reação intradérmica através da produção de edema no ponto de
216 inoculação e em áreas adjacentes, aumentando de intensidade em 24 horas e atingindo
217 pico máximo em 48 horas, período padrão para observação da reação na maleinização.
218 Após 72 horas o edema proveniente do inóculo reduziu gradualmente. O padrão de
219 reação a PPD-maleína foi homogêneo em todos os cobaios utilizados no teste de
220 potência do produto (fig. 2); o edema foi persistente e não transitório, indicando a
221 reação verdadeira positiva (gráf. 2) de acordo com a OIE (2008).

222 Verma et al. (1994) e OIE (2008) relataram que as PPDs-maleínas purificadas
223 parcialmente podem ser amplamente utilizadas no diagnóstico do mormo devido a sua
224 alta atividade maleinogênica. Este teste de diagnóstico que avalia a resposta
225 imunológica mediada por células é comumente usado para diagnóstico do mormo. O
226 teste intradérmico da maleína tem valor preditivo positivo de 92% nas infecções agudas
227 e valor preditivo negativo de 96% nos casos crônicos, sendo a especificidade maior que
228 a sensibilidade. A exclusão das reações falso-positivas é uma das vantagens da técnica
229 (Jana et al., 1982; Al-Ani e Roberson, 2007), podendo a eficácia do teste variar
230 proporcionalmente ao isolamento e purificação dos antígenos usados no kit de
231 diagnóstico (Naureem et al., 2007). Casos muito avançados de mormo em cavalos
232 podem produzir anergia ao teste e casos agudos em muares também podem
233 proporcionar resultado não conclusivo necessitando o emprego de métodos adicionais
234 de diagnóstico (Gregory e Waag, 2009).

235 A capacidade na detecção da resposta imune celular da PPD-maleína produzida
236 foi satisfatória quando avaliada biologicamente. Achados semelhantes também foram
237 observados e descritos por Verma et al. (1994) com a PPD-maleína Indiana e
238 Holandesa.

239 No G2 utilizado para avaliar a segurança das duas maleínas não foram detectados
240 anticorpos no teste de fixação do complemento antes da aplicação da maleína, assim
241 como ausência de reação inflamatória em 24 e 48 horas após a inoculação da PPD-

242 maleína 01 e PPD-maleína 02, caracterizando a segurança e ausência de reações falso-
243 positivas. De acordo com a OIE (2008) para a maleína ser segura e não produzir
244 resultados falso-positivos, o edema resultante do inóculo em cobaios ou equídeos não-
245 infectados deve ser mínimo ou dificilmente detectável e transitório sem qualquer sinal
246 de reação positiva.

247 As PPDs-maleínas foram avaliadas durante o processo experimental quanto à
248 esterilidade, comprovando-se a ausência de contaminação do produto inoculado nos
249 animais. Os cobaios do G2 não apresentaram nenhuma alteração local ou sistêmica,
250 nem óbito devido à inoculação do imunógeno, confirmando a inocuidade do produto
251 (Ulrich e Deshazer, 2004; Mota et al., 2008).

252 A purificação parcial da maleína é suficiente para o desenvolvimento da reação
253 positiva detectável e de acordo com Selvaraj et al. (2002) um único antígeno, embora
254 potente pode ser insuficiente para estimular um número adequado de células efectoras da
255 reação de HTT para produção de uma resposta visível. Outra provável razão para
256 utilização de múltiplos antígenos é a possibilidade de reduzir problemas relacionados à
257 restrição genética no reconhecimento antigênico, visto que pode existir elevada
258 variabilidade entre indivíduos.

259 Os achados histopatológicos foram semelhantes para ambas as PPDs-maleínas,
260 não havendo diferenças macro e microscópicas significativas. Nos animais do G1, as
261 lesões foram caracterizadas por dermatite ulcerativa e abscedativa, aguda, multifocal a
262 localmente extensa, acentuada, associada a trombos, paniculite e necrose de fibras
263 musculares esqueléticas adjacentes. Entre as fibras necróticas observou-se também
264 infiltrado mononuclear. A reação inflamatória variou de moderada a acentuada de
265 acordo com a gravidade do processo e sempre acompanhada por ulceração da epiderme
266 (fig. 3). De acordo com Danneberg (1992), os eventos de HTT são importantes na
267 defesa do hospedeiro, no entanto podem produzir necrose tecidual e a principal
268 característica é o desenvolvimento do processo inflamatório mediado por linfócitos
269 TCD4+ e a formação de infiltrado de macrófagos, que neste caso se comporta como a
270 principal célula apresentadora de antígeno bacteriano para o linfócito.

271 Nesse experimento confirmou-se o desenvolvimento da HTT através da
272 observação do infiltrado mononuclear na área do edema em todos os animais G1

273 quando comparado aos animais do G2 que não apresentaram tal reação tecidual. Esses
274 achados histopatológicos constituem um dado importante para confirmar a resposta
275 imunológica celular adquirida.

276

277 **4. CONCLUSÃO**

278 O processo utilizado para a produção, precipitação e purificação parcial da
279 proteína, permitiu a obtenção de um produto com propriedades imunogênicas. Os testes
280 biológicos de avaliação da resposta imune celular demonstram que as duas PPD-
281 maleínas testadas produziram reação positiva no teste intradérmico em cobaios
282 previamente sensibilizados com *B. mallei*.

283 O presente estudo atinge seu objetivo principal de produzir um reagente com
284 potencial de uso no diagnóstico do mormo a partir de proteínas purificadas e derivadas
285 de *B. mallei* isoladas no território nacional.

286

287 **AGRADECIMENTOS**

288 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
289 Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
290 Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro para a realização dessa pesquisa.

291

292 **REFERÊNCIAS**

293 Al-Ani, F. K., Roberson, J. 2007. Glanders in horses: A review of the literature. Vet.
294 arhiv 77, 203-218.

295 Amemiya, K., Meyers, J. L., Deshazer, D., Riggs, R. N. et al. 2007. Detection of the
296 host immune response to *Burkholderia mallei* heat-shock proteins GroEL and
297 DnaK in a glanders patient and infected mice. Diag Microb Infect Diseases 59, 137–
298 147.

299 Anuntagool, N., Sirisinha, S. 2002. Antigenical relatedness between *Burkholderia*
300 *pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. Microb Immun, 46, 143-150.

- 301 BRASIL - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2004. IN nº 12, de 29
302 de janeiro - Requisitos de qualidade para credenciamento e monitoramento de
303 laboratórios para o diagnóstico sorológico do mormo. www.agricultura.gov.br.
304 Acesso em 12/01/2010.
- 305 Burtnick, M. N., Brett, P.J., Woods, D.E. 2002. Molecular and physical characterization
306 of *Burkholderia mallei* O antigens. J. Bacteriol., 184, 849-852.
- 307 Confederação da Agricultura e Pecuária Do Brasil. 2005. Disponível em:
308 <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 14 de fevereiro de 2008.
- 309 Dannenberg, A.M. 1992. Delayed-type hypersensitivity and cell mediated immunity in
310 pathogenesis of tuberculosis. Immunol Today 13, 228 - 233.
- 311 Gregory, B. C., Waag, D. M. 2009. Glanders. Med. Aspect. of Biolog. Warf. 6, 121-
312 146.
- 313 Jana, A. M., Gupta, A. K., Pandya, G., Verma, R. D., Rao, K. M. 1982. Rapid
314 diagnosis of glanders in equine by counterimmunoelectrophoresis. Indian Vet. J.
315 59, 5-9.
- 316 Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of
317 bacteriophage T4. Nature, 22, 680 – 685.
- 318 Mota, R. A., Brito, M. F., Castro, F. J. C., et al. 2000. Mormo em equídeos nos Estados
319 de P Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. Pesq. Vet. Bras.
320 20, 155-159.
- 321 Mota, R.A., Silva, L.B.G., Silva, K.P.C., Silva et al. 2005. Caracterización bioquímica y
322 perfil de sensibilidad antimicrobiana *in vitro* de *Burkholderia mallei* aisladas de
323 équido...Arq. Inst. Biol. 72, 7-11.
- 324 Mota, R. A., Silva, L. B. G., Cunha, A. P., Sobrinho, E. S. N., Pinheiro Jr, A. P. et al.
325 2008. Alterações clínicas em cobaias (*Cavia porcellus*) inoculados
326 experimentalmente com isolados de campo de *Burkholderia mallei* de equídeos
327 com mormo. Med Vet. 02, 1-9.
- 328 Naureen, A., Saqib, M., Muhammad, G., Hussain, M. H., Muhammad, N. 2007.
329 Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and

- 330 some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *Asi J Vet*
331 *Diagn Invest* 19, 362–367.
- 332 Neubauer, H. Sprague, L. D., Zacharia, R., Tomaso, H., et al., 2005. Serodiagnosis of
333 *Burkholderia mallei* infections in horses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.*
334 52, 201-205
- 335 OIE – World Animal Health Organisation. 2008 - Manual of Diagnostic Tests and
336 Vaccines for Terrestrial Animals. Oie.int/eng/en_index.htm. 01:01-17.
- 337 Selvaraj, R., Gopalw, G., Raja, A., Kumaraswami, V. 2002. Pattern recognition
338 technique in immunological antigenic tests to identify *Mycobacterium*
339 *tuberculosis* infection. *Tuberculosis.* 82, 261-266.
- 340 Schell, M. A., Ulrich, R.L., Ribot, W.J., Brueggemann, E.E. et al. 2007. Type VI
341 secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Mol Microb,* 64,
342 1466-1485.
- 343 Silva, K. P. C., Takaki, G. M. C., Mota, R. A., Jará, A. M. A. T. et al. 2008.
344 Caracterização fenotípica, perfil da atividade antimicrobiana, identificação de
345 fatores de virulência e toxicidade de *Burkholderia mallei* isoladas no estado de
346 pernambuco e alagoas. XI Encontro Nac Microb Ambiental, X Simpósio Bras
347 Microb do Solo. 01: 30-34.
- 348 Silva, K. P. C., Mota, R. A., Cunha, A. P., Silva, L. B. G. et al. 2009. Caracterização
349 fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região
350 Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.* 29, 439-444.
- 351 Ulrich, R. L., Deshazer, D. 2004. Type III Secretion: a Virulence Factor Delivery
352 System Essential for the Pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infect Immun,* 72,
353 1150–1154.
- 354 Tyawisutsri, R., Peacock, S.J., Langa, S., Limmathurotsakul, D. et al. 2005. Antibodies
355 from patients with melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not
356 *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemmagglutination assay. *J Clin*
357 *Microb,* 43, 4872-74.

- 358 Tyawisutsri, R., Holden, M.T.G., Tumapa, S., Reginpipat, S., et al. 2007. *Burkholderia*
359 Hep_Hap autotransporter (BuHA) proteins elicit a strong antibody response during
360 experimental glanders but not human melioidosis. BMC Microbiol, 7-19.
- 361 Verma, R.D., Sharma, J.K., Venkateswaran, K.S., Batra, H.V. 1990. Development of an
362 avidin-biotin dot enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with
363 other serological tests for diagnosis of glanders in equines. Vet. Microbiol., 25, 77-
364 85.
- 365 Verma, R. D., Venkateswaran, K. S., Sharma, J. K., Agarwal G. S. 1994. Potency of
366 partially purified malleo-proteins for mallein test in the diagnosis of glanders in
367 equines. Vet Microbiol. 41, 391-7.
- 368 Wuthiekanun, V., Anuntagool, N., White, N.J., Sirisinha, S. 2002. Short report: A rapid
369 method for the differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia*
370 *thailandensis*, Am. J of Trop. Med., 66, 759-61.
- 371 Yabuuchi, E., Y. Kosako, H. Oyaizu, et al. 1992. Proposal of *Burkholderia* genus and
372 transfer of seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus.
373 J. Microb. Immunol. 36, 1251-1275.

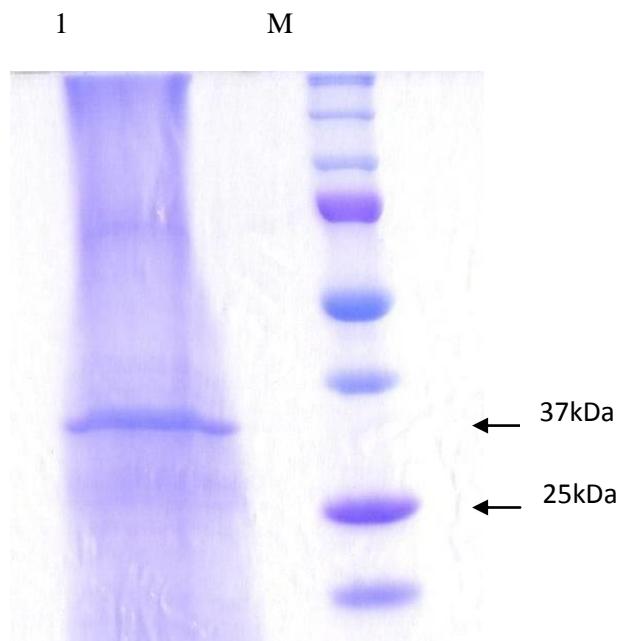
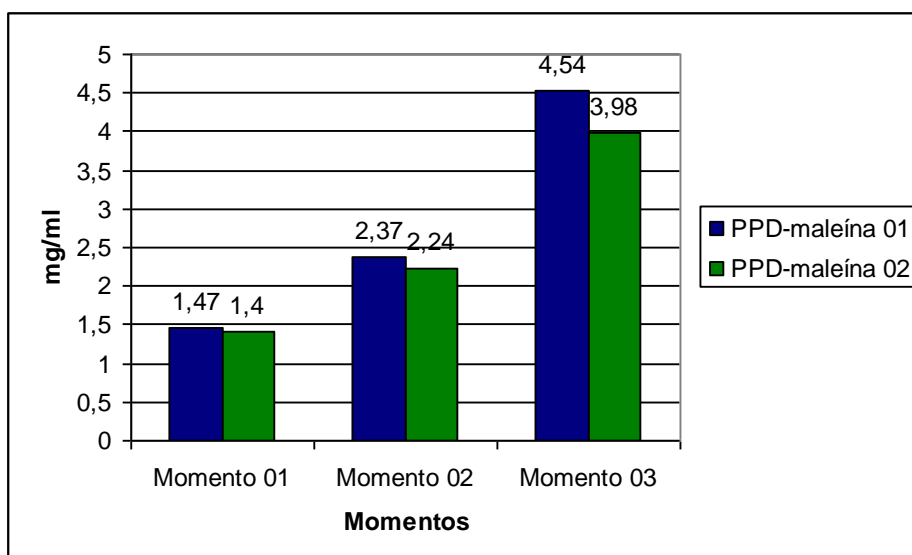
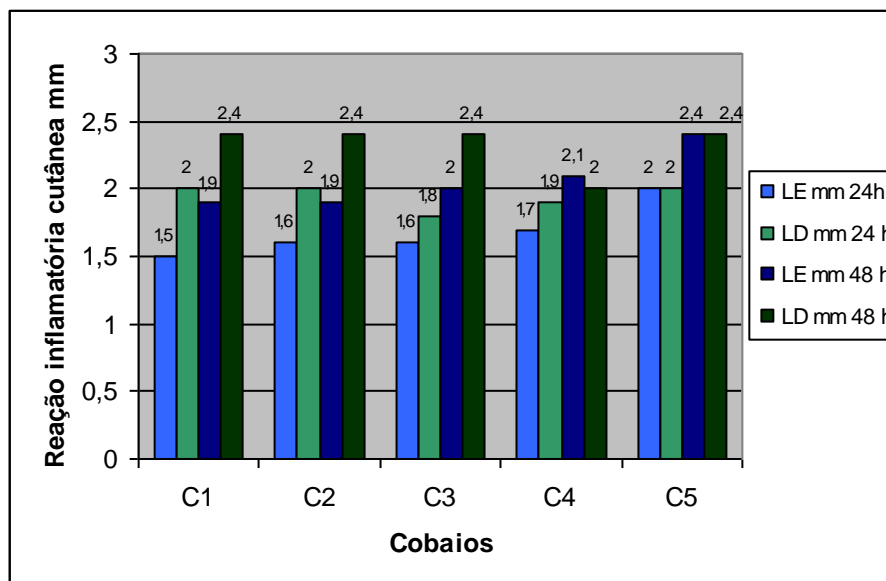


Fig. 1. Perfil eletroforético em SDS PAGE de extrato protéico de *B. mallei* (maleína), onde: M: Marcador de massa molecular (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Biorad); 1: 10 μ L de extrato protéico de *B. mallei*.



Graf. 1. Avaliação da concentração de proteínas em três momentos na produção da PPD-maleína, PPD-maleína 01 (azul) e PPD-maleína 02 (verde).



Graf. 2. Avaliação das reações imunoalérgico-cutâneo resultantes das inoculações intradérmicas de PPD-maleína 01 e PPD-maleína 02. LE: lateral esquerda, LD: lateral direita e mm: milímetros.



Fig. 2. Avaliação da reação imuno-alérgica cutânea em 48 horas após a inoculação das PPDs-maleínas no grupo de cobaios sensibilizados.

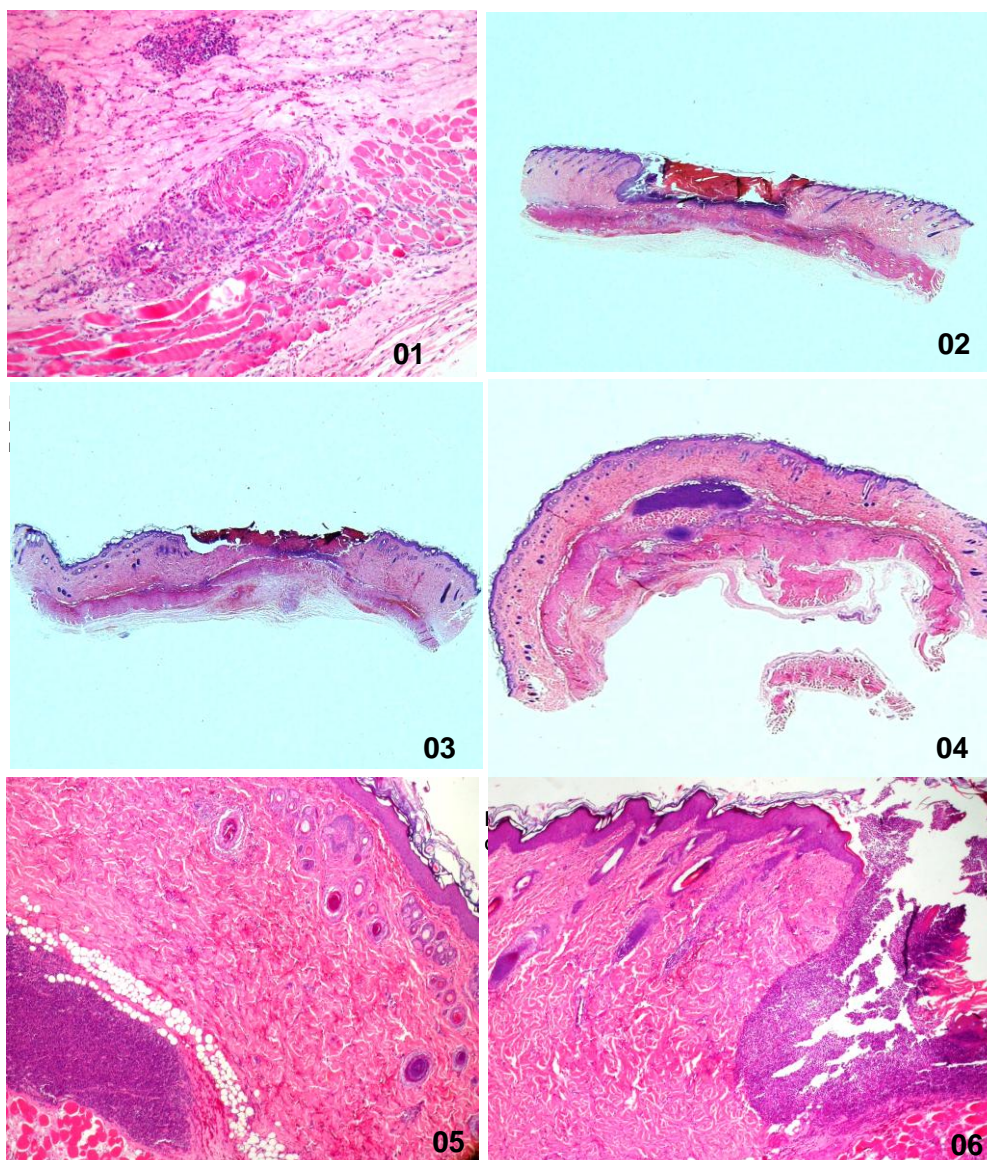
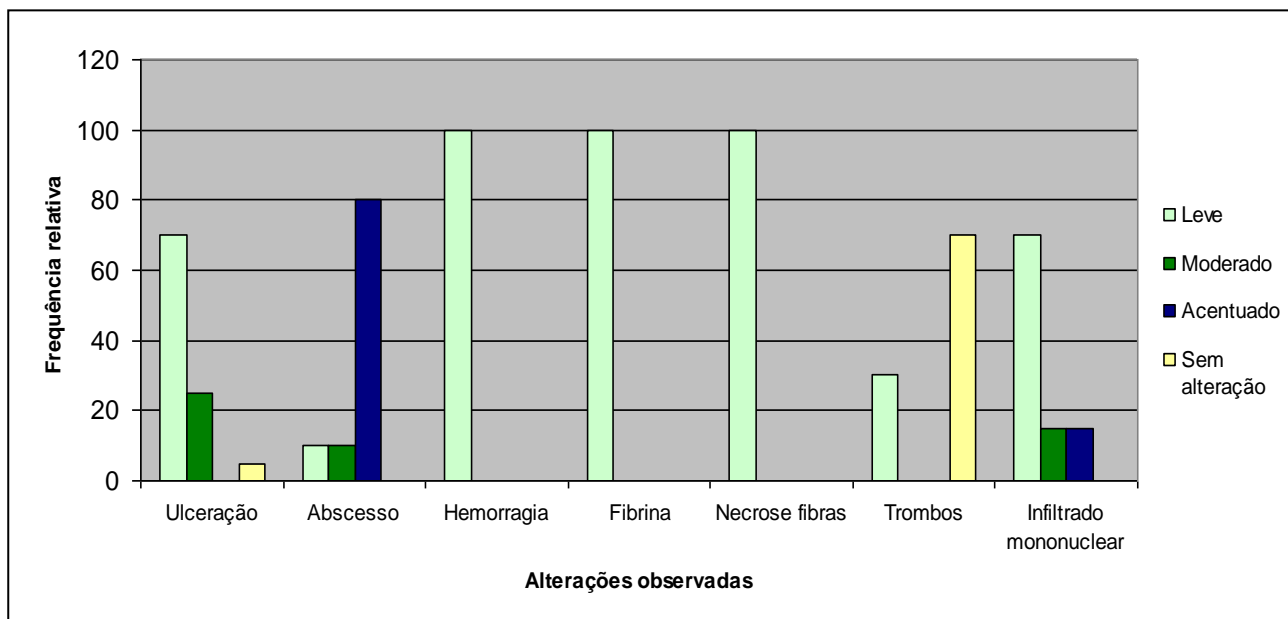


Figura 03. 01: pele. Observa-se trombo e fibras musculares necróticas com discreto infiltrado mononuclear H.E. obj 20X; 02 – foto submacroscópica da pele com área localmente extensa de ulceração da epiderme e restos necróticos limitada por infiltrado inflamatório predominantemente neutrofílico na derme profunda e subcutâneo; 03 - foto submacroscópica da pele apresentando área localmente extensa de ulceração da epiderme com restos necróticos e infiltrado de neutrófilos aglomerados na derme profunda e subcutâneo; 04 – foto submacroscópica da pele com abscessos no subcutâneo; 05 – pele íntegra com abscesso no subcutâneo. HE. Obj. 20X e 06 – Pele ulcerada com acentuada presença de infiltrado de neutrófilos na derme superficial e profunda.



Graf. 3: Descrição da frequência de lesões encontradas na análise histopatológica da pele de cobaias reagentes a maleinização com PPD-maleína 01 e 02.

5.3 ARTIGO

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA MALEÍNA PRODUZIDA NO BRASIL PARA O DIAGNÓSTICO DO MORMO

(Artigo formatado para o periódico Brazilian Journal of Microbiology)

1 **AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA MALEÍNA PRODUZIDA NO BRASIL PARA**
2 **O DIAGNÓSTICO DO MORMO**

3 **EFFECTIVENESS EVALUATION PPD-MALLEIN PRODUCED IN BRAZIL FOR**
4 **DIAGNOSIS OF GLANDERS**

5 **Karla Patrícia Chaves da Silva¹, Galba Maria de Campos Takaki², Leonildo Bento**
6 **Galiza as Silva³, Tomoe Noda Saukas³, André Souza Santos³, Rinaldo Aparecido Mota^{3*}**

7 ¹ Departamento de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Alagoas (UFAL), ² Núcleo de Pesquisas em
8 Ciências Ambientais – Universidade Católica de Pernambuco, ³ Departamento de Medicina Veterinária -
9 Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

10
11 Submetido em:

12 **RESUMO**

13 Para avaliar a potência da PPD-maleína produzida no Brasil foram utilizados asininos
14 infectados naturalmente com sinais clínicos, diagnóstico bacteriológico e sorológico
15 positivo para o mormo e asininos negativos na sorologia e bacteriologia. Obteve-se
16 PPD-maleína a partir de linhagens de *Burkholderia mallei* por precipitação com ácido
17 tricloroacético e sulfato de amônio. Os animais foram inoculados de acordo com os
18 critérios estabelecidos pela IN nº24 do Ministério da Agricultura Pecuária e
19 Abastecimento (MAPA) referente ao diagnóstico do mormo. Após 48 horas da
20 aplicação da PPD-maleína, observou-se edema na área da aplicação, presença de
21 secreção ocular e lacrimejamento nos animais doentes. Os animais do grupo controle
22 não apresentaram reação inflamatória no local de inoculação da PPD-maleína. Esse
23 imunógeno produzido e em fase de teste no Brasil foi eficiente para identificar a
24 infecção nos animais verdadeiro positivos e excluir os verdadeiro negativos, sendo uma
25 nova possibilidade para o diagnóstico e controle do mormo no Brasil.

26 **PALAVRAS – CHAVES: Maleinização, *Equus asinus*, diagnóstico.**

*Autor para correspondência: Laboratório de Bacteriologia Veterinária – Departamento de Medicina Veterinária –
Universidade Federal Rural de Pernambuco - Rua Dom Manuel de Medeiros, nº CEP – Dois Irmão, Recife,
Pernambuco – Brasil, Tel: (82) 9987-3301; e-mail: rinaldo.mota@gmail.com

27

ABSTRACT

28 To assess the potency of PPD-mallein produced in Brazil were used asinines with
29 clinical signs, and bacteriological diagnosis and positive serology for glanders and
30 asinines negative in serology and bacteriology. It was obtained PPD-mallein from
31 brazilian *Burkholderia mallei* strains by precipitation with trichloroacetic acid and
32 ammonium sulfate. The animals were inoculated according to the criteria established by
33 paragraph IN n°24 of brazilian Agriculture Ministerial regarding the diagnosis of
34 glanders. Swelling in the area of injection, presence of ocular discharge and tearing in
35 sick animals was observed 48 hours after PPD-mallein application. Control group
36 animals showed no inflammatory reaction at the site of inoculation of PPD-mallein.
37 This immunogen produced and being tested in Brazil was effective for identifying
38 infection in animals truly positive and exclude truly negative, being a new possibility
39 for diagnosis and control of glanders in Brazil.

40 **KEYWORDS:** Mallein test, *Equus asinus*, diagnosis.

41

42 O mormo é uma doença bacteriana e fatal dos equídeos causada por
43 *Burkholderia mallei*. A doença geralmente é crônica em cavalos e aguda em muare e
44 asininos (2). No Brasil, a reemergência da doença foi identificada no final do século
45 passado por meio da descrição dos aspectos clínicos, microbiológico e sorológico em
46 equídeos na Zona da Mata nos estados de Pernambuco e Alagoas (7)

47 O diagnóstico do mormo no Brasil segue os critérios estabelecidos pela
48 Instrução Normativa n° 24 do MAPA para o controle e a erradicação da doença. Para o
49 diagnóstico recomenda a utilização do teste sorológico de fixação do complemento e

50 naqueles animais cujos soros são anticomplementares ou que auto-reagem com o
51 antígeno normal na FC devem ser testados na maleinização utilizando maleína
52 importada (3, 10, 14, 15).

53 Existe a possibilidade de reação inespecífica nos testes sorológicos devido a
54 antígenos homólogos entre *B. mallei* e *B. pseudomallei*. Essa reação pode resultar em
55 um diagnóstico falso-positivo, especialmente em animais importados de áreas onde
56 ocorre a melioidose em humanos. Essa reação não é observada na maleinização (4).

57 A maleinização é similar à tuberculização, sendo a maleína uma glicoproteína
58 extraída a partir de culturas de *B. mallei* que é utilizada como antígeno no teste
59 intradermo-palpebral em equídeos (10, 14, 15). Esse teste se baseia na detecção da
60 resposta imune celular e apresenta maior especificidade no diagnóstico do mormo.

61 Considerando a possibilidade de contribuir para o diagnóstico do mormo no
62 Brasil foi produzido uma PPD-maleína por meio da precipitação e purificação ácida
63 para uso em testes de maleinização. Objetivou-se com este trabalho avaliar a potência
64 desse imunógeno em asininos com diagnóstico clínico, sorológico e bacteriológico
65 positivos para o mormo.

66 Para avaliação da PPD-maleína utilizou-se dez muares (*Equus asinus*), adultos,
67 provenientes da Zona da Mata do estado de Pernambuco. Cinco animais provinientes de
68 uma propriedade identificada como foco para o mormo. Estes animais apresentavam
69 sinais clínicos sugestivo da doença e os outros cinco, provenientes de propriedade livre
70 de mormo, não apresentaram sinais clínicos e foram negativos na sorologia (grupo
71 controle).

72 Para confirmar o diagnóstico da doença nos animais testados empregou-se a
73 técnica sorológica de fixação do complemento seguido do exame bacteriológico. Os
74 conteúdos purulentos dos nódulos cutâneos dos animais com sinais clínicos, foram
75 semeados em placas de Petri contendo ágar base enriquecido com 10% de sangue ovino
76 e as placas foram incubadas a 37°C por 72 horas. Posteriormente as bactérias foram
77 identificadas por meio de provas bioquímicas de oxidase, catalase, Voges Proskauer
78 (V.P.), indol, produção de H₂S, motilidade, hidrólise da arginina, gás de D-glicose,
79 liquefação da gelatina, urease, glicose, maltose, galactose, lactose, frutose, manose,
80 sacarose e manitol (7).

81 Ao exame clínico dos animais doentes, observou-se edema dos membros
82 pélvicos e prepúcio, linfangite na região do pescoço, cabeça e membros, secreção nasal
83 bilateral purulenta, dispnéia, extertores pulmonares e emagrecimento progressivo. O
84 diagnóstico clínico foi sugestivo de mormo (7, 12).

85 Após a comprovação da infecção por meio do isolamento bacteriano e pesquisa
86 de anticorpos, utilizou-se a PPD-maleína produzida no Brasil para confirmar a doença.
87 Aplicou-se 0,1mL do imunógeno por via intradérmica na pálpebra inferior do olho
88 direito de cada animal. Para comprovar a eficácia da maleína também foram inoculados
89 nas mesmas condições anteriores, cinco muare sorologica e bacteriologicamente
90 negativos para o mormo. A leitura foi realizada após 48 horas e obedeceu aos critérios
91 estabelecidos na IN. n°24 (3, 11) que caracterizam como reação positiva a presença de
92 edema persistente com ou sem observação de secreção ocular.

93 Os cinco animais doentes foram reagentes ao teste e apresentaram edema
94 progressivo e persistente iniciando-se às 24 e acentuando-se às 48 horas após a

95 inoculação; em alguns animais observou-se secreção ocular e em outros não. No grupo
96 controle não foi observada reação inflamatória ou qualquer outro sinal clínico na área
97 inoculada (Figura 01).

98 A PPD-maleína testada induziu resposta inflamatória nos animais doentes que
99 desenvolveram reação alérgica e exibiram as reações de Hipersensibilidade do Tipo
100 Tardia (HTT) (Figura 02). A reação positiva intradermopalpebral além de ser
101 caracterizada por edema ocular também pode ser associada a outros achados como
102 fotossensibilidade, lacrimejamento e supuração em até 48 horas após a inoculação (4).
103 Esses achados também foram observados neste estudo nos animais positivos.

104 A variação no padrão da resposta inflamatória após a inoculação da PPD-
105 maleína em animais infectados está diretamente relacionada ao grau de infecção em
106 cada equídeo. Nas fases de bacteremia onde ocorre a circulação mais intensa do agente
107 infeccioso, o estímulo antigênico é maior gerando maior efeito de citocinas como a IL-2
108 que reforça a ativação de linfócitos Th-1 ativados contra *B. mallei*, intensificando assim
109 as reações de HTT (1).

110 A maleinização possui maior especificidade no diagnóstico do mormo quando
111 comparada a outras técnicas e sua boa sensibilidade deve ser considerada para a
112 confirmação dos casos positivos, assim como para sanar dúvidas na reação de FC (8). O
113 teste é pouco dispendioso, de fácil aplicação e é comumente usado em áreas endêmicas
114 para identificar cavalos portadores da infecção após a realização da sorologia. A
115 desvantagem do teste é que pode causar soroconversões transitórias em animais
116 saudáveis não infectados por até 45 dias após o teste. Dessa forma, os soros dos animais
117 negativos testados se tornam reagentes na prova de FC (4, 5).

118 Outra limitação do teste maleína inclui os resultados negativos em cavalos no
119 estágio avançado da doença devido ao desenvolvimento de anergia em consequência à
120 tolerância imunológica periférica (6, 13).

121 Estudo realizado em equinos sadios e infectados considerou que o teste de
122 maleína é perfeitamente confiável, mesmo nos casos iniciais da doença (9). Com valor
123 preditivo positivo de 92% na fase aguda e crônica
124 da doença e um valor preditivo negativo de 96% nos casos avançados, é o teste mais
125 indicado para esclarecer os casos suspeitos de mormo no teste de FC. Outros testes
126 como a reação de aglutinação, inibição da hemaglutinação e imunoeletroforese são
127 inferiores em especificidade e sensibilidade quando comparados à maleína (15).

128 No presente estudo, apesar do pequeno número de animais testados, a maleína
129 produzida foi eficiente para identificar os animais verdadeiros positivos e aqueles
130 negativos para o mormo com 100% de concordância entre eles, sendo uma nova
131 possibilidade para o diagnóstico e controle do mormo no país. Contudo, é necessário
132 aplicar esse imunógeno em número maior de animais positivos e negativos para
133 eliminar possíveis dúvidas de interpretação no diagnóstico dessa enfermidade. Além
134 disso, perspectivas futuras para a padronização e validação de um teste sorológico
135 rápido com alta sensibilidade aplicável à rotina de diagnóstico deve ser considerado
136 para reduzir as reações inespecíficas e aumentar a concordância entre o teste sorológico
137 e a maleína.

138

AGRADECIMENTOS

139 Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
140 Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de
141 Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro a realização da pesquisa.

REFERÊNCIAS

142

- 143 1. Amemiya, K.; Bush, G.V.; Desahazer, D.; Waag, D. M. (2002). Nonviable
144 *Burkholderia mallei* induces a mixed Th1 and Th2 – like cytokine response in BALB/c
145 mice. *Infect Immun.* 70, 2319-2325.
- 146 2. Al-Ani, F. K.; Al-Rawsashdeh, O. F.; Ali, H. A.; Hassan, F. K. (1998) Glanders in
147 horses: clinical, biochemical and serological studies in Iraq. *Vet. Arhiv* 68, 155-162.
- 148 3. BRASIL – MAPA: Ministério Da Agricultura Pecuária E Abastecimento. *I.N. n° 24*
149 *de 05 de Abril de 2004*. Normas para o Controle e a Erradicação do Mormo.
- 150 4. Hagebock, J. M.; Schlater, L. K.; Frerichs, W. M.; Olson, D. P. (1993). Serologic
151 responses to the mallein test for glanders in solipeds. *J Vet Diagn Invest.* 5, 97-99.
- 152 5. Huitema, H. (1969). Production of mallein PPD. *Neth J Vet Sci.* 2, 127 – 133.
- 153 6. Jana, A.M.; Gupta, A.K.; Pandya, G.; Verma, R.D.; Rao, K.M. (1982). Rapid
154 diagnosis of glanders in equines by counter-immuno-electrophoresis. *Indian Vet J.* 59,
155 5-9.
- 156 7. Mota, R. A.; Brito, M. F.; Castro, F. J. C.; *et al.*, (2000). Mormo em equídeos nos
157 Estados de P Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesq. Vet.*
158 *Bras.* 20(4), 155-159.
- 159 8. Naureen, A.; Saqib, M.; Muhammad, G.; Hussain, M. H.; Muhammad, N. (2007).
160 Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some
161 conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *Asi J Vet Diagn Invest*
162 19, 362–367.

- 163 9. Naureen, A.; Saqib, M.; Asi, M. A.; Hussain, M. H.; Ghulam, M. (2008). On-Site
164 Test For Equine Glanders. *Equine Disease Quarterly*. 17(1), 3-4.
- 165 10. Neubauer, H.; Sprague, L. D.; Zacharia, R.; Tomaso, H.; *et al.* (2005).
166 Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses. *J Vet Med B Infect Dis Vet*
167 *Public Health*. 52(5), 201-205
- 168 11. OIE – World Animal Health Organisation. (2008) - Manual of Diagnostic Tests and
169 Vaccines for Terrestrial Animals. *Oie.int/eng/en_index.htm*. 01:01-17.
- 170 12. Rabelo, S.S.A.; Soares, P.C.; Mota, R. A.; (2006). Indicadores clínicos em muare
171 naturalmente infectados pela *Burkholderia mallei*. *Vet Zootec*, 13, 54-62.
- 172 13. Verma, R.D. (1981). Glanders in India with special reference if incidence and
173 epidemiology. *Indian Vet. J.* 58, 177-183.
- 174 14. Verma, R.D.; Sharma, J.K.; Venkateswaran, K.S.; Batra, H.V. (1990). Development
175 of an avidinbiotin dot enzyme-linked immu-nosorbent assay and its comparison with
176 other serological tests for diagnosis of glanders in equines. *Vet Microbiol.* 15, 77-85.
- 177 15. Verma, R.D.; Venkateswaran, K.S.; Sharma, J.K.; Agarwal, G.S. (1994). Potency of
178 partially purified malleo-proteins for mallein test in the diagnosis of glanders in equines.
179 *Vet. Microbiol.* 41, 391-397.



Figura 01. Olho esquerdo de *Equus asinus* negativo para o mormo e inoculado com PPD-maleína brasileira. – ausência de reação inflamatória.

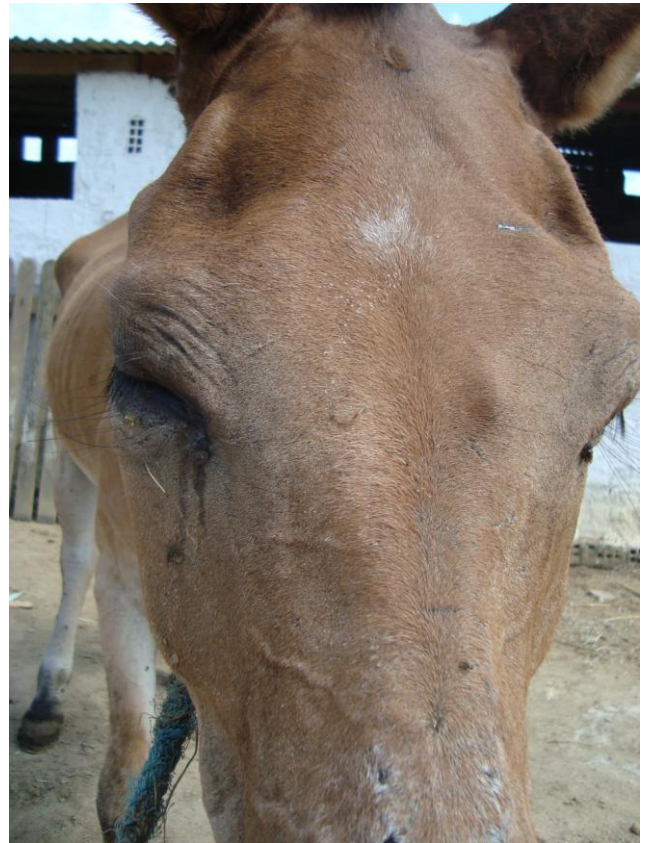


Figura 02. Teste de Maleinização positivo com PPD-maleína brasileira – edema e secreção da pálpebra inferior direita em *Equus asinus*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As estirpes de *B. mallei* são capazes de produzir atividades de protease que é um fator de virulência bacteriano e os metabólitos antigos podem ser utilizados em biotecnologias como a produção de maleína devido à baixa toxicidade. A resistência da bactéria a alguns antimicrobianos é importante para a exclusão dessas drogas no tratamento do mormo em humanos, mesmo que até o momento não tenham sido notificados casos no Brasil.

Os resultados obtidos na produção e purificação da maleína no Brasil com o novo bioprocessamento mostrou-se eficiente na obtenção de um imunógeno com pureza e capacidade de identificar cobaios positivos para o mormo e de estimular nestes animais as reações de hipersensibilidade do tipo IV específicas para *B. mallei*.

A identificação de mueres com mormo utilizando a PPD-maleína brasileira e a ausência de reação em animais negativos viabiliza a aplicação deste novo antígeno na rotina de diagnóstico, podendo futuramente com o desenvolvimento de novos testes auxiliar no Programa de Controle e Erradicação do Mormo.

Novos estudos devem ser realizados objetivando a produção de imunógenos que demandem o uso de outras tecnologias como a produção de proteínas recombinantes em substituição à PPD-maleína ou a elaboração de outros ensaios que possuam superior especificidade e sensibilidade e que sejam de fácil aplicação no campo.

ANEXOS



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo da revista](#)
- [Submissão de manuscrito](#)
- [Publicação de manuscrito](#)
- [Preparação de manuscrito](#)

ISSN 1517-8382 *versão impressa*

ISSN 1678-4405 *versão online*

Submissão de manuscrito

Um artigo para ser submetido ao *Brazilian Journal of Microbiology* não deve ter sido previamente publicado (exceto na forma de resumo) nem ter sido submetido em qualquer outro periódico.

As instruções para submissão *online* estão disponíveis neste site.

Todos os autores serão informados por mensagem eletrônica a respeito da submissão eletrônica. A mensagem também questionará se todos os autores concordam com a submissão. Ausência de resposta será considerada como concordância à submissão.

A responsabilidade pela exatidão do conteúdo do manuscrito é de inteira responsabilidade dos autores.

Publicação de manuscrito

Os artigos são aceitos para publicação após terem sido revisados de forma crítica por pelo menos dois revisores, indicados pelos editores.

As sugestões e recomendações dos revisores e editores serão encaminhadas eletronicamente ao autor para correspondência, o qual deverá retornar o artigo revisado aos editores na data estipulada, pelo sistema *online*. O autor para correspondência deverá explicar ou comentar as alterações introduzidas no texto.

O autor para correspondência receberá uma mensagem eletrônica sempre que houver alteração do *status* do artigo.

Não é necessário ser associado da Sociedade Brasileira de Microbiologia para submeter artigo para publicação.

Todos os cientistas, brasileiros ou estrangeiros, são convidados a submeterem artigos para publicação.

ÉTICA

O(s) autor(es) devem informar, no texto do artigo, se o projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa de sua Instituição, em consoante à Declaração de Helsinki (<http://www.ufrgs.br/HCPA/gppg/helsin5.htm>). Nos trabalhos experimentais que envolvem animais, as normas estabelecidas no "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*" (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington, D. C. 1996), e os "Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA - <http://www.cobea.org.br/index.php?pg=Principios%20Eticos>) devem ser respeitados.

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em PDF. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.**

Para **artigos originais**, o arquivo em PDF deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **notas prévias**, o arquivo em PDF deve conter:

- Título
- Resumo (até 50 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto não dividido em tópicos
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em PDF deve conter:

- Título
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de

baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Notas prévias devem conter 10 páginas. Figuras e tabelas devem estar restritas a, no máximo, duas figuras ou duas tabelas ou uma figura e uma tabela.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

As referências no texto devem ser citadas pelos seus números. As citações de autores no texto devem ser feitas de acordo com o seguinte exemplo: Bergdoll (número) reported that..., Bailey and Cox (número) observed that..., ou Smith *et al.* (número) mentioned that... Não use caixa alta para redigir o nome completo dos autores.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

🔗 American Journal Experts:

<http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>

🔗 Joanne Roberts: jroberts@uol.com.br

🔗 ATO Traduções: www.atotraining.com.br

🔗 Evanir Brunelli: ive.brunelli@gmail.com

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como “Effects of”, “Influence of”, “Study on”, etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser numeradas sequencialmente em ordem alfabética, pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As referências devem ser citadas no texto por seus números com um espaço entre o número das referências (3, 7, 22). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo do *BIOSIS*. Todas as referências listadas devem ser citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem ser incluídas na lista final.

Exemplos:

a. Artigos de Periódicos

Brito, D.V.D.; Oliveira, E.J.; Darini, A.L.C.; Abdalla, V.O.S.; Gontijo Filho, P.P. (2006). Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 37 (2), 101-107.

b. Artigos ou Capítulos de Livro

Franco, B.D.G.M.; Landgraf, M.; Destro, M.T.; Gelli, D.S. (2003). Foodborne diseases in Southern South America. In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). *International Handbook of Foodborne Pathogens*. Marcel Dekker, New York, USA, p.733-743.

c. Livros

Montville, T.J.; Matthews, K.R. (2005). *Food Microbiology – an introduction*. ASM Press, Washington, D.C.

d. Patentes

Hussong, R.V.; Marth, E.H.; Vakaleris, D.G. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. Teses e Dissertações

Santos, M.V.B. (2005). *O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de Paracoccidíoides brasiliensis na evolução da doença experimental*. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)

Silveira, T.S.; Martins, J.L.; Abreu, F.A.; Rosado, A.S.; Lins, U.G.C. (2005). Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. Publicações na Web

Abdullah, M.A.F.; Valaitis, A.P.; Dean, D.H. (2006). Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. Webpage

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection.

Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

Referências como “personal communication” ou “unpublished data” devem ser evitadas, embora se reconheça que às vezes elas devam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista de referências. Referências consistem de artigos que são “aceitos para publicação” ou “no prelo”. No entanto, referências de artigos que são “submetidos” ou “em preparo” não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: cada tabela deve ser apresentada em folha separada e numerada seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas.

FIGURAS: cada figura deve ser apresentada em folha separada e numerada seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras.

FOTOGRAFIAS: as fotos devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução (no mínimo de 150dpi).

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

DIREITOS AUTORAIS

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para BJM (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Transferência de “Direitos Autorais”

“O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores.”

Artigo n°. _____

Título do Artigo:

"

"

Nome(s) do(s) Autor(es)

Assinatura(s)

Data: ____/____/____

***Journal of Biotechnology* - Guide for Authors**



Introduction

Journal of Biotechnology provides a medium for the rapid publication of both full-length articles and short communications on novel and innovative aspects of biotechnology. The Journal will accept papers ranging from genetic or molecular biological positions to those covering biochemical, chemical or bioprocess engineering aspects as well as computer application of new software concepts, provided that in each case the material is directly relevant to biotechnological systems. Papers presenting information of a multidisciplinary nature that would not be suitable for publication in a journal devoted to a single discipline, are particularly welcome. The following areas are covered in the Journal:

- * Nucleic Acids/Molecular Biology
- * Physiology/Biochemistry
- * Biochemical Engineering/Bioprocess Engineering
- * Industrial Processes/New Products
- * Medical Biotechnology
- * Agro- and Food Biotechnology
- * Genomics and Bioinformatics

Types of Paper

(1) Full-length papers, generally not exceeding 15 typewritten pages. Full-length papers should: (a) be divided into sections (Abstract, Introduction, Materials and methods, Results, Discussion); (b) contain an Abstract, not exceeding 200 words, at the beginning of the paper, followed by 3-6 keywords; (c) not exceed 10-12 printed pages (approximately 15 typewritten pages) including the space required for figures. (2) Short Communications, not exceeding 1500 words or equivalent space including figures and tables. These must be brief definitive reports and not preliminary findings. Short communications need not be divided into Materials and Methods, Results and Discussion, instead, Materials and Methods may be described in the text or, if appropriate, in figure legends or table footnotes. (3) Reviews will be published following invitation from Editors or by the suggestion of authors. (4) Special Issues on highlighted aspects of biotechnology are also published. Special Issues may contain selected contributions (invited lectures) from international conferences, or a collection of papers on a specific topic, and may be composed of review articles, research papers, and short notes. Guest Editors responsible for the organisation of Special Issues will be invited by the Editors of the Journal, but may also be suggested by scientists who are willing to organize a special issue on a topic that deserves publication. (5) Letters to the Editor and announcements of meetings and courses will be included at the discretion of the Editors and the Publisher.



Before You Begin

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Sponsored articles

This journal offers authors the option to sponsor non-subscriber access to their articles on Elsevier's electronic publishing platforms. For more information please view our Sponsored Articles page at <http://www.elsevier.com/wps/find/authors.authors/sponsoredarticles>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Referees

Please suggest at least 4 internationally recognized researchers as referees with their full name, affiliation and email address. At least 1 of these should be a member of the editorial board of the *Journal of Biotechnology* (for a list of board members see www.elsevier.com/locate/jbiotec).

Additional Information

Instructions regarding GenBank/DNA Sequence Linking: *DNA sequences and GenBank Accession numbers*: Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Elsevier authors wishing to enable other scientists to use the accession numbers cited in their papers via links to these sources, should type this information in the following manner:

For each and every accession number cited in an article, authors should type the accession number in

bold, underlined text. Letters in the accession number should always be capitalised. (See Example 1 below). This combination of letters and format will enable Elsevier's typesetters to recognize the relevant texts as accession numbers and add the required link to GenBank's sequences.

Example 1: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link. In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.



Preparation

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. Do not embed "graphically designed" equations or tables, but prepare these using the wordprocessor's facility. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Do not import the figures into the text file but, instead, indicate their approximate locations directly in the electronic text and on the manuscript. See also the section on Electronic illustrations.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the "spell-check" and "Grammar-check" functions of your wordprocessor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to "the text". Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced, with details of supplier and catalogue number when appropriate. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- *Title*. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- *Author names and affiliations*. Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- *Corresponding author*. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.
- *Present/permanent address*. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

➡ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

Please do not:

- Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet, presentation) document;
- Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;

- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either "Unpublished results" or "Personal communication" Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com>) and Reference Manager (<http://www.refman.com>). Using plug-ins to

wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to

Index Medicus journal abbreviations: <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>;

List of serial title word abbreviations: <http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php>;

CAS (Chemical Abstracts Service): <http://www.cas.org/sent.html>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 30 MB and running time of 5 minutes. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Supplementary material captions

Each supplementary material file should have a short caption which will be placed at the bottom of the article, where it can assist the reader and also be used by search engines.

Submission checklist

It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One Author designated as corresponding Author:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been "spellchecked" and "Grammar-checked"
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.



Author Inquiries

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.