



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL**

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) E ELISA
INDIRETO COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DA *Burkholderia mallei*
(MORMO)**

CECILIA MARIA DE SOUZA LEÃO E SILVA

RECIFE

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) E ELISA
INDIRETO COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DA *Burkholderia mallei*
(MORMO)**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

CECILIA MARIA DE SOUZA LEÃO E SILVA

RECIFE

2014

Ficha Catalográfica

**AVALIAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR) E ELISA
INDIRETO COMO MÉTODO DE DIAGNÓSTICO DA *Burkholderia mallei*
(MORMO)**

CECILIA MARIA DE SOUZA LEÃO E SILVA

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA E APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

EXAMINADORES:

Dr. ROBERTO SOARES DE CASTRO

Dr. FERNANDO LEANDRO DOS SANTOS

Dr. GEORGE CHAVES JIMENEZ

RECIFE - PERNAMBUCO

2014

Aos meus pais, Jorge e Fátima, pela torcida e incentivo contínuo no meu crescimento como pessoa e profissional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde, pela minha família, pelos amigos e por me dar força, me guiando e iluminando em cada passo e conquista da minha vida.

Ao meu pai Jorge e minha mãe Fátima, meus maiores incentivados e meus exemplos de vida. Por sempre me mostrar o caminho, mas deixando que eu sempre escolha minhas decisões ficando sempre ao meu lado. Sou muito feliz em tê-los como meus pais, pois são os melhores do mundo. Obrigada pelo amor incondicional, incentivo, dedicação, torcida, preocupação, cuidado, carinho, aos anos totalmente dedicados a minha formação como pessoa e para que eu tivesse um futuro merecido. AMO VOCÊS!

A minha irmã Carol e meu cunhado Ricardo, por cuidar de mim e por sempre estar ao meu lado quando preciso. A toda família pelo incentivo e apoio ao longo da minha vida, em especial a Tia Teresa e Tio Antônio Marcos por sempre me acompanhar e torcer por mim.

Ao meu namorado e amigo Robson, por aguentar minhas preocupações e meus momentos de estresses ao longo desses dois anos de convivência, pela palavra sempre reconfortante e pelo amor que tem por mim. TE AMO! A minha sogra Maria do Carmo, meu sogro Albérico e meus cunhados Andrea e Fernando pelo carinho que tem por mim.

Ao pessoal do laboratório de bacteriologia do LANAGRO-PE, Luis, Gizele, Raab, Marcos, Marquinhos, Cristiane, Eduardo, Solange, Dra Mabel, Dra. Marcília e Dra Vânia, pelas risadas, conversas, lanches e preocupações. Em especial a Dra. Marcília por assumir, o papel minha segunda mãe, por compartilhar seus conhecimentos sem esperar nada em troca e a Dra. Vânia pelos vários ensinamentos, pela confiança, pelos conselhos e incentivo a sempre buscar e querer mais, pela orientação e sempre me apoiar em todas as minhas decisões. Ao LANAGRO-PE, por permitir utilizar suas dependências e amostras para a realização desta dissertação.

Ao meu amigo e irmão Diogo, pelo carinho, conselhos, ajudas, risadas, conversas e a grande amizade que tem por mim. Ao amigo de sempre Neurisvan pelo companheirismo. A minha turma do mestrado 2012.1 pela convivência nesses dois anos.

A minha banca mais que especial, Fernando Leandro, Roberto Soares e George Jimenez, pela paciência, pelos ensinamentos, pela ajuda e conselhos na minha caminhada pelo crescimento profissional e pessoal.

Ao meu orientador Manoel Adrião, pela generosidade e por acreditar e compartilhar das minhas idéias sempre me incentivando a querer mais e crescer mais. Obrigada.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	8
Lista de Figuras.....	9
Lista de Tabelas.....	10
Resumo.....	12
Abstract.....	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	14
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 ETIOLOGIA.....	14
1.2 EPIDEMIOLOGIA.....	16
1.3 TRANSMISSÃO.....	17
1.4 PATOGÊNESE.....	18
1.5 SINTOMAS.....	19
1.6 DIAGNÓSTICO.....	23
1.7 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE.....	26
1.8 OBJETIVO GERAL.....	28
1.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
1.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29
2. ARTIGO I – Uso do PCR real time (qPCR) para o diagnóstico da <i>Burkholderia mallei</i> utilizando amostras clínicas.....	40
3. ARTIGO II – Avaliação do ELISA indireto e Fixação do Complemento em comparação ao Western Blotting para o diagnóstico do Mormo.....	48
4. REGULAMENTO EDITORIAL E NORMAS DE ESTILO	
Frontiers of Microbiology.....	70
Pesquisa Veterinária Brasileira.....	75
5. CONCLUSÕES.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS

CIEF - Contraimunoelctroforese

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FC – Fixação do Complemento

HAI – Hemaglutinação Indireta

IB - Immunoblot

IFAT – Teste de Anticorpos Fluorescentes Indiretos

LPS - Lipopolissacarídeo

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal.

PCR-RFLP – Reação em Cadeia de Polimerase – **Polimorfismo com fragemento de restrição.**

qPCR – Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real

USDA – United States Departament of Agriculture

WB – Western Blotting.

LISTA DE FIGURAS

Pag

Figura A – Animal apresentando emagrecimento progressivo.....	22
Figura B – Lesões ulcerativas no septo nasal.....	22
Figura C – Cicatriz em forma estrelar na mucosa do septo nasal.....	22
Figura D – Descarga nasal muco purulenta.....	22
Figura E – Nódulo cutâneo que drena secreção purulenta amarelada.....	22

Tabelas do artigo I - Uso do PCR real time (qPCR) para o diagnóstico da *Burkholderia mallei* utilizando amostras clínicas.

Tabela 1: Resultados da reação em cadeia de polimerase (qPCR) em amostras sanguíneas e sorológicas e western blotting.....45

Tabela 2: Avaliação da Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) e acurácia dos exames em relação ao western blotting.....46

Tabela 3: Avaliação da concordância da qPCR em relação ao western blotting.....46

LISTA DE TABELAS

Pag

Tabelas do artigo II - Avaliação do ELISA indireto e Fixação do Complemento em comparação ao Western Blotting para diagnóstico do Mormo

Tabela 1: Resultados dos testes de Fixação do Complemento, western blotting, e ELISA indireto com frequências relativas e absolutas.....	58
Tabela 2: Avaliação da sensibilidade do FC USDA, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting.....	59
Tabela 3 – Avaliação da sensibilidade do C.C. PRO, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting.....	59
Tabela 4 – Avaliação da sensibilidade do ELISA indireto, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting.....	59
Tabela 5 – Avaliação da concordância entre o exame fixação do complemento USDA com fixação do complmento C.C pro, western blooting e ELISA indireto.....	60
Tabela 6: Avaliação da concordância entre a FC C.C. PRO com o western blotting e ELISAI.....	60
Tabela 7: Avaliação da concordância entre o ELISAI e o Western Blotting.....	61
Tabela 8 – Resultado da fixação de complemento utilizando antígeno USDA com diferentes métodos de incubação.....	66
Tabela 9: Avaliação da concordância entre o exame fixação o complemento com antígeno USDA incubação a quente com fixação do complemento com antígeno USDA incubação a frio e fixação do complemento com antígeno C.C.pro.....	66

RESUMO

O Mormo constitui-se em uma doença altamente contagiosa dos solípedes causada pela *Burkholderia mallei*, uma bactéria Gram-negativa, não móvel e cocobacilo aeróbio, infectando primariamente cavalos, burros e mulas, entretanto humanos são considerados hospedeiros acidentais. A *Burkholderia mallei* está relacionada na lista de doenças da Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) como doença de importância de saúde pública, e devido ao seu alto potencial de infecção é referenciada como agente de bioterrorismo. De acordo com a OIE o diagnóstico compreende o teste sorológico, alérgico e o isolamento bacteriano, sendo a fixação do complemento, o teste oficial a ser realizado para trânsito de animais. Este método de diagnóstico está preconizado no Brasil pela Instrução Normativa N° 24 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento por apresentar alta sensibilidade e especificidade. A qPCR sorológica apresentou 76 (16,7%) positividade e uma sensibilidade de 24,7% e especificidade de 89% quando comparado ao western blotting padrão ouro utilizado.. Os resultados mostram que a utilização da qPCR pode ser utilizada como técnica complementar de outras metodologias para identificação rápida e precisa da *Burkholderia mallei*. Em relação aos testes sorológicos, os resultados estatísticos mostraram que o ELISAi apresentou a maior sensibilidade (35,5%) e especificidade (97,6%) quando comparado ao western blotting. Os resultados mostram a necessidade da preparação e utilização de antígenos que sejam produzidos com cepas locais, determinando maior sensibilidade e especificidade ao teste.

Palavras-chave: Mormo, sorologia, imunologia, biologia molecular, anticorpos, proteínas.

ABSTRACT

Glanders is a highly contagious disease caused by *Burkholderia mallei* solipeds, a Gram - negative bacterium, not motility and aerobic coccobacillus, primarily infecting horses, donkeys and mules, though humans are considered accidental hosts . The *Burkholderia mallei* is listed in the list of the World Organisation for Animal Health (OIE) as an important public health disease, and due to its high potential for infection is referred to as a bioterrorism agent. According to the OIE comprises the serological diagnosis, allergy testing and bacterial isolation, and complement fixation, the official test to be performed for trade of animals. This method of diagnosis is recommended in Brazil by Normative Instruction N° 24 Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply by its high sensitivity and specificity. Serological qPCR showed 76 (16.7%) positivity and a sensitivity of 24.7% and a specificity of 89 % when compared to the gold standard western blotting used. The results show that the use of the qPCR may be used as a complementary technique to other methods for rapid and accurate identification of *Burkholderia mallei*. About statistical results showed that the ELISAI showed the highest sensitivity (35.5%) and specificity (97.6 %) when compared to western blotting. The results show the importance of preparation and use of antigens that are produced with local strains, resulting in higher sensitivity and specificity of the test.

Keyword: Glanders, serology, imunity, antibody, molecular biological, proteins.

REVISÃO DE LITERATURA

1. INTRODUÇÃO

O mormo é uma doença zoonótica altamente contagiosa e frequentemente fatal, conhecida desde a antiguidade, que acomete principalmente os equídeos, podendo também infectar diversas outras espécies animais. É causado por um bacilo gram-negativo, aeróbio, não esporulado e imóvel, atualmente classificado como *Burkholderia mallei*, transmitida entre os solípedes, principalmente, pela água e alimentos contaminados. Em equídeos podem determinar quadros agudos, mais comuns em asininos e muares, ou crônicos, mais frequente em equinos, apresentando-se de forma cutânea, pulmonar ou mista, presença de abscessos nodulares cutâneos, vasos linfáticos espessados e endurecidos, e nodulações (CDC 2000; SRINIVASAN et al., 2001; ACHA & SYFFRES, 2003; WAAG & DESHAZER, 2004; GILAD et al., 2007; OIE, 2013).

Devido ao uso em potencial da *B. mallei* como agente de bioterrorismo, bem como seu impacto sobre a saúde pública em regiões endêmicas, tem ressurgido o interesse no desenvolvimento de testes diagnósticos eficazes. O diagnóstico do mormo pode ser realizado através de investigação sorológica, utilizando diversas metodologias, como o teste de fixação do complemento (FC), hemaglutinação indireta (HAI), contraímunoeletroforese (CIEF), imunoabsorção ligada à enzima (ELISA), western blot (WB), immunoblotting (IB), aglutinação, reação de aglutinação com antígeno corado por rosa bengala (RB) e outras técnicas ou modificações das técnicas conhecidas (NAUREEN et al., 2007; SPRAGUE et al., 2009; ELSCHNER et al., 2011). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Através da Instrução Normativa N°24 da Secretaria de Defesa Agropecuária (BRASIL, 2004), determina que o diagnóstico sorológico do mormo deverá ser realizado pela prova de fixação do complemento (FC), ou outra prova aprovada previamente pelo Departamento de Defesa Animal (DDA).

1.1 ETIOLOGIA

Foi descrita inicialmente por Aristóteles e Hipócrates nos séculos III e IV (BLANCOU, 1994) e em 1882, através do isolamento do patógeno oriundo de amostras de fígado e baço contaminados com a *B. mallei* (SCHADEWALDT, 1975). Desde a sua descoberta, o patógeno tem sido classificado como: *Bacillus mallei* (LANGENEGGER et al., 1960) *Loefferella mallei* e *Pfeifferella mallei* (HENNING, 1956), *Malleomyces mallei* (MERCHANT & PACKER, 1967), *Actinobacillus mallei*, *Corynebacterium mallei*,

Mycobacterium mallei e *Pseudomonas mallei*. Com base nas características nutricionais e bioquímicas foi classificada no gênero *Pseudomonas* (REDFEARN et al., 1966) e, posteriormente, foi reagrupada no gênero *Burkholderia*, mantida a espécie. O atual gênero *Burkholderia* foi um resultado de análises que verificaram homologia DNA-DNA, lipídeos e composição de ácidos graxos celulares e suas características fenotípicas, bem como o gene 16S (YABUUCHI et al., 1992). Ainda, neste gênero e fazendo parte de um subgrupo de patógenos *per se*, inclui-se a *Burkholderia pseudomallei*, o agente causador da Melioidose.

A *Burkholderia mallei*, é um cocobacilo aeróbio gram-negativo, não móvel, não esporulada cocobacilo aeróbio (LOEFFLER, 1886; YABUUCHI et al., 1992), com as extremidades arredondadas, 2,5nm de comprimento e 0,3-0,8nm de largura (AL-ANI et al., 1997; OIE, 2013) é um microrganismo intracelular obrigatório de mamíferos (KHAN, 2011). A microscopia eletrônica mostrou-se que *B. mallei* possui um núcleo, partículas citoplasmáticas e três camadas do componente de membrana da unidade exterior da parede da célula. O envelope da célula consiste de um número de diferentes camadas estruturais (AL-ANI et al., 1993). Possui uma cápsula de lipopolissacarídeo, sendo esta estrutura responsável pela sua virulência (POPOV et al., 1995, 2000; FRITZ et al., 2000; DESHAZER et al., 2001). Esta cápsula é constituída por hidratos de carbono neutros e auxilia na proteção a fatores ambientais desfavoráveis, sendo visualizada apenas na microscopia eletrônica (OIE, 2013).

A bactéria é isolada a partir de amostras de sangue e secreções de animais infectados (NIERMAN, 2004). Em esfregaços de lesões novas as bactérias são bastante numerosas em relação aos esfregaços de lesões mais antigas. Podem variar de aparência dependendo da idade da cultura e do tipo do meio utilizado para seu isolamento (OIE, 2013). Em culturas antigas, formam ramificações na superfície de culturas de caldo (NEUBAUER, et al., 2005).

A *B. mallei* cresce em meios que contenham sangue ou glicerol sendo suas colônias de aspecto mucóide e brilhante, apresentando oxidase e catalase positiva e redução de nitrato (HIRSH & ZEE, 2003), sensível a ação da luz solar, calor e desinfetantes comuns e dificilmente sobrevive em ambientes contaminados por mais de seis semanas (RADOSTITS, 2002).

O enriquecimento em glicerol aumenta o crescimento da *B. mallei* podendo ser seletivamente diferenciada por sua capacidade de fermentar um subconjunto característico dos hidratos de carbono e sua morfologia de colônias (STELLE, 1980). Também pode ser cultivada em meios de cultura de rotina incluindo ágar sangue e MacConkey, apresentando colônias, após 48h a 37°C, de aspecto viscoso e cremoso. Na presença de nitrogênio o organismo cresce como aeróbio e anaeróbio facultativo (PITT, 1998 & OIE, 2013).

As reações bioquímicas incluem redução de nitrato, utilização da arginina hidrolase, assimilação de glucose, N-acetil-glucosamina e gluconato, necessitando de incubação por 48 horas (OIE, 2013).

1.2 EPIDEMIOLOGIA

O mormo é uma doença enzoótica do oriente médio, norte da África e Ásia (ARUN et al., 1999). Foi erradicado com sucesso nos Estados Unidos, Inglaterra e Austrália, sendo endêmico em regiões da África, Ásia, Oriente Médio e América Central e do Sul (WHITLOCK, 2007). Com a utilização da quarentena em animais importados e o controle veterinário massivo, o mormo foi errado em várias regiões do oeste europeu em 1939, mas reemergência da doença foi reportada em 1998 (STALHEIM, 1994). A enfermidade é considerada potencialmente endêmica em países onde foi descrita recentemente como as regiões da Machuria, Etiópia, Turquia e Índia (WILSON et al., 1975). Nas últimas décadas, surtos de mormo foram relatados em inúmeros países como o Brasil, Turquia, Índia, Paquistão, Irã, Iraque, Barein, Mongólia, Emirados Árabes Unidos e Kuwait (NAUREEN et al., 2007; ELSCHNER et al., 2009; MOTA et al., 2000; BAZARGANI et al., 1996; HORNSTRA et al., 2009; SCHOLZ et al., 2006).

A. B. mallei é responsável por uma alta taxa de mortalidade em equídeos em diferentes regiões do mundo como Iraque, Egito, África, Índia, China e Rússia (AL-ANI et al. 1987, HENNING 1956, GANGULEE et al.1966; VERMA et al. 1994, ZHANG & LÚ 1983, SHUMILOV 1974).

Foi descrita pela primeira vez no Brasil em 1811, introduzida por animais infectados importados da Europa (PIMENTEL, 1938), sendo a última referência de foco no estado do Rio de Janeiro descrito por Langenegger et al., em 1960. No Brasil, foi considerada erradicada desde 1968, reemergindo no estado de Pernambuco e Alagoas em 1999 determinando sérios prejuízos econômicos aos criadores e comprometendo a atividade canavieira que se utiliza desses animais como forma de tração (MOTA et al. 2000).

Desde que foi descrita há 2000 anos, não houve epidemias documentadas da enfermidade em humanos. Os casos esporádicos têm sido documentados principalmente em veterinários, cuidadores de cavalos e funcionários de matadouros. (FRITZ et al., 2000). Contudo achados de autópsia de nódulos associados ao mormo em um grande número de pessoas em contato com cavalos, sugerem que a prevalência de formas inaparente da doença pode ser maior (HOWE et al., 1971). Esta tese é apoiada por estudos de infecções de mormo em laboratoristas (REDFEARN, 1975, PARKER, 1990). A *Burkholderia mallei* oferece um

grande potencial de contaminação quando utilizada sob forma de aerossol, podendo ser utilizada como um agente de arma biológica.

Devido à endemia da doença em cavalos na Europa no século XX, relataram-se casos de mormo em humanos que ocorreram na Rússia durante a 1ª Guerra Mundial (BRUNERD, 1973), sendo descrita como crônica por um médico veterinário britânico que contraiu a doença na Índia (GAIGER, 1916 & 1913), sendo o caso mais recente relatado em 2000 pela contaminação de laboratorista (SRINIVASAN, 2001).

A principal fonte de infecção é através do consumo de alimentos e água contaminados com secreções oriundas de descarga nasal de animais infectados (WHITLOCK, 2007). A mais importante via de excreção da *B. mallei* são as secreções nasais oriundas de lesões pulmonares crônicas que se rompem nos brônquios infectando as vias aéreas superiores (RADOSTITIS, 2002). A *B. mallei* primariamente infecta cavalos, burros e mulas, entretanto humanos são considerados hospedeiros acidentais (WAAG e DESHAZER, 2004). Contudo a maioria dos mamíferos apresenta certo grau de susceptibilidade, sendo a infecção relatada em caprinos, ovinos, camelídeos, felinos, caninos e vários carnívoros de zoológico, depois de alimentados com carne de cavalos infectados (MAIER, 1981).

1.3 TRANSMISSÃO

O mormo é transmitido diretamente pela invasão bacteriana da via nasal, oral e membranas mucosas das conjuntivas e pela invasão de soluções de continuidade do tecido cutâneo (BRIDGET et al., 2007). A *B. mallei* é carregada por meio das secreções contaminadas, a partir das lesões pulmonares, constituindo-se deste modo, as vias aéreas a principal via de eliminação da *B. mallei* (RADOSTITS et al, 2002). As secreções nasais e exsudatos de pele de animais com mormo contêm um número considerável de bactérias ativas que podem facilmente contaminar ferramentas utilizadas no manejo dos animais (GREGORY & WAAG, 2007). O envolvimento dos pulmões e do trato respiratório superior é comum, sendo manifestada por uma pneumonia ou pleurite regional ou difusa e um exsudato nasal, onde é carregada a bactéria (WAAG & DESHAZER, 2004).

Animais cronicamente infectados e portadores assintomáticos são a principal fonte de transmissão, sendo a porta de entrada do agente a via digestiva, podendo ocorrer pela via respiratória, genital e cutânea (HIPOLITO, 1963 & RADOSTITS, 2002). Utensílios, alimentos e água contaminados são de grande importância na cadeia de transmissão do mormo por veicular o agente (HUTYRA & MAREK, 1926). A capacidade de sobrevivência do bacilo do mormo indicou que as fontes de água podem permanecer contaminadas por

longo período, tornando-se um dos principais veículos de contaminação (GANGULEE, 1966).

A infecção cutânea ocorre através do uso de fômites e arreios utilizados durante a montaria e manejo em contato com as soluções de continuidade da pele dos animais (RADOSTITS, 2002 & LANGENEGGER et al.,1960). A infecção por inalação é rara (LANGENEGGER,1960; RADOSTITS, 2002 & KRISHNA, 1992). O risco de transmissão é maior enquanto permanecer as condições de insalubridade e aglomeração dos eqüídeos nas áreas onde ocorra a doença, onde as secreções são transmitidas diretamente através do contato com animais sadios ou indiretamente através de utensílios usados no manejo (AL-ANI 1987; JERABEK et al., 1994 & NAGAL, 1995).

O mormo é transmitido aos humanos através de contato com material contaminado e animais doentes por secreções oriundas do trato respiratório e infecções cutâneas (OIE, 2013), ocorrendo mortalidade dentro de três semanas se não iniciado tratamento (NEUBAUER et al., 1997), sendo este efetuado com múltiplas terapias com antibióticos de ação sistêmica (KHAN et al., 2001 E SRINIVASAN et al., 2001). As manifestações clínicas da doença incluem febre, pneumonia associada com necrose da árvore brônquica e aparecimento de lesões pustulosas e o desenvolvimento de abscessos (BALDER et al., 2010).

1.4 PATOGÊNESE

A *B. mallei* geralmente penetra no organismo por meio das mucosas do trato digestivo, por soluções de continuidade na pele ou por mucosas dos olhos e nariz. Ao penetrar no organismo, produz lesões na porta de entrada, especialmente na faringe e septos nasais, a mucosa geralmente apresenta congestão e lesão primária granulomatosa ou formações nodulares que podem ulcerar, apresentando exsudato muco purulento com estrias de sangue (MOTA et al, 2000; HIRSH & ZEE, 2003; SHARRER, 1995). Nestes locais, causam intenso processo inflamatório, sendo fagocitadas por macrófagos, caindo na corrente linfática e atingindo os linfonodos, provocando inflamação. São então drenadas até o ducto torácico, caem na circulação, provocando nos pulmões pneumonia. Deste modo, ocorre bacteremia cíclica (MANDELL et al., 1995). A entrada do agente costuma ser pela parede intestinal, há septicemia (forma aguda) e bacteremia (forma crônica) (MOTA, 2008). Lesões são formadas nos pulmões e em outros órgãos como fígado e baço. No septo nasal ocorre lesões de origem hematogena ou secundária a um foco pulmonar (PRITCHARD et al., 1995; SHARRER, 1995; HIRSH & ZEE, 2003). Há presença de nódulos firmes que são formados a partir da

infiltração de neutrófilos, hemácias e fibrina, formando uma área necrótica formada por leucócitos infiltrados no tecido de granulação (HIRSH E ZEE, 2003).

A investigação da patologia clínica é acompanhada pela redução da taxa de hemoglobina sérica, baixa contagem de eritrócitos e hematócrito, moderada leucocitose e neutrofilia (RADOSTITS, 2002).

O aspecto chave da patogênese da *B. mallei* e *B. pseudomallei* é a sua capacidade de invadir e se multiplicar dentro de uma variedade de células eucariotas, onde as bactérias são protegidas da resposta imune humoral do hospedeiro e da ação de antibióticos (BALDER et al., 2010). Uma vez internalizada nas células, a bactérias produz vacúolos e adentram no citoplasma onde se multiplicam, atingindo células vizinhas através de ligações da sua membrana promovendo pontes que interligam uma célula a outra. O mecanismo intracelular é crucial para a virulência e têm sido o foco de pesquisas para compreensão da patogênese e mecanismos terapêuticos (WIERSINGA et al., 2006; GALYOV et al., 2010; WHITLOCK et al., 2007; RIBOT et al, 2006).

1.5 SINTOMAS

O Mormo se desenvolve com dois cursos clínicos: um agudo, que acomete os asininos e muares, causando morte dentro de um prazo de quatro a sete dias, e outro, crônico, acometendo, sobretudo, os eqüinos (CORRÊA & CORRÊA, 1992).

Na forma aguda, a infecção resulta em febre alta com emagrecimento (Figura A) e ulceração do septo nasal acompanhando a descarga muco-purulenta (Figura B) que pode evoluir para descarga hemorrágica. Os sinais clínicos mais comumente observados são o corrimento nasal, febre, aparecimento de lesões cutâneas que posteriormente evoluem para úlceras que se disseminam pela mucosa nasal e nódulos na pele e nas extremidades dos membros e abdômen (MOTA, et al., 1999). Alterações patológicas limitadas ao intestino podem estar associadas à via linfática, devido à infecção pulmonar e das vias respiratórias (SCHLATER, 1992). Tosse e febre alta refletem a broncopneumonia que caracteriza a forma aguda, onde as lesões pulmonares são mais discretas com presença de nódulos granulomatosos com centro caseoso e neutrófilos degenerados (ZUBAIDY & AL-ANI, 1978).

Na forma crônica, observa-se pneumonia com tosse, epistaxe e dispnéia. As lesões no septo nasal, que se iniciam com nódulos e evoluem para úlceras, que após a cicatrização iniciarão cicatrizes em forma de estrelas (MOTA et al., 1999) (Figura C). Os animais apresentam descarga nasal purulenta, podendo conter estrias de sangue, congestão, erosões e

úlceras no septo nasal (MOTA et al., 2000) (Figura D). Animais cronicamente infectados apresentam uma grande variedade de sinais clínicos que dependem da via de infecção, incluindo secreção nasal que evolui de mucosa a purulenta, lesões pulmonares e nódulos envolvendo o fígado e baço (WITHLOCK et al., 2007). Nódulos de consistência firme a flácida na pele que drenam uma secreção purulenta amarelada (Figura E) são encontrados com frequência nos doentes (PRITCHARD et al., 1995, SHARRER, 1995, MOTA et al. 1999).

Clinicamente o mormo afeta o sistema respiratório e linfático, causando mortalidade e morbidade elevadas (MOTA et al., 2000), podendo assumir três formas distintas: nasal, pulmonar e cutânea, a depender da localização da lesão primária (HUNTING et al., 1987; FERNANDEZ & WHITE, 2010; WITTING et al, 2006). Os animais podem apresentar uma ou as três formas da doença simultaneamente (JUBB, 1993). Pode-se resumir que é primariamente uma doença da pele, vasos linfáticos e trato respiratório dos eqüídeos (RAF, 1984; JULINI, 1990). O aspecto mais comum da infecção em animais é o aparecimento e descarga nasal de cor amarelada, nódulos nasais e cutâneos e aumento dos gânglios linfáticos (MOTA et al., 2010). A bactéria geralmente penetra no organismo através de feridas cutâneas, olhos, boca e nariz, ocasionando o aparecimento inicial de febre, mal estar, indícios de sinais de pneumonia, pústulas e abscessos (MANDELL et al., 1995).

A forma nasal é caracterizada pelo aparecimento de necrose dos nódulos e posteriormente ulcerações na mucosa unilateral ou bilateral e frequentemente na laringe e traquéia. As úlceras possuem centro acinzentado com bordas grossas e irregulares. A forma cutânea inicia-se com aparecimento superficial de pequenos nódulos que drenam um líquido oleoso, alguns autores consideram que a forma nasal e cutânea é secundária a forma pulmonar (PAN AMERICAN ORGANIZATION HEALTH, 2001).

A forma pulmonar pode permanecer inaparente por longos períodos, quando há o aparecimento dos sinais clínicos, estes consistem em hipertermia, tosse, depressão, e perda de peso. Em estágios mais avançados há dispneia com a presença de estertores pulmonares. Lesões pulmonares usualmente são oriundas de focos de pneumonia com aspecto branco acinzentado, bordas avermelhadas, centro caseoso ou calcificado circundado por tecido fibroso (PAN AMERICAN ORGANIZATION HEALTH, 2001). A forma pulmonar é a manifestação clínica mais importante em equinos com mormo, sendo caracterizada pela formação de nódulos encapsulados e firmes ao longo do tecido pulmonar (ZUBAIDY E AL-ANI, 1978).

São observados no sistema linfático, grandes nódulos de consistência firme que drenam uma secreção purulenta de cor amarelada e edemas ventrais e prepuciais (JUBB, 1993; MOTA et al., 2000; AL-ANI et al., 1998; BAZARGANI et al., 1996; KRISHNA et al., 1992). Em estudo de 2007, Mota observou ao exame clínico em mulas, hipertermia, descarga nasal, dispnéia, extertores pulmonares, caquexia, diminuição do apetite e nódulos linfáticos em forma de rosário na região cervical. Em alguns animais há o aparecimento de pneumonia podendo ocorrer uma grande variedade de outras síndromes como abscessos prostáticos, encefalomielite paralítica e formação de abscessos intra-abdominal (BERGER et al., 2001, CURRIE et al., 1975, VORACHIT, 2000). A infecção pela *B. mallei*, também causa anemia grave devido à depressão da atividade eritropoiética na medula óssea (AL-KAWAWI et al., 1977).

Em humanos o mormo se apresenta com aumento dos gânglios linfáticos, nódulos no trato respiratório que ulceram emagrecimento, perda da capacidade respiratória e inúmeros abscessos subcutâneos (WAAG & DESHAZER, 2004; NEUBAUER et al., 1997). Aparecimento de pneumonia, broncopneumonia com ou sem bacteremia. Abscessos pulmonares, efusão pleural, e empiema podem ocorrer. Na fase aguda há descarga nasal e lesões granulomatosas no pulmão na fase crônica, havendo ulcerações na mucosa nasal e faringe (PAN AMERICAN ORGANIZATION HEALTH, 2001). A forma crônica é associada a múltiplos abscessos subcutâneos e intramusculares, linfadenopatia e linfangite e a ocorrência de infecções secundárias (GILAD et al., 2007)

Na lesão cutânea é possível verificar celulite com vesiculação, ulceração, linfangite e linfadenopatia (PAN AMERICAN ORGANIZATION HEALTH, 2001).

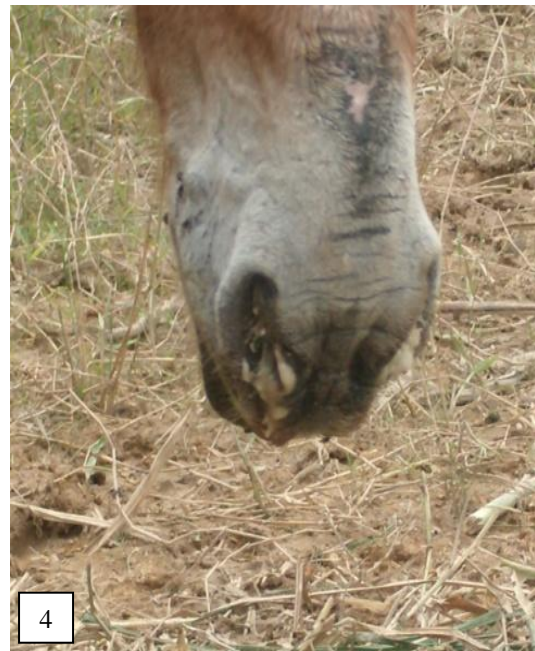
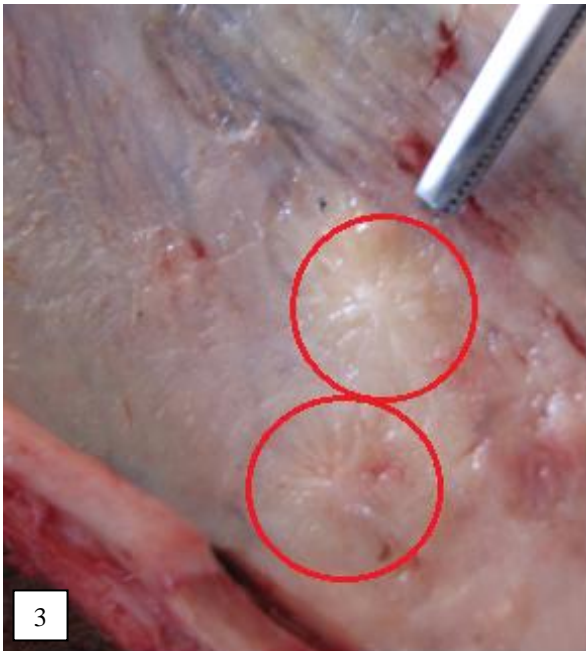


Figura 1 – Animal apresentando emagrecimento progressivo.

Figura 2 – Lesões ulcerativas no septo nasal.

Figura 3 – Cicatriz em forma estrelar na mucosa do septo nasal.

Figura 4 – Descarga nasal muco purulenta.

Figura 5 - Nódulo cutâneo que drena secreção purulenta amarelada.

Fonte: Arquivo Pessoal

1.6 DIAGNÓSTICO

MOLLER & EICHHORN (1911) afirmaram que o diagnóstico precoce de mormo constitui um dos mais importantes e difíceis tarefas que enfrentam médicos e médicos veterinários no trabalho sanitário. Casos em que não há indicações positivas da doença, seria impossível estabelecer um diagnóstico pelo exame físico, e apenas através da ajuda de alguns testes diagnósticos poderia haver alguma esperança de determinar a presença ou ausência da doença.

Ainda hoje, a afirmativa de MOLLER & EICHHORN (1911) é verdadeira, pois cavalos infectados, sem sinal clínico, juntamente com ausência de indicativos epidemiológicos representam um dos principais fatores para propagação da doença.

O teste ouro para a detecção do mormo é o isolamento e identificação da *B. mallei* em amostras clínicas (BLUE et al, 1998). O diagnóstico do mormo ainda depende de provas sorológicas, que consiste no teste da fixação do complemento (FC) e aglutinação ou para identificação de uma reação de hipersensibilidade tardia baseada na aplicação da Maleína (NEUBAUER et al., 2005 E OIE 2013). A OIE, 2013 também prescreve métodos alternativos de ensaios, porém a sensibilidade, especificidade e precisão do teste ainda não foram validados (KATZ et al., 1999; NAUREEN et al., 2007), como Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR), PCR-RFLP, ELISA, Immunoblotting e teste Rosa Bengala. Um ensaio imunoblotting foi desenvolvido para o diagnóstico do mormo, mas uma validação foi dificultada devido à falta de um painel de controle de soros positivos (KATZ et al., 1999). Recentemente, o desenvolvimento de uma imuno transferência utilizando antígeno da membrana de lipopolissacarídeo de *B. mallei* foi reiniciado com o objetivo de obter um teste mais sensível que a FC a fim de testar soros falsos positivos pela técnica em áreas endêmicas (ELSCHNER et al., 2011).

Os métodos para identificação rápida e específica da *Burkholderia spp.* são importantes para o reconhecimento antecipado do Mormo, em pacientes com sintomas clínicos sugestivos de diferentes enfermidades (JANSE et al., 2013). A membrana de lipopolissacarídeo é conhecida por desempenhar um papel chave nas interações de bactérias com o sistema imune do hospedeiro. Entretanto, porções de oligopolissacarídeos, são considerados os componentes mais imunodominantes das moléculas de bactérias que possuem LPS (REEVES et al., 1995). Recentemente, as regiões SNPs (single-nucleotide polymorphism) demonstraram ser importantes marcadores para a identificação de agentes de bioterrorismo (EASTERDAY et al., 1997). Isto é devido ao fato de que essas

regiões são consideradas marcadores estáveis sendo menos propensos a mutação do que os outros marcadores (Pearson, 2004), portanto são poderosos identificadores filogenéticos para a tipagem molecular de bactérias. Utilizando uma TaqMan criada a partir das regiões SNP e sinônimo a ela, Uren et al (2005), conseguiram identificar 37 cepas da *B. mallei* e diferenciá-las da *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* e *B. cepacea*.

O diagnóstico bacteriológico e clínico do mormo em equinos é dificultado devido ao estágio recente ou inaparente da doença. Em 90% dos casos é existente uma infecção subclínica ou em forma latente (NEUBAUER et al., 1997). O gênero *Burkholderia* contém mais de 20 espécies válidas das quais 3 são patógenos significativos (*B. mallei*, *B. pseudomallei* e *B. cepacea*). Os métodos para isolar e identifica-las podem incluir culturas de base, complexo antígeno-anticorpo e técnicas moleculares, sendo para o isolamento a *B. mallei* exigindo crescimento em meios especializados (INGLIS, 1998). Devido ao baixo número de bactérias no tecido infectado, nos abscessos e em pus excretado, o cultivo em meios líquidos ou sólidos é frequentemente negativo, além de demandar tempo para um resultado conclusivo. Se o material é originário de animais com doença sem sinais clínicos ou em casos crônicos o isolamento bacteriológico fica ainda mais difícil (ARUN et al., 1999; BONGERT, 1927; MILER et al., 1948). O processamento deve ser realizado em laboratórios que possuem nível de biossegurança 3. O nível de biossegurança 3 é aplicado para laboratórios clínicos, de diagnóstico, de ensino e pesquisa ou de produção onde o trabalho com microrganismos possa causar doenças sérias ou potencialmente fatais como resultado de exposição (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001), o que não está disponível na maioria dos laboratórios.

Quando a prevalência da doença é baixa, apenas testes com 99,9% de especificidade fornecem uma resposta confiável na identificação do agente. Testes sorológicos, incluindo a fixação do complemento (FC), hemaglutinação indireta (IHAT), teste de imunoeletroforese (CIET), teste de anticorpos fluorescentes indiretos (IFAT) e teste imunoenzimático (ELISA) também foram investigados. Esses testes são baseados em preparações bacterianas brutas ou com a utilização de anticorpos monoclonais. Em estudo recente avaliando o desempenho de quatro técnicas sorológicas, mostrou que nenhuma melhora significativa da sensibilidade alcançada quando utilizado antígenos preparados com células inteiras brutas (NAURREN, 2007). Ensaio antígeno-específico como a imunofluorescência direta (WUTHIEKANUN et al., 2002) e aglutinação em látex (WUTHIEKANUN et al., 2005), provaram ser rápidos e sensíveis, mas ainda não estão disponíveis comercialmente. PCR em tempo real (THIBAUT, 2004 & NOVAK, 2006), PCR multiplex (LEE et al., 2005), sequenciamento (GEE, 2003) e

amplificação do DNA isotérmica (CHANTRATITA, 2008) mostraram-se como alternativas rápidas de diagnóstico, porém poucos foram validados para robustez e especificidade. Ensaios de diagnóstico que detectam regiões específicas de marcadores filogenéticos da *B. mallei* e sua diferenciação da *B. pseudomallei* também foram investigados a fim de permitir ensaios altamente específicos (BOWERS, 2010).

Dentro dos programas de erradicação do Mormo, a FC foi o método de diagnóstico eleito (CRAVITZ, 1950). A FC é o único teste sorológico oficialmente reconhecido para trânsito internacional de eqüídeos, com uma sensibilidade de 97% comparado ao isolamento bacteriano (CRAVITZ, 1950), mas com uma possibilidade de ocorrerem resultados inespecíficos, como falso-negativos e falso-positivos (MANNINGER, 1945 e TURNBULL, 2002). A reação cruzada com *B. pseudomallei*, agente causador da melioidose, também pode ser observada, devido à semelhança dos microrganismos (USAHA, 2011).

No Brasil, o teste da fixação do complemento, deve ser realizado em laboratório oficial ou credenciado pelo MAPA (BRASIL, 2004). O diagnóstico pela fixação do complemento baseia-se na detecção de anticorpos específicos contra a *B. mallei* que são detectados já com uma semana após a infecção, situando-se o intervalo temporal de 4 a 12 semanas, após a infecção, o melhor período para a realização do exame (SCHLATER, 1992), sendo relatada em 90 a 95% de precisão na identificação de soros positivos e permanecendo assim na exacerbação do processo crônico (STEELE, 1980).

A FC é a ferramenta sorológica favorecida em programas de erradicação, graças a sua capacidade de detectar animais clinicamente inaparentes, embora reações falsas negativas sejam observadas em animais idosos e éguas prenhas e reações falsas positivas ocorrem em 1% dos animais testados quando a utilização de antígeno com células inteiras (CRAVITZ, 1950). Em termos de baixa prevalência da doença, mais ênfase deve ser observada para o desenvolvimento de testes com mais especificidade, a fim de evitar resultados falso-positivos (SPRAGUE, 2009).

O teste da maleína também é outro método clássico para diagnóstico de Mormo, o primeiro método de diagnóstico, cujas reações positivas são demonstradas após aplicação de derivado protéico da bactéria (VAN ZIJDERVELD & BONGERS, 2000). O teste de maleína é o método mais antigo usado para o diagnóstico de mormo, mas as suas limitações em termos de sensibilidade, particularmente em casos clínicos e avançados da doença, têm sido bem reconhecidas. Existe, no entanto, um número considerável de animais positivos em que a maleína falha, não proferindo uma reação típica, enquanto, uma reação pode se seguir a inoculação na ausência de mormo MOHLLER & EICHHORN (1911). Reações cruzadas

também foram notificadas após maleinização entre *B. mallei* e *Streptococcus equi*, resultando em reações falso-positivas (HUTYRA, 1949; MINETT, 1959; AL-ANI et al., 1993; NEUBAUER et al., 2005).

A maleinização, em princípio, é semelhante ao teste da tuberculina. A maleína é uma glicoproteína extraída a partir de cultura de *B. mallei* e usada como um antígeno intradermopalpebral, subcutâneo ou em testes oftálmicos (TIMONEY, 1988). O teste é realizado através da inoculação da PPD (Proteína Pura Purificada) na dose de 0,1 ml por via intradérmica na pálpebra inferior de um dos olhos do animal (BRASIL, 2004). Uma resposta positiva é caracterizada por inchaço ocular, fotossensibilidade, lacrimejamento e inflamação supurativa, dentro de 48 horas após a inoculação (BRASIL, 2004). Uma desvantagem do teste da maleína é que ele pode causar soro-conversão transiente em animais saudáveis não infectados (HAGEBOCK et al., 1993).

O teste da maleína é usado comumente em diagnóstico do Mormo, entretanto este teste é considerado suficientemente específico, mas pouco sensível para detecção da *B. mallei* em programadas de erradicação e importação, sendo sua sensibilidade para diagnósticos clínicos limitados (NAUREEN et al., 2007 e JANA, 1982). Devido a essa baixa sensibilidade outros testes sorológicos devem ser empregados como a imunofluorescência indireta (MA, 1986), ELISA (VERMA, 1990), fixação do complemento (VERMA, 1990), micro ELISA teste (AL-ANI, 1993) e western blotting (ELSCHNER et al., 2011).

1.7 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE

O Ministério da Agricultura preconiza através da Instrução Normativa Nº 24, de 05 de abril de 2004 (BRASIL, 2004), critérios para Controle e Erradicação do Mormo. Para efeitos de diagnóstico é utilizado teste da fixação do complemento realizado em laboratório oficial ou credenciado, tendo seu resultado negativo válido por 180 dias para propriedades monitoradas. Os animais poderão ser submetidos ao teste da maleína quando for reagente a fixação do complemento e não apresentarem sintomatologia do mormo e quando não reagentes à fixação do complemento e apresentarem sinais clínicos, ficando a critério da Secretária de Defesa Animal. Animais que forem reagentes ao teste oficial e apresentarem sinais clínicos da doença ou procedentes de áreas reincidentes, serão imediatamente sacrificados e a propriedade submetida a regime de saneamento, sendo liberada após a realização de dois testes consecutivos de todo o plantel, com intervalos de 45 a 90 dias, com resultado negativos na FC (BRASIL, 2004).

Estudos recentes demonstram a susceptibilidade da *B. mallei* a antibióticos testados “in vitro”, porém não havendo sucesso na erradicação do agente do organismo dos animais quando desafiado em laboratório (JUDY et al., 2009 & MANZENIUK et al., 1994). Saquib et al., (2002), demonstrou que o tratamento a longo prazo com combinações de diversos antibióticos, parece confirmar o desaparecimento do agente do organismo. Porém, mais pesquisas são necessárias para verificar a efetividade do tratamento frente a diferentes cepas de *B. mallei* de regiões endêmicas. Para determinar o sucesso do tratamento é necessário avaliar todas as técnicas para determinar a presença do agente como a patologia clínica, resultados de necropsia, microbiologia e estado de animais sentinelas, além da investigação dos animais em testes preconizados para trânsito animal.

O uso da doxiciclina também demonstrou boa atividade in vitro conta a *B. mallei* (KENNY, 1999), além da ceftazidima, ciprofloxacina e piperacilina (HEINE, 2001).

Não havendo nenhuma vacina eficaz contra a infecção pela *B. mallei*, a prevenção do MORMO consiste no teste de todos os equídeos do plantel e a eliminação dos animais reagentes a fixação do complemento. Deve ser procedida a incineração ou enterro dos cadáveres no próprio local, à desinfecção das instalações e fômites, sob supervisão do serviço veterinário oficial, interdição e sorologia da propriedade com foco comprovado da doença (BRASIL, 2004).

1.8 OBJETIVO GERAL

Diagnosticar a *Burkholderia mallei* nos plantéis de equídeos através da Reação em Cadeia de Polimerase.

1.9 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Padronizar a técnica de PCR em Tempo Real para o diagnóstico do Mormo em equídeos;

Observar a eficiência da PCR no diagnóstico do Mormo em relação às provas sorológicas de Fixação do Complemento (FC), ELISA indireto e Western Blotting (WB).

Realizar um levantamento epidemiológico da situação do mormo em plantéis de equídeos utilizando as técnicas de PCR em tempo real, Western Blotting, Fixação do complemento e ELISA indireto.

1.10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P. N., SZYFRES, B. Zoonoses. Bacterioses listed G (Glanders). Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Pan American Health Organization. 398p. 2003.
- AL-ANI, F. K. Glanders in horses: a review. *Sud J Vet Sci Anim Husb* 32:1–10. 1993.
- AL-ANI, F. K., A. K. AL-DELAMI, A. H. ALI. Glanders in horses: clinical and epidemiological studies in Iraq. *Pakistan Vet. J.* 79, 126-129. 1987.
- AL-ANI, F.K. ET AL. Gladers in horse: clinical biochemical and serological studies in Iraq. *VeterinarskiArhiv*, v. 68, n.5, p.155-162. 1998.
- AL-KAWAWI, A. A., F. K. AL-ANI, L. S. AL-BASSAM, A. Y. YOUKOB. Hematological changes in Arabian horses infected with glanders. *Vet. Rec.* 101, 427. 1977.
- ARUN, S.; NEUBAUER, H.; GUREL, A.; AYYILDIZ, G.; JUSCU, B.; YESILDERE, T.; MEYER, H.; HERMANS, W. Equine glanders in Turkey. *Vet rec* 144:255-258. 1999.
- BALDER, R., LIPSKI, S., LAZARUS, J. J., GROSE, W., WOOTEN, R. M., HOGAN, R. J., WOODS, D. E., LAFONTAINE, E. R. Identification of Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei adhesins for human respiratory epithelial cells. Balder et al. *BMC Microbiology*, 10:250. 2010.
- BAZARGANI, T.T. et al. The outbreak of glanders in some racehorses in three states of Iran. *Journal of equine Veterinary Science*, v. 16, n. 6, p,232-236,1996.
- BERGER, S. A. Meliodosis. In: Marrie TJ, ed. *Community-Acquired Pneumonia*. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers, 811–19. 2001.
- BLANCOU, J. Les anciennes methods de surveillance et de controle de la morve. *Bulletin SocietéVétérinairePrat. De France*, v. 78,n.01,p.35-54. 1994.
- BLUE, S. R., POMBO, D. J., WOODS, M. L. Glanders and melioidosis. In: Palmer, S. R., L. Soulsby, and D. I. H. Simpson (eds), *Zoonoses: biology, clinical practice and public health control*, 2nd edn, pp. 105–113. Oxford University Press, Oxford, UK. 1998:

BONGERT, J. R. In *Bakteriologischediagnostik der tierseuchen*. Ed. R Choltz, *Bakteriologischediagnostik der tierseuchen*. (7th Ed.) Berlin: Verlagsbuchhandlung, PP 406-455. 1927.

BOWERS, J. R., ENGELTHALER, D. M., GINTHER, J. L., PEARSON, T., PEACOCK, S. J. *BurkDiff: A Real-Time PCR Allelic Discrimination Assay for Burkholderia Pseudomallei and B. mallei*. PLoS ONE. 2010.

BRASIL, 2001. *Biossegurança em laboratórios biomédicos e de microbiologia*. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 2001.

BRASIL. 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24, de 05 de abril de 2004, da Secretaria de Defesa Agropecuária, publicada no Diário Oficial da União em 12 de abril de 2004, seção 1, página 7. 2004.

BRIDGET, C. G., WAAG, D. M. Glanders. Cap. 6. *Medical Aspects of Biological Warfare*. 2007.

BRUNERD, W., GILLESPIEJ, H. *Infectious Diseases of Domestic Animals with Special References to Etiology, Diagnosis, and Biologic Therapy*, ed. Hagan; 6th ed., pp. 249-257, Cornell University Press, Ithaca. 1973.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). *Laboratory-acquired human glanders*. MMWR. *Morbidity and mortality weekly report*, v.49, p.532-535, 2000.

CHANTRATITA, N., MEUMANN, E., THANWISAI, A., LIMMATHUROTSAKUL, D., WUTHIEKANUN, V. *Loop-mediated isothermal amplification method targeting the TTS1 gene cluster for detection of Burkholderia pseudomallei and diagnosis of melioidosis*. *J ClinMicrobiol* 46: 568–573. 2008.

CORREA, C. N. M.; CORREA, W. M. *Enfermidades Infecciosas dos Animais Domésticos*, 2ª ed., Rio de Janeiro; Médica e Científica, 843 p. 1992.

CRAVITZ, L., MILLER, W. R. *Immunological studies with Malleomyces mallei and Malleomyces pseudomallei. II. Agglutination and complement fixation tests in man and laboratory animals*. *J Infect Dis*. 86:52-62. 1950.

- CURRIE, B. J., JACUPS, S. P. Intensity of rainfall and severity of melioidosis, Australia. *Emerg Infect Dis.* 9: 1538–42. 2003.
- DESHAZER, D., WAAG, D. M., FRITZ, D. L., WOODS, D.E. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. *MicrobPathog.*,30: 253–269. 2001.
- EASTERDAY, W. R., VAN ERT, M. N., SIMONSON, T. S., WAGNER, D. M., KENEFIC, L. J., ALLENDER, C. J., KEIM, P. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.* 43:1995–1997. 2005.
- ELSCHNER, M. C., KLAUS, C. U., LIEBLER-TENORIO, E., SCHMOOCK, G., WOHLSEIN, P., TINSCHMANN, O., LANGE, E., KADEN, V., KLOPFLEISCH, R., MELZER, F., RASSBACH, A. & NEUBAUER, H. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. *Equine Veterinary Education* 21, 147-150. 2009.
- ELSCHNER, M. et al. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Veterinary Research*, v.7, p.4. 2011.
- FERNANDEZ, P. J., WHITE, W. R.. Glanders. In: *Atlas of Transboundary Animal Diseases*. OIE, World Organisation for Animal Health (ed.), Paris, France, pp. 100-102. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/GLANDERS__FINAL.pdf (29.12.13). 2010.
- FRITZ, D.L.; VOGEL, P.; BROWN, D.R.; DESHAZER, D.; WAAG, D.M. Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*). *Vet Pathol*, 37: 626–636. 2000.
- GAIGER, S.H. Glanders in man. *J Comp Pathol* 26:233-236. 1913.
- GAIGERS, .H. Glanders in man. *J Comp Pathol* 29:26-46. 1916.
- GALYOV, E. E., BRETT, P. J., DESHAZER, D. Molecular Insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 64:495-517. 2010.
- GANGULEE, P. C., G. P. SEN, G. L. SHARMA. Serological diagnosis of glanders by haemagglutination test. *Indian Vet. J.* 43, 386-391. 1966.

GEE, J. E., SACCHI, C. T., GLASS, M. B., De B. K, WEYANT, R. S., Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *J ClinMicrobiol* 41: 4647–4654. 2003.

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

GREGORY, B. C., WAAG, D. M. Glanders. *Medical Aspects of Biological Warfare*, pp. 121–146. Department of Defence, Office of Surgeon General, US Army, Borden Institute, Walter Reed Amry Medical Center, Washington, DC, USA. 2007.

HAGEBOCK, J. M., SCHLATER, L. K., FRERICHS, W. M., OLSON, D. P. Serologic responses to the mallein test for glanders in solipeds. *J Vet Diagn Invest* 5:97-99 .1993.

HEINE, H. S., ENGLAND, M. J., WAAG, D. M., BYRNE, W. R. In vitro antibiotic susceptibilities of *Burkholderia mallei* (causative agent of glanders) determined by broth micro dilution and E-test. *Antimicrobiol Agents Chemother.* 45:2119–2121. 2001.

HENNING, M. W. *Animal Diseases in South Africa*, 3rd ed., Central News Agency. Pretoria, South Africa. pp. 159-181. 1956.

HIPOLITO, O. F. M.G. *Doenças Infecto contagiosas dos animais domésticos*. 3ª ed. Edições melhoramento: Belo Horizonte. 232p. 1963.

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

HORNSTRA, H., PEARSON, T., GEORGIA, S., LIGUORI, A., DALE, J., PRICE, E., O'NEILL, M., DESHAZER, D., MUHAMMAD, G., SAQIB, M., NAUREEN, A. & KEIM, P. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. *Emerging Infectious Diseases* 15, 2036-2039. 2009.

HOWE, C.; MILLER, W.R.: Human glanders; report of 6 cases. *Ann Intern Med* 26:93-115.1947.

HUNTING, W. *Glanders : How it Arises and Spreads ; How to Prevent it ; and How to Stamp it Out*. London: H. and W. Brown. 1887.

- HUTYRA, F., J. MAREK. Special Pathology and Therapeutics of Domestic Animals, 1^a ed. 1926.
- INGLIS, T. J., CHIANG, D., LEE, G. S., CHOR-KIANG, L. Potential misidentification of *Burkholderia pseudomallei* by API 20NE. *Pathology*.30:62–4. 1998.
- JANA, A. M., GUPTA, A. K., PANDYA, G., VERMA, R. D., RAO, K. M. Rapid diagnosis of glanders in equines by counter-immuno-electrophoresis. *Indian Vet. J.* 59:5–9. 1982.
- JANSE, I., HAMIDJAJA, R. A., HENDRIKS, A. C. A., ROTTERDAM, B. J.V. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *BMC Infectious Diseases*. 13:86. 2013.
- JERABEK, J. Less known animal disease: glanders. *Veterinarstvi* 44, 398-400. 1994.
- JUBB, K.V.F; KENNEDY, P. C.; PLAMER, N. Pathology of domestic animals. 4. Ed. New York: Academic Press. V.2.cap.6,p.552-555. 1993.
- JUDY, B. M., WHITLOCK, G. C., TORRES, A. G, ESTES, D. M. Comparison of the in vitro and in vivo susceptibilities of *Burkholderia mallei* to Ceftazidime and Levofloxacin. *BMC Microbiol.* 9:88. 2009
- JULINI, M. The Turin Vandelic glanders commission of 1847-1848. *Obiettivi. Documenti.Vet.* 11, 44-45. 1990.
- KATZ, J. B., CHIEVES, L. P., HENNAGER, S. G., NICHOLSON, J. M., FISHER, T. A., BYERS, P. E. Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine, and glanders using an arrayed immunoblotting method. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 11:292–294. 1999.
- KENNY, D. J., RUSSELL, P., ROGERS, D., ELEY, S. M, TITBALL, R. W. In vitro susceptibilities of *Burkholderia mallei* in comparison to those of other pathogenic *Burkholderia* spp. *Antimicrobiol Agents Chemother.* 43:2773–2775. 1999.
- KHAN A.S. & ASHFORD D.A. Ready or not – Preparedness for bioterrorism. *New England Journal of Medicine.*, 345, 287–289. 2001.

KHAN, I.; WIELER, L.H.; MELZER, F. et al. Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. *Veterinary Record*. London, v.169, n.19, p.495-499, 2011.

KRISHNA, L.; GUPTA, V.K.; MASAND, M.R. pathomorfological study of possible glanders in solipedes in himachal preadesh. *Indian Veterinary Journal*, n. 69, p.211-214,1992.

LANGENEGGER, J., DOBEREINER, J., LIMA, A. C. Foco de Mormo (Malleus) na região de Campos, estado do Rio de Janeiro 1960. *Arq. Inst. Biol. Anim* v.3,p.91-108,1960.

LEE, M. A., WANG, D., YAP, E. H. Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 43: 413–417. 2005.

LOEFFLER, F. Die Ätiologie der Rotzkrankheit. *Arb Kaiserl Gesundh Amt Berlin* 1: 141-198, 1886.

MA, C.L.; FAN, S.M.; WANG, X.; JOANG, L.; FANG, S.Q. Diagnosis of glanders in horses by the indirect fluorescent antibody (IFA) technique. *Chinese Journal Veterinary. Science Technology*. 9:3-5. 1986.

MANDELL, G.L., BENNET, J.E. DOLIN, R. *Pseudomonas Species (Including Melioidosis and Glanders)*. 1995.

MANNINGER, R., ROTZKRANKHEIT, In *Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere*. Volume 1. 9 edition. Edited by: Marek J, Manninger R, Mocsy J. Jena: Gustav Fischer;591-627. 1945.

MANZENIUK, I. N., DOROKHIN, V. V., SVETOCH, E. A. The efficacy of antibacterial preparations against *Pseudomonas mallei* in in-vitro and in-vivo experiments. *Antibiot Khimioter* 1994, 39:26–30.1926.

MARTIN, S. W. The evaluation of tests. *Can J Comp Med*. 41: 19-25. 1977.

MERCHANT, I. A., R. A. PACKER. *Veterinary Bacteriology and Virology*, 7th ed., IowaState University Press. Ames, Iowa. pp. 364-369. 1967.

MILER, W.R., PANNEELL, L., CRAVITZ, L., TANNER, W.A., ROSENBURY, T. Studies on certain biological characteristics of *Malleomyces mallei* and *M. pseudomallei* I. Morphology, cultivation, viability, and isolation from contaminated specimens. *Journal of Bacteriology* 55: 115-159, 1948.

MINETT, F.C. *Infectious diseases of animals, diseases due to bacteria*. vol. I, pp. 296–318. Butterworths Scientific Publications, London, United Kingdom. 1959.

MOHLLER, J.R., EICHHORN, A. *The diagnostic of glanders*. Washington, 1911.

MOTA, R. A., SANTOS, F. L., CASTRO, F. J. C. & CAVALCANTE, M. I.. Mortalidade de eqüídeos criados na Zona da Mata dos Estados de Pernambuco e Alagoas: aspectos clínicos, epidemiológicos e anátomo histopatológicos. *Anais IV Congresso Pernambucano de Medicina Veterinária*, Recife, 1:251-252. 1999.

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

MOTA, R. A., SILVA, L. B. G., CUNHA, A. P., SOBRINHO, E. S. N., PINHEIRO, J. W. Alterações clínicas em cobaias (*Caviaporcellus*) inoculados experimentalmente com isolados de campo de *Burkholderia mallei* de eqüídeos com mormo. *Medicina Veterinária*, Recife, v.2, n.1, p.1-9. 2008.

MOTA, R. A., OLIVEIRA, A. A. F., JUNIOR, J. W. P., SILVA, L. B. G., BRITO, M. F., RABELO, S. S. A. GLANDERS IN DONKEYS (*EQUUS ASINUS*) IN THE STATE OF PERNAMBUCO, BRAZIL: A CASE REPORT. *Brazilian Journal of Microbiology*. 41: 146-149. 2010.

NAGAL, K. B., V. B. JOSHI, R. C. KATOCH, M. SHARMA, R. K. KUMAR. Glanders outbreak in Himachal Pradesh. *Centaur*. 12, 30-35. 1995.

NAUREEN, A., SAQIB, M., MUHAMMAD, G., HUSSAIN, M. H., ASI, M. N. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 19:362–367. 2007.

NEUBAUER, H., et al. Human glanders. *Revue Internationale Des Services De Sante Des Forces Armees* 70:258– 265. 1997.

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

NEUBAUER, H., SPRAGUE, L. D., ZACHARIA, R., TOMASO, H., AI DAHOUK, S., WERNERY, R., WERNERY, U., SCHOLZ, H. C. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *Journal of Veterinary Medicine B Infection Disease and Veterinary Public Health*, 52:201-205. 2005.

NIERMAN, W. C., DESHAZER, D., KIM, H. S. et al. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proceedings National Academy of Science of the USA* 101: 14246–14251. 2004.

NOVAK, R. T., GLASS, M. B., GEE, J. E., GAL, D., MAYO, M. J. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 85–90. et al. 2006.

OIE – World Animal Health Organization. Disponível em: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines&disease_type=Terrestrial&disease_id=63. 2013. Acesso em 24/01/2014.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. ZONOSSES AND COMUNICABLE DISEASES COMMON TO MAN AND ANIMALS. Bacterioses e Micoses. Volume I. Third Edition, 2001.

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

PITT, T. L. *Pseudomonas*, *Burkholderia* and related Genera. In: Collier, L., A. Balows, and M. Sussman (eds), *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections – Systemic Bacteriology*, 9th edn. pp. 1109–1126. Edward Arnold, Div. Hodder and Stoughton, London. 1998.

POPOV, S. F.; KURILOV, V.; IAKOVLEV A.T. *Pseudomonas pseudomallei* and *Pseudomonas mallei* – capsule-forming bacteria. *Zh Mikrobiology, Epidemiology and Immunobiologic* 5: 32–36, 1995.

POPOV, S.F.; TIKHONOV, N.G.; PIVEN, N.N.; KURILOV, V.; DEMENT'EV, I.P. The role of capsule formation in *Burkholderia mallei* for its persistence in vivo. *Zh Mikrobiology, Epidemiology and Immunobiologic.* 3: 73–75, 2000.

PRITCHARD, D.G. Glanders. *Equine Vet. Educ.* 7(1):29-32. 1995.

RADOSTITS, O. M., GAY, C. C., BLOOD, D. C. Hinchchcliff, K.W. Capítulo 20. Doenças bacterianas V. In. Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C. Hinchchcliff, K.W. *Clínica Veterinária.* 9° ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 869-871. 2002.

RAF, P. O. Professor Rehnquist and glanders in Stockholm in 1780. *Svensk Veterinary.* 36, 299-304. 1984.

REDFEARN, M. S., PALLERONI, N. J., STANIER, R. Y. A comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei*. *Journal of General Microbiology;* 43:293-313. 1966.

REEVES, P. Role of O-antigen variation in the immune response. *Trends Microbiology.* 3:381–386.1995.

RIBOT, W. J., ULRICH, R. L. The animal pathogen-like type III secretion system is required for the intracellular survival of *Burkholderia mallei* within J774.2 macrophages. *Infections Immunities.* 74(7):4349-4353. 2006.

SCHADEWALDT, H. Discovery of glanders bacillus. *Dtsch Med Wochenschr* 100: 2292–2295. 1975.

SCHLATER, L. K. Glanders, in *Current Therapy in Equine Medicine.* 1992.

SCHOLZ, H. C., JOSEPH, M., TOMASO, H., AL DAHOUK, S., WITTE, A., KINNE, J., HAGEN, R. M., WERNERY, R., WERNERY, U. & NEUBAUER, H. Detection of the re-emerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based PCR assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 54, 241-247. 2006

SHARRER, G.T. The great glanders epizootic. *Agric. Hist.* 69:79-97. 1995.

SHUMILOV, K. G. Comparative study of methods of diagnosis of glanders in horses in Mongolia. *Vet* 42:274–278. 1974.

SPRAGUE, L. D. et al. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. *BMC Veterinary Research*, v.5, n.32, p1-6, 2009.

SRINIVASAN, A., KRAUS, C.N., DESHAZER, D., BECKER, P.M., DICK, J.D., SPACEK, L., BARTLETT, J.G., BYRNE, W.R., THOMAS, D.L. Glanders in a military research microbiologist. *New England Journal of Medicine.*, 345, 256–258. 2001.

STEELE, J. H. Bacterial, rickettsial and mycotic diseases. In: Steele, J.H. (ed.), *CRC Handbook Series in Zoonoses, Section A*, pp. 339–351. CRC Press, Boca Raton, USA. 1980.

THIBAUT, F. M., VALADE, E., VIDAL, D. R. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*, and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *Journal of Clinical Microbiology* 42: 5871–5874. 2004.

TURNBULL, A., WERNERY, U., WERNERY, R., ANANDH, J. P., KINNE, J. Survey of six infectious diseases of feral donkeys in United Arab Emirates. *Equine Veterinary Journal*, 14:33-38. 2002.

UNITED STATES ANIMAL HEALTH ASSOCIATION (USAHA). ONE HUNDRED AND FIFTEENTH ANNUAL MEETING, 2011.

U'REN, J. M., VAN ERT, M. N., SCHUPP, J. M., EASTERDAY, W. R., SIMONSON, T. S., OKINAKA, R. T., PEARSON, T., KEIM, P. Use of a Real-Time PCR TaqMan Assay for Rapid Identification and Differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 5771–5774. 2005.

VAN ZIJDERVELD, F.G., BONGERS, J. Glanders. In manual of Standards for diagnostics tests and vaccines. (4th Ed). Paris: Office International des Epizooties, PP 576-581, 2000.

VERMA, R. D. A micro-complement fixation test for identification of *Pseudomonas mallei*. *Journal of the Remount and Veterinary Corps* 29:1–5. : 1990.

VORACHIT, M., LAM, K., JAYANETRA, P., COSTERTON, J. W. Resistance of *Pseudomonas pseudomallei* growing as a biofilm on silastic discs to ceftazidime and cotrimoxazole. *Antimicrobiol Agents Chemother* 1993; 37. 2000.

WAAG, D.M.; DESHAZER, D. Glanders: new insight into na old disease. Biological weapons defense: infectious diseases and counter bioterrorism. Totowa, NJ: Humana Press Inc, PP 209-237, 2004.

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

WIERSINGA, W. J., VAN DER POLL, T., WHITE, N. J., DAY, N. P., PEACOCK, S. J. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. National Review of Microbiology, 4(4):272-282. 2006.

WITTING, M.B., WOHLSEIN, P., HAGEN, R.M., AL DAHOUK, S., TOMASO, H., SCHOLZ, H.C., NIKOLAOU, K., WERNERY, R., WERNERY, U., KINNE, J., ELSCHNER, M. and NEUBAUER, H. Glanders - a comprehensive review. Deut Tierarztl Woch113:323–330. 2006

WUTHIEKANUN, V., ANUNTAGOOL, N., WHITE, N. J., SIRISINHA, S. Short report: A rapid method for the differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. The American Journal of Tropical and Medicine Hygiene 66: 759–761. 2002.

WUTHIEKANUN, V., DESAKORN, V., WONGSUVAN, G., AMORNCHAI, P., CHENG A. C. Rapid immunofluorescence microscopy for diagnosis of melioidosis. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 12: 555–556. 2005.

YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; ZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. Nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. Microbiology and Immunology 36: 1251-1275, 1992.

ZUBAIDY, A. J., F. K. AL-ANI. Pathology of glanders in horses in Iraq. Veterinary an Pathology. 15, 566-568. 1978.

Artigo 1

**Uso do PCR real time (qPCR) para o diagnóstico da *Burkholderia mallei* utilizando
amostras clínicas**

(Artigo formatado para o periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)

ARTIGO 1

Uso do PCR real time (qPCR) para o diagnóstico da *Burkholderia mallei* utilizando amostras clínicas**Using Real Time PCR (qPCR) for the diagnosis of *Burkholderia mallei* in clinical samples**

SILVA C. M. S. L¹, SANTANA V. L. A. S.², SOUZA M. M. A.², SANTOS F. L.³, SILVA J. C.⁴, SILVA D. M. F. S.¹,
VASCONCELOS C. M. V.¹, FALCAO M. V. D.¹, GOMES FILHO M. A.³

1 Universidade Federal Rural de Pernambuco, estudante

2 Laboratório Nacional Agropecuário – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento

3 Universidade Federal Rural de Pernambuco

4 Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco – ADAGRO/PE

* Corresponding author

E-mail address:

*SILVA, C. M. S. L – cecilia.leao@hotmail.com

SANTANA, V. L. A – vania.lucia@agricultura.gov.br

SOUZA, M. M. A. – marcilia.souza@agricultura.gov.br

SANTOS, F. L – fernandoleandro@hotmail.com

SILVA, J. C – cecilia.leao@hotmail.com

SILVA, D. M. F – diogomfs@hotmail.com

VASCONCELOS, C. M – crislianedmv@gmail.com

FALCAO, M. V – mdfalcao@gmail.com

GOMES FILHO, M. A. – manoeladriao@yahoo.com

RESUMO

O Mormo é em uma doença altamente contagiosa dos solípedes causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, um cocobacilo aeróbio gram-negativo e não móvel. A *B. mallei* infecta todos os mamíferos, sendo cavalos, burros e mulas, mais sensíveis a infecção. Os humanos são considerados hospedeiros acidentais. O Teste de Fixação do Complemento é o exame preconizado no Programa de Controle e Erradicação do Mormo pelo MAPA e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para trânsito internacional. Objetivou-se com este estudo avaliar a Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR) como nova ferramenta para o diagnóstico do mormo. Foram testadas 456 amostras séricas de equídeos de diversas regiões do território nacional e 40 amostras sanguíneas de animais verdadeiros positivos ao teste ouro de isolamento bacteriano. A qPCR dos soros apresentou 76 (16,7%) reagentes e uma sensibilidade de 24,7% e especificidade de 89% quando comparado ao western blotting padrão ouro utilizado. Os resultados mostram que a utilização da qPCR pode ser utilizada como técnica para identificação rápida e precisa da *Burkholderia mallei*.

Palavras-chave: qPCR, *B. mallei*, zoonose, biologia molecular, soro, sangue.

ABSTRACT

The Glanders is in a highly contagious disease caused by *Burkholderia mallei* solipeds, a Gram - negative bacterium, not mobile and aerobic coccobacillus. *B. mallei* primarily infect horses, donkeys and mules, though humans are considered incidental hosts. The Complement Fixation Test (FC) is the recommended examination Program Control and Eradication of Glanders by MAP and the World Organization for Animal Health (OIE, 2013) for international transit. The objective of this study was to evaluate the Polymerase Chain Reaction in real-time (qPCR) as a new tool for the diagnosis of glanders. 456 serum samples from different regions of the national territory and 40 blood samples positive for gold test bacterial isolation real animals were tested. Serological qPCR showed 76 (16.7%) positivity and a sensitivity of 24.7% and a specificity of 89 % when compared to the gold standard western blotting used. The results show that the use of the qPCR may be used as a technique for rapid and accurate identification of *Burkholderia mallei*.

Keywords: qPCR, *B. mallei*, glanders, zoonosis, molecular biological, serum, blood.

Introdução

O Mormo é uma doença contagiosa dos solípedes causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, uma bactéria Gram-negativa, não móvel e cocobacilo aeróbio (LOEFFLER, 1886; YABUUCHI et al., 1992), composta de uma cápsula de polissacarídeo, sendo esta estrutura responsável pela virulência (POPOV et al., 1995, 2000; FRITZ et al., 1999, 2000; DESHAZER et al., 2001). A *B. mallei* primariamente infecta cavalos, burros e mulas, entretanto humanos são considerados hospedeiros acidentais (WAAG e DESHAZER, 2004). Ocasionalmente, pode infectar felídeos através da ingestão de carne de cavalo contaminada (GALATI, 1973 & HART, 1916).

Animais infectados assintomáticos são a principal via de transmissão do Mormo, sendo a bactéria carregada por meio das secreções contaminadas oriundas das lesões pulmonares, constituindo-se deste modo, as vias aéreas a principal via de eliminação da *B. mallei* (RADOSTITS, 2002). A via oral é a principal via de infecção, podendo também ocorrer à contaminação por via respiratória, cutânea ou genital (RADOSTITS, 2002).

A *Burkholderia mallei* está relacionada na lista de doenças da Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) como doença de importância para saúde pública, e devido ao seu alto potencial de infecção é referenciada como agente de bioterrorismo (DERBYSHIRE 2002; ULRICH et al., 2006; WITLOCK et al., 2007; LOSADA et al., 2010). O diagnóstico precoce de mormo constitui um dos mais importantes e difíceis tarefas que enfrentam médicos e médicos veterinários no trabalho sanitário MOLLER & EICHHORN (1911) e ainda depende de provas sorológicas. De acordo com a OIE (2013) o diagnóstico compreende o teste sorológico, alérgico e o isolamento bacteriano. O isolamento bacteriano ainda é o teste “gold” para diagnóstico de qualquer agente microbiano. Para o teste da Maleína observa-se uma resposta celular evidenciada por reação inflamatória intradermo-palpebral. O teste de fixação do complemento apresenta boa especificidade e sensibilidade de acordo com a OIE (2013). Baseia-se na detecção de anticorpos específicos contra a *B. mallei* que podem ser detectados uma semana após a infecção. O teste detecta animais sem sintomatologia e aqueles infectados na fase crônica (SCHLATER, 1992). No Brasil, aplica-se o teste de CFT para trânsito animal, e em alguns casos, aplicação da maleína é necessária nos casos duvidosos de mormo. Animais positivos através da CFT e/ou maleína são sacrificados e destruídos de acordo com normas internacionais de saúde animal (Brasil, 2004). Este método de diagnóstico está preconizado no Brasil pela Instrução Normativa Nº 24, de 05 de abril de 2004 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento por apresentar alta sensibilidade e especificidade (OIE, 2013). No Brasil, deve ser realizado em laboratório oficial ou credenciado pelo MAPA (BRASIL, 2004).

Este trabalho tem como objetivo diagnosticar a *Burkholderia mallei* em rebanhos de equídeos através da técnica de PCR em Tempo Real.

Materiais e Métodos

Origem das amostras

Foram utilizadas 456 amostras séricas de animais provenientes de propriedades dos Estados de Pernambuco, Ceará, Distrito Federal, São Paulo, Espírito Santo e Paraná com histórico de mormo e/ou submetidas à vigilância através da abertura de foco pelas Secretárias de Defesa Animal (SDA) de cada estado e 40 amostras sanguíneas de animais positivos na Fixação do Complemento e submetidos ao sacrifício, necropsia e isolamento, sendo classificadas como controle de animais verdadeiros positivos. As amostras sorológicas foram obtidas pela venopunção asséptica da jugular utilizando tubos tipo vacutainer para retração dos coágulos. As amostras sanguíneas foram obtidas através da venopunção da jugular em tubos tipo vacutainer com anticoagulante. Posteriormente o soro obtido foi transferido para tubos tipo eppendorf, acondicionados em caixas isotérmicas e enviados para o Laboratório para realização da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) a fim de diagnosticar o Mormo.

As amostras foram separadas por grupo e tipo de teste realizado: animais verdadeiros positivos, animais verdadeiros negativos, animais maleína positivos, animais maleína negativos e suspeitos. As amostras verdadeiras positivas foram assim declaradas de acordo com o resultado do teste padrão-ouro de isolamento bacteriano (OIE, 2013). As amostras declaradas como verdadeiras negativas, foram oriundas de áreas livres da enfermidade e com todos os testes de diagnósticos negativos para detecção da *Burkholderia mallei*.

Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR) e Reação em Cadeia de Polimerase convencional (PCR)

A extração do DNA do sangue e do soro foi realizada através de kits conforme o fabricante (Kit High Pure PCR Template, ROCHE®).

Para o qPCR foi utilizado o sistema LightCycler Real-Time, ROCHE® sonda BmaflIP probe 6FAM-CAGGTCAACGAGCTTCACGCGGATC-BHQ1. Foram utilizados os primers BmaflIP-F CCCATTGGCCCTATCGAAG, BmaflIP-R GCCCGACGAGCACCTGATT com os seguintes ciclos de 95°C 10 minutos, 95°C por 2 segundo, 63°C por 20 segundo e 40°C por 30 segundos totalizando 50 ciclos para o qPCR e os ciclos de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos seguido de 50 ciclos de 95°C por 25 segundos e 73°C por 1 minuto, finalizando com ciclo de 4°C por infinito para o PCR convencional. O PCR convencional foi utilizado com o intuito de confirmação das amostras verdadeiras positivas., apresentando após a PCR amplicon com 300 pares de base em gel de agarose a 1,5%. As reações utilizaram como controle positivo amostras de referência do laboratório de referência para o mormo da OIE (Friedrich-Loeffler Institute) na Alemanha.

Western Blotting (WB)

O Immunoblotting foi utilizado como teste padrão confirmatório. A preparação do antígeno, procedimento do ensaio e interpretação dos resultados, foi descrito conforme recente publicação (ELSCHNER et al., 2011).

Análise Estatística

Foram obtidas distribuições absolutas e percentuais com a obtenção da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting e o grau de concordância entre os outros diagnósticos. Como técnicas de estatística inferencial foram obtidas intervalo de confiança para as prevalências de positividade em cada exame e intervalo de confiança para o grau de concordância (Kappa). Os intervalos foram obtidos com 95,0% de confiabilidade. Os dados foram digitados através na planilha Excel e o “software” utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 2.1.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Processo 23082021578/2013 – Licença Nº 007/2014).

Resultados e Discussão

Das 456 amostras de soro testadas, 76 (16,7%) apresentou positividade ao qPCR em amostras sorológicas e 16 (40%) em amostras de sangue. A Tabela 1 apresenta os resultados da qPCR para amostras sanguíneas e sorológicas e western blotting.

Tabela 1: Resultados da reação em cadeia de polimerase (qPCR) em amostras sanguíneas e sorológicas e western blotting.

Variável	n	%
Total de exames realizados no soro	456	100,0
• qPCR – Soro		
Positivo	76	16,7
Negativo	380	83,3
• Western Blotting		
Positivo	166	36,4
Negativo	290	63,6

Na tabela 2 são apresentados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia dos exames em relação ao Western Blotting. A qPCR para amostras séricas apresentou uma sensibilidade 21,7% e especificidade de 89% quando comparado ao

teste ouro utilizado no estudo (WB). O valor preditivo positivo foi de 52,9%, valor preditivo negativo foi de 66,5%. e acurácia ficou em 64,5%.

Tabela 2: Avaliação da Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) e acurácia dos exames em relação ao western blotting.

Teste	Western Blotting		
	Positivo	Negativo	Total
qPCR Soro			
Positivo	36	32	68
Negativo	131	257	388
Total	167	289	456

Sensibilidade: 21,7%; Especificidade: 89%; Valor Preditivo Positivo: 52,9%; Valor Preditivo Negativo: 66,5%; Acurácia: 64,5%.

Na tabela 3 são apresentados os valores de concordância da qPCR de soro em relação ao teste ouro Western Blotting. A concordância observada foi de 66,7% com kappa de 0,186 (concordância pobre)..

Tabela 3: Avaliação da concordância da qPCR em relação ao western blotting.

Exame	Coincidência observada		Kappa
	N	%	
• Western Blotting	304	66,7	0,186
BASE	456		

Nos últimos anos, várias metodologias de PCR para identificação da *Burkholderia mallei* têm sido desenvolvidos (ULRICH et al., 2006). A sua rápida identificação em amostras clínicas são essenciais para assegurar que as medidas sanitárias possam ser iniciadas antes de um surto. A diminuição do tempo de resposta, baixa concentração de DNA alvo necessário e especificidade têm levado os ensaios de Reação em Cadeia de Polimerase como melhor método para diferenciação e identificação de agentes em muitos laboratórios de saúde pública (PITT et al., 2000).

Na qPCR, os produtos amplificados são monitorados diretamente em cada ciclo de amplificação e pode ser medida quando a reação ainda está em fase exponencial e nenhum componente da reação está limitado (Lopez, 2005), sendo a técnica largamente utilizada para análise de expressão genética, identificação de microrganismos e de detecção e quantificação de organismos geneticamente modificados (HANNA, CONNOR e WANG, 2005).

No presente estudo, as amostras sorológicas utilizadas na qPCR, mostraram um número menor de positivos ao passo que quando testadas em testes sorológicos mostram-se mais reagentes. Isto pode estar relacionado com a circulação da bactéria no organismo ou a presença de inibidores da qPCR na reação, visto que a qPCR identifica a sequência genética (DNA alvo) do microrganismo que deve estar circulante no soro, enquanto na sorologia são detectados anticorpos específicos do sistema imunológico em resposta a invasão pela bactéria, fato esse comprovado pela baixa concordância entre qPCR e western blotting neste estudo, como o constatado por diversos autores. A identificação da *B. mallei* em qPCR pode ser mais precisa quando utilizada na detecção em órgãos alvo de sua proliferação, como fígado, baço, pulmão e nódulos. Fato esse comprovado por Ulrich et al (2006), identificando a *B. mallei*, através do uso de sondas específicas através do qPCR, e a diferenciou da *B. pseudomallei* e de outros patógenos semelhantes geneticamente testados em amostras clínicas de pulmão, baço e fígado em intervalos que variavam de uma a 48 (quarenta e oito) horas pós-infecção experimental em cavalos, eliminando a necessidade de pesquisa bacteriana em meios de cultura.

Após sucessivas passagens em cobaias, *B. mallei* pode ter modificação em sua estrutura lipolissacarídica, podendo ser uma problemática para sua identificação, conforme o estudo de Srinivasan

et al (2001), que identificou diferenças no genoma da *B. mallei* a partir de comparações de dois isolados sequenciados, obtidos através da infecção acidental de um laboratorista, seguido por infecção experimental de um rato e um cavalo e, concluíram que os isolados humanos possuíam um conjunto distinto de variações na sequência genética. Entretanto, em estudo de Ulrich et al. (2006), a sequência de DNA que codifica a região N-terminal, responsável pela exposição à superfície de células bacterianas, mostrou-se conservadas em grandes quantidade de isolados de *B. mallei* por um período de 70 anos, acreditando-se que as divergências observadas por Srinivasan et al em 2001 possam ser oriundas do início da evolução de *B. pseudomallei* para *B. mallei*.

A reação cruzada neste estudo foi descartada, pois segundo Ulrich et al. (2006), a utilização do primer Flip, o qual contem o gene “flagelina”, é responsável pela diferenciação da *B. mallei* e *B. pseudomallei*. Este tipo de diferenciação corresponde a motilidade da bactéria em cultura bacteriana.

Os métodos para identificação rápida e específica da *Burkholderia spp.* são importantes para o reconhecimento antecipado do Mormo, em pacientes com sintomas clínicos sugestivos de diferentes enfermidades (JANSE, 2013). A patogenicidade de *B. pseudomallei* e *B. mallei* e seu uso potencial como agentes de guerra biológica ressaltam a importância da detecção e identificação rápida desses patógenos. O diagnóstico da *B. mallei* através da técnica de PCR é extremamente importante, pois identifica com precisão aqueles animais que são verdadeiramente positivos, enquanto que o diagnóstico sorológico pode apresentar resultados falso-positivos pela reação cruzada com outros microrganismos. Resultados falso-positivos são problemáticos para as autoridades veterinárias e causam prejuízos financeiros aos proprietários de animais devido a restrições comerciais que envolvem a importação e exportação de animais adquiridos. Resultados falso-negativos são particularmente críticos, pois podem promover a propagação da doença para a população equina saudável em áreas livres de mormo (KHAN et al., 2012).

Conclusões

Os ensaios de qPCR podem ser utilizados como uma nova metodologia para identificação rápida de patógenos de mamíferos, além da diminuição do tempo de resposta e um grande potencial para automação. Em contrapartida o elevado custo de equipamentos e reagentes pode ser um impedimento para realização da técnica em laboratórios de rotina. Em comparação ao PCR convencional, o PCR em tempo real identifica de forma mais rápida e precisa *B. mallei*, eliminando os riscos de contaminações. como os inibidores da reação da PCR, contaminação com outro material genético e contaminação dos reagentes no momento do preparo.

Agradecimentos

Ao Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco (LANAGRO-PE) e ao Projeto SAGRES-Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e CNPq pelo incentivo à pesquisa desenvolvida.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BRASIL. 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24, de 05 de abril de 2004, da Secretaria de Defesa Agropecuária, publicada no Diário Oficial da União em 12 de abril de 2004, seção 1, página 7
- CRAVITZ, L., MILLER, W.R. Immunologic studies with *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei* I: Serological relationships between *M. mallei* and *M. pseudomallei*. *Journal Infection Disease*, 86:46-51. 1950.
- DESHAZER, D.; WAAG, D.M.; FRITZ, D.L.; WOODS, D.E. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. *Microbiology and Pathology*, 30: 253–269. 2001.
- FRITZ, D. L., VOGEL, P., BROWN, D. R., DESHAZER, D. & WAAG, D. M. Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*). *Veterinary Pathology* 37, 626–636. 2000.
- FRITZ, D.L.; VOGEL, P.; BROWN, D.R.; DESHAZER, D.; WAAG, D.M. Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*). *Veterinary Pathology*, 37: 626–636. 2000.
- GALATI, P.; PUCCINIV; CONTENTOF: An outbreak of glanders in lions. *Histopathological findings. Acta Medica Veterinaria* 19:261-277, 1973.
- HANNA, S. E., CONNOR, C. J., WANG, H. H. Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications, and limitations. *Journal of Food Science*, 70(3), 49e53. 2005.
- HART, A.: Glanders in wild animals kept in zoological gardens. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 49:659-663, 1916.
- JANSE, I., HAMIDJAJA, R. A., HENDRIKS, A. C. A., ROTTERDAM, B. J.V. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *Janse et al. BMC Infectious Diseases*, 13:86. 2013.
- KHAN, I., ELSCHNER, M. C., MELZER, F., GWIDA, M., WIELER, L. H., ALI, R., SAQIB, M., NEUBAUER, H. Performance of complement fixation test and confirmatory immunoblot as two-cascade testing approach for serodiagnosis of glanders in an endemic region of South East Asia. 2012.
- LOEFFLER, F. Die Ätiologie der Rotzkrankheit. *Arb Kaiserl Gesundh Amt Berlin* 1: 141-198, 1886.
- LOPEZ-ANDREO, M., LUGO, L., GARRIDO-PERTIERRA, A., PRIETO, M. I., PUYET, A. Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 339(1), 73e82. 2005.
- MANNINGER, R., ROTZKRANKHEIT, In *Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere*. Volume 1. 9 edition. Edited by: Marek J, Manninger R, Mocsy J. Jena: Gustav Fischer; 1945:591-627.
- MOHLER, J.R., EICHORN, A. *The diagnostic of glanders*. Washington, 1911.
- NEUBAUER, H. SPRAGUE, L. D., ZACHRIA R. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *Journal of Veterinary Medicine B* 52:201–205. 2005.
- OIE – World Animal Health Organization. *Terrestrial Animal Health Code*. 2013. Chapter 12.10. Glanders. Disponível em <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>. Acesso em 19/12/2013.
- PITT, T.L., et al. Molecular phylogeny of *Burkholderia pseudomallei*. *Acta Trop* 74:181– 185. 2000.
- POPOV, S. F.; KURILOV, V.; IAKOVLEV A.T. *Pseudomonas pseudomallei* and *Pseudomonas mallei* – capsule-forming bacteria. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 5: 32–36, 1995.
- POPOV, S.F.; TIKHONOV, N.G.; PIVEN, N.N.; KURILOV, V.; DEMENT'EV, I.P.
- RADOSTITS, O.M.; GAY, C.C.; BLOOD, D.C. HINCHCLIFF, K.W. *Clínica Veterinária*. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1737p, 2002.
- SRINIVASAN, A., KRAUS, C. N., DESHAZER, D., BECKER, P. M., DICK, J. D., SPACEK, L., BARTLETT, J. G., BYRNE, W. R., THOMAS, D. L. Glanders in a military research microbiologist. *N Engl J Med* 345, 256–258. 2001.
- The role of capsule formation in *Burkholderia mallei* for its persistence in vivo. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol*. 3: 73–75, 2000.
- TURNBULL, A., WERNERY, U.; WERNERY, R., ANANDH, J.P., KINNE, J. U. Survey of six infectious diseases of feral donkeys in United Arab Emirates. *Eq Vet J* 2002, 14:33-38.
- ULRICH, M. P.; NORWOOD, D. A.; CHRISTENSEN, D. R. ULRICH, R. L. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. *Journal of Medical Microbiology*, 55, 551–559. 2006.
- WAAG, D.M.; DESHAZER, D. Glanders: new insight into an old disease. *Biological weapons defense: infectious diseases and counterbioterrorism*. Totowa, NJ: Humana Press Inc, PP 209-237, 2004.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; ZAKI, T.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. Nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. Nov. *Microbiology and Immunology* 36: 1251-1275, 1992.

Artigo 2

**Avaliação do ELISA indireto e Fixação do Complemento em comparação ao Western
Blotting para diagnóstico do Mormo**

(Artigo formatado para o periódico *Frontiers of Microbiology*)

ARTIGO 2

**Avaliação do ELISA indireto e Fixação do Complemento em
comparação ao Western Blotting para diagnóstico do Mormo****Assessment of Indirect ELISA and Complement Fixation
comparative to Western Blotting in the Glanders diagnostic**

Cecilia Maria de Souza Leão e Silva^{1*}, Vânia Lúcia de Assis Santana², Marcília Maria Alves de Souza², Roberto Soares Castro³, Ana Cláudia³, Fernando Leandro Santos³, Jorge Caetano da Silva⁴,
Diogo Manoel Farias da Silva¹, Manoel Adrião Gomes Filho³

1 Rural Federal University of Pernambuco, student

2 Brazilian National Laboratory for Agriculture, Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply

3 Rural Federal University of Pernambuco

4 Defense Agency and Agriculture Inspection of Pernambuco – State Government of Pernambuco -
Brazil

* Corresponding author

Cecilia Maria de Souza Leão e Silva

Rua Mário Bhering, 61/301

Recife – Pernambuco – Brasil

CEP: 52110-090.

SILVA, C. M. S. L – cecilia.leao@hotmail.com

E-mail address:

SANTANA, V. L. A – vania.lucia@agricultura.gov.br

SOUZA, M. M. A. – marcilia.souza@agricultura.gov.br

CASTRO, R. S. – robertosoares@gmail.com

CAMPOS, A. C. – anabutron@gmail.com

SANTOS, F. L – fernandoleandro@hotmail.com

SILVA, J. C – cecilia.leao@hotmail.com

SILVA, D. M. F – diogomfs@hotmail.com

GOMES FILHO, M. A. – manoeladriao@yahoo.com

ABSTRACT

Glanders is in a highly contagious disease caused by *Burkholderia mallei* solipeds, a Gram - negative bacterium, not motility and aerobic coccobacillus, consisting of a polysaccharide capsule, and this structure responsible for its virulence. *B. mallei* primarily infects horses, donkeys and mules, though humans are considered incidental hosts. The disease is notifiable, and the sacrifice of the positive horses is required by the which recognizes the complement fixation test for movement of animals. In the present study serology results of complement fixation and indirect ELISA compared to western blotting were evaluated. The objective of this study was to evaluate the response, versus testing of 456 serum samples equids from different regions of the country. The complement fixation showed 41 (9 %) of positive samples with antigen USDA while the CC pro antigen was positive in 67 (14.7 %) samples. The positive ELISAi detected in 66 (14.5%) whereas Western blotting showed 166 (36.4%) samples reagents. The statistical results showed that the ELISAi showed the highest sensitivity (35.5%) and specificity (97.6 %) when compared to western blotting. The results show the importance of preparation and use of antigens that are produced with local strains, resulting in higher sensitivity and specificity of the test.

Keywords: CFT, western blotting, ELISA, antibody, imunity.

RESUMO

O Mormo constitui-se em uma doença altamente contagiosa dos solípedes causada pela *Burkholderia mallei*, uma bactéria Gram-negativa, não móvel e cocobacilo aeróbio, composta de uma cápsula de polissacarídeo, sendo esta estrutura responsável pela sua virulência. A *B. mallei* primariamente infecta cavalos, burros e mulas, entretanto humanos são considerados hospedeiros acidentais. A doença é de notificação obrigatória, e o sacrifício dos equídeos positivos é exigido sendo preconizado pela OIE o teste da fixação do complemento para trânsito de animais. No presente estudo foram avaliados resultados da sorologia da Fixação do Complemento e ELISA indireto em comparação ao western blotting. Objetivou-se com este estudo avaliar a resposta sorológica, frente aos testes, de 456 amostras séricas de equídeos de diversas regiões do território nacional. A fixação do complemento apresentou 41 (9%) de amostras positivas com antígeno USDA enquanto o antígeno C.C pro apresentou positividade em 67(14,7%) das amostras. O ELISAI detectou positividade em 66 (14,5%) enquanto o western blotting apresentou 166 (36,4%) amostras reagentes. Os resultados estatísticos mostraram que o ELISAI apresentou a maior sensibilidade (35,5%) e especificidade (97,6%) quando comparado ao western blotting. Os resultados mostram a necessidade da preparação e utilização de antígenos que sejam produzidos com cepas locais, determinando maior sensibilidade e especificidade ao teste.

Palavras-chave: FC, western blotting, iELISA, mormo.

INTRODUÇÃO

O mormo é uma doença zoonótica altamente contagiosa e frequentemente fatal, conhecida desde a antiguidade, que acomete principalmente equídeos, podendo também infectar diversas outras espécies animais. É causada por um bacilo Gram negativo, aeróbio, não esporulado e imóvel, atualmente classificado como *Burkholderia mallei*, composta de uma cápsula de polissacarídeo, sendo esta estrutura responsável pela sua virulência (POPOV et al., 2000; FRITZ et al., 1999, 2000; DESHAZER et al., 2001), transmitida entre os solípedes, principalmente, pela água e alimentos contaminados. Em equídeos pode determinar quadros agudos, mais comuns em asininos e muares, ou crônicos, mais frequente em equínos, com formas cutânea, pulmonar, nasal ou mista, com presença de abscessos nodulares cutâneos, vasos linfáticos espessados e endurecidos (CDC, 2000; SRINIVASAN et al., 2001; ACHA & SYYFRES, 2003; WAGG & DESHAZER, 2004; GILAD et al., 2007; OIE, 2013).

O diagnóstico do mormo pode ser realizado através de investigação sorológica, utilizando diversas metodologias, como o teste de fixação do complemento (FC), hemaglutinação indireta (HAI), contraímunoeletroforese (CIEF), imunoabsorção ligada a enzima (ELISA), *western blot* (WB), *immunoblotting* (IB), aglutinação, reação de aglutinação com antígeno corado por rosa bengala (RB) e outras técnicas ou modificações das utilizadas (NAUREEN et al., 2007; SPRAGUE et al., 2009; ELSCHNER et al., 2011).

O Mormo está incluso na lista de doenças de notificação obrigatória da OIE e no Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Códigos Terrestres onde estão descritas medidas de controle e erradicação previstas no programa, dentre elas o teste da Fixação do Complemento dos animais que são destinados a trânsito, monitoramento da propriedade foco e sacrifício de animais reagentes a prova, destino dos animais que forem sacrificados e todas as medidas de desinfecção de materiais e instalações onde o animal esteve presente e esteve em contato.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar as reações sorológicas de equinos frente ao teste do ELISA-indireto e fixação do complemento em comparação ao Western Blotting.

MATERIAIS E MÉTODOS

Origem das amostras

Foram utilizadas 456 amostras séricas de animais provenientes de propriedades dos Estados de Pernambuco, Ceará, Distrito Federal, São Paulo, Espírito Santo e Paraná com histórico de mormo e/ou submetidas à vigilância através da abertura de foco pelas Secretárias de Defesa Animal (SDA) de cada estado e 40 amostras sanguíneas de animais positivos na Fixação do Complemento e submetidos ao sacrifício, necropsia e isolamento, sendo classificadas como controle de animais verdadeiros positivos, através do isolamento bacteriano das vísceras (Teste Ouro), conforme OIE (2013). As amostras sorológicas foram obtidas pela venopunção asséptica da jugular utilizando tubos tipo vacutainer para retração dos coágulos. As amostras sanguíneas foram obtidas através da venopunção da jugular em tubos tipo vacutainer com anticoagulante. Posteriormente o soro obtido foi transferido para tubos tipo eppendorf, acondicionados em caixas isotérmicas e enviados para o Laboratório para realização das técnicas sorológicas a fim de diagnosticar o Mormo.

As amostras foram separadas por grupo e tipo de teste realizado: animais verdadeiros positivos, animais verdadeiros negativos, animais maleína positivos, animais maleína negativos e suspeitos. As amostras verdadeiras positivas foram assim declaradas de acordo com o resultado do teste padrão-ouro de isolamento bacteriano (OIE, 2013). As amostras declaradas como verdadeiras negativas, foram oriundas de áreas livres da enfermidade e com todos os testes de diagnósticos negativos para detecção da *Burkholderia mallei*.

Para fins de análise estatística e de comparação com os testes sorológicos, foi utilizado como padrão ouro o Western Blotting.

Teste da Fixação do Complemento (FC)

O Teste da Fixação do Complemento foi executado de acordo com as normas da técnica descrita no capítulo 2.5.11 do “Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Code” (OIE, 2013), utilizando como antígenos o alemão C.C. pro (c. c. pro GmbH, Oberdorla, Germany) na diluição de 1:80 e o americano, produzido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) na diluição de 1:125. O C.C. pro é produzido com um “pool” de três cepas (Bogor, Zagreb e Mukteswar) de *B. mallei*, enquanto o USDA com uma única cepa (China de origem humana). O complemento de cobaio (Guinea-pig) foi titulado e utilizado em cinco unidades de complemento hemolítico 50% (CH₅₀). Suspensão de células sanguíneas vermelhas de carneiro a 2% foi utilizada na execução do teste como

indicador da reação. Soros de equinos foram diluídos 1:5 em solução salina diluente e inativados a 58°C, por 35 minutos com intuito de remover a atividade anticomplementar do soro que poderia resultar em testes falso-positivos. Soro, antígeno e complemento oriundo de cobaio, foram adicionados em placas de poliestireno (25uL cada), nas diluições de 1:5 a 1:320 e linha do soro anticomplementar, e incubados a 37°C por uma hora ou alternativamente incubados a 4°C por 18 horas, de acordo com o kit de diagnóstico alemão (C.C.pro) ou o americano (USDA). Após a 1ª fase de incubação, foi adicionada aos poços da placa que continham o soro, uma solução de hemácias sensibilizadas (sistema hemolítico) composta de solução diluente, hemácia de carneiro a 2% e hemolisina, um soro rico em anticorpos contra as hemácias de carneiro, onde sofreram nova incubação por 45 minutos divididas em dois intervalos de tempos, o primeiro de 20 minutos e o segundo de 25 minutos e após a última incubação levadas a refrigeração por no mínimo 2 horas, tempo este suficiente para identificação da resposta no teste. As amostras foram consideradas negativas quando apresentaram 100% de hemólise, positivas de 0 a 75% de hemólise em qualquer das diluições e inconclusiva quando apresentaram resquícios de sedimentação de hemácias nos poços de diluição (BRASIL, 2004).

Western Blotting (WB)

O Immunoblotting foi utilizado como teste padrão confirmatório. A preparação do antígeno, procedimento do ensaio e interpretação dos resultados, foram descritos por Elschner et al., (2011).

ELISA indireto

A análise sorológica do teste ELISA indireto, foi realizada conforme Teles et al., (2011). Os soros foram diluídos em solução salina tamponada com fostato (PBS) contendo leite em pó desnatado a 2% e 10nM de ácido etileno diamino tetracético (EDTA) na proporção 1:100 e distribuídos em placas de poliestireno de 96 poços sensibilizadas com antígeno derivado protéico da maleína (PPD-Maleína) de isolados locais na proporção de 1:400 e incubados em câmara úmida por 1 hora a 37°C. Em seguida a incubação, as placas foram lavadas com solução salina tamponada com fostato contendo Tween 20 (PBS-T) por três vezes e 100 µl do conjugado contendo proteína G-peroxidase, foi adicionado às placas e levados à incubação em câmara úmida por mais 1 hora a 37°C. Após a incubação sofreram nova lavagem por cinco vezes com PBS-T e em seguida foram adicionadas as placas 100µl solução tampão citrato-fostato a 0,1 M, contendo 0,1mg/ml de 3,3', 5,5'-

tetramethylbenzidine(TMB) e 0,02% de peróxido de hidrogênio, onde permaneceram por 15 minutos, até serem bloqueadas com 100 µl de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N para posterior leitura em leitor de microplaca com filtro ajustado para 450nm. Para o cálculo do ponto de corte, foi utilizado 60 amostras do controle de animais verdadeiros negativos, através do uso do teste t de Student com intervalo de confiança de 95 e 99%, estimado em 0,100nm.

Análise Estatística

Foram obtidas distribuições absolutas e percentuais com a obtenção da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting e o grau de concordância entre os outros diagnósticos. Como técnicas de estatística inferencial foram obtidas intervalo de confiança para as prevalências de positividade em cada exame e intervalo de confiança para o grau de concordância (Kappa). Os intervalos foram obtidos com 95,0% de confiabilidade. Os dados foram digitados através na planilha Excel e o “software” utilizado para a obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 2.1.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Processo 23082021578/2013 – Licença Nº 007/2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 456 amostras testadas, o teste que apresentou maior positividade foi o western blotting com 166 (36,4%), seguido pela fixação do complemento utilizando o antígeno C.C.pro com 67 (14,7%), ELISAI com 66 (14,5%) e por último a fixação do complemento utilizando o antígeno USDA com 41 amostras positivas (9%). A Tabela 1 apresenta os totais de positivos e negativos por teste diagnóstico.

Tabela 1: Resultados dos testes de Fixação do Complemento, western blotting, e ELISA indireto com frequências relativa e absoluta.

Variável	n	%
Total	456	100%
•FC USDA		
Positivo	41	9,0
Negativo	415	91,0
•FC CC PRO		
Positivo	67	14,7
Negativo	399	85,3
•Western Blotting		
Positivo	166	36,4
Negativo	290	63,6
•ELISA		
Positivo	66	14,5
Negativo	390	85,5

A Tabela 2, 3 e 4 apresenta os resultados da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia de cada um dos exames em comparação ao teste de western blotting.

A maior sensibilidade observada foi com o teste ELISAI (35,5%) variando de 14,5% na fixação do complemento utilizando o antígeno USDA a 28,3% na fixação do complemento utilizando o antígeno C.C. pro. O teste mais específico foi o ELISAI com 97,6%. O menor valor da especificidade encontrado ocorreu no C.C. pro com (93,1%) ficando o USDA com 94,1%. O valor preditivo positivo foi 58,5% na FC USDA, 70,1% no FC C.C.pro e 89,4% no ELISAI. O valor preditivo negativo foi 65,8% no FC USDA variando de 69,4% a 72,6% nos outros exames. A acurácia observada foi de 65,1 % no FC USDA variando de 69,5% a 75,0% nos outros exames.

Tabela 2: Avaliação da sensibilidade do FC USDA, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting.

Teste	Western Blotting		
	Positivo	Negativo	Total
FC USDA			
Positivo	24	17	41
Negativo	143	272	415
Total	167	289	456

Sensibilidade: 14,5%; Especificidade: 94,1%; Valor Preditivo Positivo: 58,5%; Valor Preditivo Negativo: 65,8%; Acurácia: 65,1%.

Tabela 3: Avaliação da sensibilidade do C.C. PRO, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting.

Teste	Western Blotting		
	Positivo	Negativo	Total
FC C.C.PRO			
Positivo	47	20	67
Negativo	120	269	389
Total	167	289	456

Sensibilidade: 28,3%; Especificidade: 93,1%; Valor Preditivo Positivo: 70,1%; Valor Preditivo Negativo: 69,4%; Acurácia: 69,5%.

Tabela 4: Avaliação da sensibilidade do ELISA indireto, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting.

Teste	Western Blotting		
	Positivo	Negativo	Total
ELISAI			
Positivo	60	7	67
Negativo	107	282	389
Total	167	289	456

Sensibilidade: 35,5%; Especificidade: 97,6%; Valor Preditivo Positivo: 89,4%; Valor Preditivo Negativo: 72,6%; Acurácia: 75,0%.

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados de concordância entre a fixação do complemento utilizando o antígeno USDA com os outros exames. Desta tabela é possível verificar que os valores da concordância observada variaram de 65,1% a 90,8%. O valor do Kappa foi mais elevado com a fixação do complemento com o antígeno C.C. pro (0,562) indicando concordância moderada variando de 0,102 a 0,275 nos dois exames (Concordância pobre).

Tabela 5 – Avaliação da concordância entre o exame fixação do complemento USDA com fixação do complemento C.C pro, western blotting e ELISA indireto.

Exame	Coincidência observada		Kappa
	N	%	
•FC C.C. PRO	414	90,8	0,562
•Western Blotting	297	65,1	0,102
•ELISAI	387	84,9	0,275
TOTAL	456		

A concordância entre a fixação do complemento C.C.pro com o western blotting e ELISAI mostra na Tabela 6 uma concordância observada que variou de 69,5% a 87,1%. Os valores de Kappa oscilaram de baixa com o WB a moderada com ELISAI.

Tabela 6 – Avaliação da concordância entre a FC C.C. PRO com o western blotting e ELISAI.

Exame	Coincidência observada		Kappa	Intervalo com 95% confiança
	n	%		
•Western Blotting	317	69,5	0,245	0,16 a 0,33
•ELISAI	397	87,1	0,481	0,37 a 0,59
BASE	456			

Foi registrada concordância observada de 75,0% entre o WB e ELISAI sendo o valor de Kappa apresentado baixo (Tabela 7).

Tabela 7 – Avaliação da concordância entre o ELISAI e o Western Blotting.

Exame	Coincidência observada		Kappa	Intervalo com 95% confiança
	n	%		
•ELISA	342	75,0	0,380	0,30 a 0,46
BASE	456			

O Teste da Fixação do Complemento é a única ferramenta de diagnóstico sorológico recomendado pela OIE no comércio internacional de equídeos para o diagnóstico de mormo (NEUBAUER et al, 2005). Entretanto, é conhecido que o FC possui falhas consideráveis, como a detecção de anticorpos específicos através do sistema complemento e a falta de normalização dos reagentes utilizados no teste, como a utilização das hemácias de carneiro e antígeno, além de um número considerável de resultados falsos positivos e falsos negativos (KHAN et al, 2011, 2012,; ELSCHNER et al, 2011).

A fixação do complemento é o teste sorológico específico a ser realizado em animais cronicamente infectados de áreas endêmicas, sendo, portanto as IgG's a classe de imunoglobulinas detectáveis no teste (ELSCHNER et al, 2011, NEUBAUER et al., 2005). No presente estudo, a maioria dos animais cronicamente infectados não foi reagente ao teste da Fixação do Complemento, levando a hipótese de que as IgG's não são as imunoglobulinas de eleição detectáveis na prova, podendo haver, então, a participação da classe IgM, que são imunoglobulinas de fase aguda. Entretanto, Nilsen & Duncan (1990) afirmam que a classe IgM é inativada a temperaturas elevadas por um tempo determinado, procedimento que ocorre na primeira fase do teste da Fixação do Complemento, onde esta inativação tem como o objetivo descomplementar o soro e eliminar resíduos contaminantes oriundos da coleta da amostra. Por ser imunoglobulina de fase aguda, as IgM's desaparecem em um período de 7 a 15 dias, surgindo as IgG's. Contudo, Abbas, (2012) afirma que a IgM é a imunoglobulina que melhor fixa o complemento devido a sua estrutura pentamérica e a quantidade de receptores na região Fc, responsável pela ligação aos epítomos dos agentes infecciosos, enquanto que as

IgG's não possuem uma quantidade de regiões Fc suficiente para a ligação aos antígenos, não ativando o complemento e não contribuindo para a opsonização dos agentes.

Nilsen & Duncan, (1990), ainda relatam que animais experimentalmente infectados por *Brucella*, geralmente, apresentam respostas mais rápidas e prolongadas na Soroaglutinação Rápida (SAR) do que na Fixação do Complemento. Essas respostas são relacionadas à imunoglobulina M, visto que a imunoglobulina G específica apresenta-se de forma temporária no soro. ELSCHNER et al., (2009) corroboram esta hipótese ao descrever um cavalo que exportado do Brasil para Alemanha com atestados negativos na FC, apresentou sinais clínicos da doença ao chegar ao destino, positivando em todos os testes, principalmente no Western Blotting, confirmando a hipótese que a imunoglobulina de fase aguda, IgM, também é detectada na FC. Uma maior sensibilidade e especificidade do teste também irá depender do tipo do antígeno que é empregado e se sua composição contém exclusivamente o microrganismo a ser detectado. É o que provavelmente aconteceu nesse estudo, onde observamos uma concordância de moderada à fraca com os diversos testes sorológicos realizados devido aos diversos tipos de antígenos empregados.

Um número maior de animais positivos foi evidenciado pela FC empregando-se o antígeno C.C. PRO. Com a utilização deste antígeno, houve um crescimento do número de animais positivos de 41 para 67. Esse fato pode ser referenciado pelo tipo de antígeno empregado na técnica, visto que as cepas utilizadas no preparo do antígeno USDA são cepas de origem humana, cepa China (ULRICH et al., 2006), uma vez que a virulência da cepa da bactéria está relacionada com a cápsula de polissacarídeo, levando a uma diferença de determinante antigênico pela destruição ou perda dos epítomos durante subcultivos e conseqüentemente falhando na detecção de anticorpos (WHITLOCK et al., 2007 & NEUBAUER et al., 2005). Contudo esta cepa China, mantém a antigenicidade após passagens sucessivas em cobaias. Segundo Khan, em estudo realizado em 2013, comparando três antígenos comercialmente disponíveis, a maior especificidade foi encontrada com o antígeno americano (USDA) com 100%, seguido pelo antígeno CIDC (Holandês) com 97,5% e pelo antígeno c.c.pro com 96,5% enquanto a melhor sensibilidade foi observada com a utilização do antígeno CIDC (100%), seguida pelo c.c.pro com 99,39% e por último o americano USDA com 62,19% com $p < 0.05$. Em outro estudo, realizado no Paquistão, também comparando os antígenos c.c.pro e CIDC, mostram que o C.C.pro mostrou especificidade inferior ao CIDC com 75,71% e 77,45%, respectivamente, quando testados em animais aparentemente saudáveis, mas expostos à infecção pela *B. mallei* e quando testado em animais de diferentes

áreas livres de mormo na Alemanha, o C.C.pro mostrou uma especificidade superior ao CIDC de 94,79% e 93,75% respectivamente (Khan et al., 2011).

Em relação à FC com o ELISAi, a concordância entre os dois foi moderada a fraca. Embora os testes sejam semelhantes, o ELISAi utiliza um conjugado anti-IgG que deveria resultar em bem mais positivos que a FC, pois alguns animais do estudo são oriundos de propriedades com histórico de mormo, por esta razão que o Western Blotting apresentou um número maior de resultados positivos, resultando numa fraca concordância com os testes de FC e ELISA. Apesar disto, Sprague et al, 2009, afirmam que a FC é ainda o melhor método de estudo para avaliar equídeos em área de baixa prevalência do mormo, devido ao baixo custo e robustez do teste. No seu trabalho, as amostras foram testadas com a Fixação do Complemento, ELISA competitivo e ELISA indireto utilizando dois antígenos, o alemão C.C. pro e Dubai 7. Sprague utilizou 05 (cinco) grupos distintos os quais continham animais de zonas livres de mormo e animais com suspeita clínica. No grupo de animais de área livre do mormo, a FC mostrou 100% de especificidade, detectando a ausência dos anticorpos específicos da *B. mallei*, enquanto que o ELISAi identificou a presença de 12,9% de animais falso positivos e 15% de suspeitos e o ELISAc apresentou 2,7% de falsos positivos e 0,8% de animais suspeitos. No presente estudo, o ELISAi, utilizando como antígeno o derivado protéico da *B.mallei* de origem local, apresentou um grande número de falsos negativos em comparação aos valores encontrados no western blotting, corroborando os resultados encontrados por Sprague em sua pesquisa.

A utilização de antígenos preparados com cepas de *B. mallei* locais ou com parte dos epítomos pode melhorar a sensibilidade. Naurren, 2007, observou que o preparo do antígeno utilizando três diferentes cepas, pode influenciar na virulência e na sensibilidade de antígenos. A FC é considerada altamente sensível para a detecção do Mormo (VERMA, 1990), no entanto pode falhar na detecção de muitos casos confirmados (SHUMILOV, 1974). Essa limitação também pode ser atribuída a anticomplementariedade dos soros de burros e mulas, contaminação das amostras ou reação cruzada com outros microrganismos (RADOSTISTS, 2000).

Outro fato que pode ser identificado é a interação bactéria-hospedeiro sendo pré-requisito para que o processo de infecção ocorra, onde vários fatores, como as Pili proteínas das bactérias que estão envolvidas no processo de escape durante a invasão intracelular de células fagocíticas e não fagocíticas, levando a sobrevivência bacteriana no hospedeiro, podendo o reconhecimento imunogênico apresentar falhas nesta fase, levando a falsos resultados na sorologia (WHITLOCK et al., 2007).

Utilizando o ELISAI, 14,5% das amostras apresentaram positividade mostrando uma concordância fraca com o Western Blotting. A baixa concordância entre estes dois testes também está relacionada às cepas utilizadas. No estudo de Osman (2013), o ELISAI demonstrou ser mais sensível (90%) e mais específico (96%) no diagnóstico da clamidiose ovina em animais naturalmente e experimentalmente infectados apresentando valor de kappa de 0.6. Teles et al (2012) demonstraram 100% de sensibilidade e 98,2% de especificidade do ELISAI parara o diagnóstico do Mormo, utilizando como antígeno o derivado proteico da maleína de isolados locais. O presente estudo apresentou sensibilidade inferior (35%) aos dados acima. Neste estudo, o tipo antígeno utilizado no teste foi produzido com isolados de cepas locais de *B. mallei* que deveriam produzir uma maior especificidade e sensibilidade ao teste, como o encontrado pelos autores acima.

O ELISA ainda é considerado um método para avaliar a eficácia global e o status sorológico do paciente (ZARZOSA, 1975) e, sua eficácia depende do tipo do antígeno utilizado, tornando difícil a comparação entre diversos testes sorológicos (ROGAN, 1991). PAL et al (2012) descreveram o uso do ELISAI para diagnóstico do Mormo, utilizando proteínas recombinantes 0375H e 0375TH purificadas e obteve 100% de sensibilidade e especificidade. A escolha do antígeno deve ser verificada e levada em consideração no desenvolvimento de diagnóstico para áreas endêmicas. De acordo com a literatura, o ELISA indireto parece ser mais sensível que a fixação do complemento (OIE, 2013; ESTEIN, 1999), entretanto alguns fatores devem ser considerados como área geográfica, raças dos animais, condições de criações e os métodos estatísticos para avaliar a sensibilidade e especificidade quando o padrão ouro de comparação é o teste da fixação do complemento. As vantagens do ELISA incluem sua facilidade de utilização e manipulação, além de poder ser utilizado para amostras hemolisadas ou soros anticomplementares (GALL, 2003).

A menor manipulação e o encurtamento do tempo necessário para o diagnóstico leva o ELISA a possuir uma vantagem substancial em relação aos outros testes (PAREDES, 1999), podendo, assim, ser empregado no diagnóstico do Mormo.

O western blotting demonstra alta sensibilidade e especificidade e seu emprego em diagnóstico das doenças dos animais é crescente (TALMI-FRANK et al., 2006). Vários trabalhos já relataram seu uso em animais do Paquistão, Emirados Árabes, Barein, Brasil, Kuwait e Líbano, sendo usada como uma ferramenta para exclusão da enfermidade em países considerados livres (KHAN, 2012).

Elschner et al., (2011) utilizaram a membrana de lipopolissacarideo da *B. mallei* como antígeno e obteve 100% de sensibilidade e especificidade na identificação de antígeno

específico para o mormo. A utilização de antígenos baseados em proteínas recombinantes ou em membranas de LPS deverá ser uma alternativa para eliminar resultados falsos positivos e negativos promovendo uma maior confiabilidade aos testes sorológicos

Segundo Elschner et al (2011), a técnica de western blotting é altamente específica e é capaz de complementar os achados da FC para evitar diagnósticos falso-positivos em cavalos e mulas e também se apresenta útil para a confirmação da presença de antígenos de membrana de LPS (FOMSGAARD, 1990) e mostra uma alta especificidade e sensibilidade quando comparado a fixação do complemento e ELISA (ELSCHNER *et al*, 2011, KHAN et al, 2011, 2012).

Em estudo comparando o teste da Fixação do Complemento e Imunoblotting, este último mostrou-se de 2 a 4 vezes mais sensível para o diagnóstico de anticorpos do Mormo, piroplasmose e tripanossomiase (Katz, 1999). Ao comparar dois antígenos comerciais na Técnica de Fixação do Complemento com o western blotting, Khan, (2012), observou uma concordância de 0,79 utilizando o antígeno C.C.pro e 0,76 utilizando o antígeno holandês CIDC em animais de áreas livre do Mormo na Alemanha e também de animais potencialmente expostos de áreas endêmicas do Paquistão, diferenciando do presente estudo que apresentou uma concordância baixa entre estes testes. Khan et al, (2011) concluíram que a utilização combinada do western blotting e FC pode aumentar taxa de detecção de Mormo.

Outro ponto de discussão a respeito da Fixação do Complemento é o uso de diferentes antígenos empregados. Utilizando o antígeno USDA, em comparação ao mesmo teste, com o método de incubação a frio, observa-se um aumento do número de animais reagentes para 61 amostras (56,1%) identificados na tabela 8.

Tabela 8: Resultado da fixação de complemento utilizando antígeno USDA com diferentes métodos de incubação.

Variável	n	%
Total de exames realizados	456	100,0
•FC USDA quente		
Positivo	41	9,0
Negativo	415	91,0
•FC USDA frio		
Positivo	61	13,4
Negativo	395	86,6

Tabela 9: Avaliação da concordância entre o exame fixação o complemento com antígeno USDA incubação a quente com fixação do complemento com antígeno USDA incubação a frio e fixação do complemento com antígeno C.C.pro.

Exame	Coincidência observada		Kappa	IC 95% confiança
	N	%		
•FC USDA - frio	408	89,5	0,473	0,35 a 0,60
BASE	456			

Na Tabela 9 são apresentados os resultados da concordância entre a FC USDA quente com a FC USDA na incubação a frio. Desta tabela é possível verificar que o valor observado é 0,473, o valor do Kappa foi mais elevado com FC C.C.pro (0,562) indicando concordância moderada.

O maior número de animais reagentes empregando a metodologia a frio, pode estar relacionado com o tempo de incubação das placas em geladeira, tempo este que varia entre 16 e 18 horas, em temperatura de 2°C a 10° C. Pode haver influência tanto da temperatura quanto da incubação sobre a atividade hemolítica do complemento, provocando reações mais fortes de fixação do complemento. Foi observado que o complexo antígeno/anticorpo é mais evidente na incubação prolongada, a frio, do que a incubação por 1 hora, a 37° C (KOLMER, 1920). A incubação a frio aumentou o número de animais reagentes ao teste da FC, independente dos antígenos utilizados (C.C PRO ou USDA), embora, encontrou-se um número maior de positivos usando o antígeno alemão. Em estudo realizado para detecção da Brucelose em ovinos, é evidenciado que o teste da FC a frio apresenta resultados de até uma semana de antecedência de animais infectados em relação ao teste da FC a quente (BURGESS et al., 1982). Provavelmente, o complemento pode ser fixado a uma temperatura mais baixa por um longo período, ao contrário da incubação a 1 hora por 37°C.

CONCLUSÃO

Pelo presente estudo, vimos que o antígeno utilizado para o diagnóstico do mormo é o ponto crítico a ser avaliado no incremento de novas técnicas diagnósticas. O desenvolvimento e utilização de antígenos preparados com cepas locais de *Burkholderia mallei*, a fim de

aumentar a confiabilidade, especificidade e sensibilidade é o melhor método para diagnóstico do mormo a ser empregado para controle e erradicação da enfermidade em áreas endêmicas.

A fixação do complemento e ELISA são técnicas sorológicas que podem ser empregadas tendo como aliado o Western Blotting como teste confirmatório, devendo seu uso ser implementado para o trânsito de animais como diagnóstico, pois apresenta resultados confiáveis e satisfatórios na detecção da enfermidade.

Agradecimentos

Ao Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco (LANAGRO-PE) e ao Projeto SAGRES-Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e CNPq pelo incentivo e financiamento para desenvolvimento da pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, K. A., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. *Imunologia Celular e Molecular*. 7ª edição. Elsevier. 2012.
- BRASIL. 2004. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24, de 05 de abril de 2004, da Secretaria de Defesa Agropecuária, publicada no Diário Oficial da União em 12 de abril de 2004, seção 1, página 7.
- BURGESS, G.W., NORRIS, M.J. Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis. *Australian Veterinary Journal*, 59:23-25. 1982.
- CARLIER, Y.; BOUT, D.; DESSAINT, J. P.; CAPRON, A.; VAN KNAPEN, F.; RUITENBERG, E.J.; BERGQUIST, R.; HULDT, G. Evaluation of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and other serological tests for the diagnosis of Toxoplasmosis. *Bulletin of the World Health Organization*, 58 (1): 99-105. 1980.
- ELSCHNER, M. C.; KLAUS, C. U.; LIEBLER-TENORIO, E.; SCHMOOCK, G.; WOHLSEIN, P.; TINSCHMANN, O.; LANGE, E.; KADEN, V.; KLOPFLEISCH, R.; MELZER, F.; RASSBACK, A.; NEUBAUER, H. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. *Equine Veterinary Education*. Volume 21, Issue 3, pages 147–150, 2009.
- ELSCHNER, M. C.; SCHOLZ, H. C.; MARTEN, P.; RASSBACH, A.; DIETZSCH, M.; MELZER, F.; SCHMOOCK, G.; SANTANA, V. L. A.; SOUZA, M. M. A.; WERNERY, R.; WERNERY, U.; NEUBAUER, H. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *Bio Med Central Veterinary Res.* 5, 7. 2011.
- ESTEIN S. Immunological aspects in the diagnosis and control of contagious epididymitis of rams caused by *Brucella ovis*; Aspectos inmunológicos en el diagnóstico y control de la epididimitis contagiosa del carnero por *Brucella ovis*. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 31:5–17. 1999.
- FOMSGAARD, A.; FREUDENBERG, A. M.; GALANOS, C. Modification of the Silver Staining Technique To Detect Lipopolysaccharide in Polyacrylamide Gels. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2627-2631. 1990.

GALL, D.; NIELSEN, K.; VIGLIOCCO, A.; SMITH, P.; PEREZ, B.; ROJAS, X.; ROBLES, C. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunoassay for presumptive serodiagnosis of *Brucella ovis* in sheep. *Small Ruminant Research*, 48(3):173–179. 16. 2003.

KATZ, J. B.; CHIEVES, L. P.; HENNAGER, S. G.; NICHOLSON, J. M.; FISHER, T. A.; BYERS, P. E.. Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine, and glanders using an arrayed immunoblotting method. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Thousand Oaks, v.11, p.292–294, 1999.

KHAN, I. et al. Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. *Veterinary Record*, v.169, n.19, p.495, 2011.

KHAN, I.; ELSCHNER, C. M.; MELZER, F.; GWIDA, M.; WIELER, L. H.; RIASAT, A.; MUHAMMAD, S.; NEUBAUER, H. Performance of complement fixation test and confirmatory immunoblot as two-cascade testing approach for serodiagnosis of glanders in an endemic region of South East Asia. *Berliner und 10 Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 125, Heft ¾, Seiten 10–14. 2012.

KHAN, I.; WIELER, L. H.; MELZER, F.; ELSCHNER, M. C.; MUHAMMAD, G.; ALI, S.; SPRAGUE, L. D.; NEUBAUER, H.; SAQIB, M.. Glanders in Animals: A Review on Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Countermeasures. *Transboundary and Emerging Diseases*. Janeiro 2012. 2012.

KOLMER, J.A., ANNA, M.R. ELIZABETH, M.Y. Standardization of the Wassermann reaction. The influence of temperature and duration of primary incubation upon the velocity and amount of complement fixation in Syphilis with different organ extracts (antigens). *Am Jour Syph*. P. 44. 1920.

LOYOLA, W.; CHEIRUBIM, A. P.; VENÂNCIO, E. J.; ETO, S.; ANDRADE, F. G.; TAMEHIRO, C. Y. Standardization of an enzyme-linked immunosorbent assay (elisa) for the determination of avidity of avian igy immunoglobulin wpc2012 - Salvador - Bahia - Brazil • 5 - 9 August – 2012.

MÉDICI, K. C.; ALFIERI, A. A.; ALFIERI, A. F.. ENSAIO IMUNOENZIMÁTICO COMERCIAL NO DIAGNÓSTICO SOROLÓGICO DAS INFECÇÕES POR HERPESVÍRUS BOVINO 1(1). *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 30, n. 2, p. 343-346, 2000.

- MOHLLER, J.R., EICHHORN, A. The diagnostic of glanders. Washington, 1911.
- NAUREEN, A. et al. Comparative Evaluation of Rose Bengal Plate Agglutination Test, Mallein Test, and Some Conventional Serological Tests for Diagnosis of Equine Glanders. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, v.19, n.4, p.362-367, 2007.
- NEUBAUER, H. et al. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: State-of-the-art and perspectives. *Journal of Veterinary Medicine*, v.52, n.5, p.201–205, 2005.
- NILSEN, K.; DUNCAN, J. R. Animal Brucellosi. *Internacional Standard Book*.P-153-160 1990.
- OIE – World Animal Health Organization. *Terrestrial Animal Health Code*. 2013. Chapter 12.10. Glanders. Disponível em <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>. Acesso em 19/12/2013.
- PAL, V.; KUMAR, S.; MALIK. P.; RAI, G. P. Evaluation of Recombinant Proteins of *Burkholderia mallei* for Serodiagnosis of Glanders. *Clinical and vaccine Immunology*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 19(8):1193. 2012.
- PAREDES, J. C. M.; OLIVEIRA, L. G.; BRAGA, A. C.; TREVISOL, I. M.; ROEHE, P. M. Development and standardization of an indirect ELISA for the serological diagnosis of classical swine fever. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 19(3/4):123-127.1999.
- RADOSTITS, O. M. et al. *Clínica Veterinária*. 9 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 1737p. 2002.
- ROGAN, M. T.; CRAIG, P. S.; ZEYHLE, E.; ROMIG, T.; LUBANO, G.M.; DESHAN L. Evaluation of a rapid dot-ELISA as a field test for the diagnosis of cystic hydatid disease. *Transaction of the Royal Society Tropical Medicine and Hygiene*. 85:773–777. 1991.
- SBIHI, Y. RMIQUI, RODRIGUEZ-CABEZAS, M. N.; ORDUÑA, A.; RODRIGUEZ-TORRES, A. OSUNA, A. Comparative Sensitivity of Six Serological Tests and Diagnostic Value of ELISA Using Purified Antigen in Hydatidosis. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* 15:14–18. 2001.
- SHUMILOV, K. G. Comparative study of methods of diagnosis of glanders in horses in Mongolia. *Tr Vses Inst Eksp Vet* 42:274–278, 1974.

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

TELES, J. A. A.; CAMPOS, A. C.; SILVA, K. P. C.; SANTOS, A.S.; SANTANA, V. L. A.; CASTRO, R. S.; MOTA, R. A. Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012.

ULRICH, M. P.; NORWOOD, D. A.; CHRISTENSEN, D. R. ULRICH, R. L. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. *Journal of Medical Microbiology*., 55, 551–559. 2006.

VERMA, R. D. A micro-complement fixation test for identification of *Pseudomonas mallei*. *Journal of the Remount and Veterinary Corps* 29:1–5, 1990.

WAFSA A. O. Comparative Evaluation of Indirect ELISA, CF Test and PCR for Diagnosis of Ovine Enzootic Abortion (Ovine chlamydophilosis). *Global Veterinaria* 11 (1): 65-70, 2013.

WANKE, M. M.; DELPINO, M. V.; BALDI, P. C. Comparative performance of tests using cytosolic or outer membrane antigens of *Brucella* for the serodiagnosis of canine brucellosis. *Veterinary Microbiology*, v. 88, p. 367-375, 2002.

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

ZARZOSA M. P, ORDUÑA A, GUTIERREZ P, et al. Evaluation of six serological tests in diagnosis and postoperative control of pulmonary hydatid disease patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999;35:255–262. e Farag H, Bout D, Capron A. Specific immunodiagnosis of human hydatidosis by the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). *Biomed* 1975;23:276–278,).

REGULAMENTO EDITORIAL E NORMAS DE ESTILO DA REVISTA FRONTIERS IN MICROBIOLOGY

1. Summary Table

Please view the table below for a summary on currently accepted article types and general manuscript style guidelines.

2. Manuscript Guidelines

1) Tier 2 article - field level article reserved to authors of selected Tier 1 articles.

Registration with Frontiers

Please note that the corresponding and all submitting authors **MUST** register with Frontiers before submitting an article. You must be logged in your personal Frontiers Account to submit an article.

For any co-author who would like his/her name on the article abstract page and PDF to be linked to a Frontiers profile, please ensure to register before the final publication of the paper.

Article Type

Frontiers requires authors to carefully select the appropriate article type for their manuscript, and to comply to the article type descriptions defined in the journal's "Article Types", which can be seen from the left menu on any Frontiers journal page. Please pay close attention to the word count limits. Focused Reviews, Frontiers Commentaries and Grand Challenge articles are invited by the chief editor and cannot be part of any Frontiers Research Topic. Unless you were contacted by the chief editor or the editorial office regarding the submission of a paper selected for tier 2 promotion, do not submit a Focused Review or a Frontiers Commentary - instead, submit a Review or a General Commentary.

Manuscript Length

Frontiers encourages its authors to closely follow the article word count lengths given in the Summary Table. The manuscript length includes only the main body of the text and all citations within it, and excludes abstract, section titles, figure and table captions, and references at the bottom of the manuscript. Please indicate the number of words and the number of figures included in your manuscript on the first page.

Language Style

Authors are requested to follow American English spelling. For any questions regarding style Frontiers recommends authors to consult the Chicago Manual of Style.

Title

The title is centered, and in 16 point bold Times New Roman font at the top of page. Except for special names (e.g., GABAergic), capitalize only the first letter of the title.

The title should be concise, omitting terms that are implicit and, where possible, be a statement of the main result or conclusion presented in the manuscript. Authors should try to avoid, if possible:

Titles that are a mere question without giving the answer.

Unambitious titles, for example starting with "Towards", "A description of", "A characterization of", "Preliminary study on".

Vague titles, for example starting with "Role of...", "Link between...", "Effect of..." that do not specify the role, link, or effect.

Include terms that are out of place, for example the taxonomic affiliation apart from species name.

For article types requiring it, the running title should be a maximum of 5 words in length. (see Summary Table)

Authors and Affiliations

All names are listed together and separated by commas. Provide exact and correct author names as these will be indexed in official archives. Any change requests after publication will incur additional costs and will be solely at the author's charge. Affiliations should be keyed to the author's name with superscript numbers and be listed as follows: Laboratory, Institute, Department, Organization, City, State abbreviation (USA, Canada, Australia), and Country (without detailed address information such as city zip codes or street names).

Example: Max Maximus, Department of Excellence, International University of Science, New York, NY, USA.

The Corresponding Author should be marked with an asterisk. Provide the exact contact address (this time including street name and city zip code) and email of the corresponding author in a separate paragraph, as shown below:

Correspondence:

Dr. Max Maximus
International University of Science
Department of Excellence
Laboratory of High Impact
Street 2460,
New York, NY, 59066, USA
maximus@gmail.com

If one of the authors has a change of address, list the new address below the correspondence details using a superscript symbol and use the same symbol to indicate the author in the author list.

Headings and Sub-headings

Except for special names (e.g. GABAergic), capitalize only the first letter of headings and subheadings. Headings and subheadings need to be defined in Times New Roman, 12, bold. You may insert up to 4 heading levels into your manuscript (not more than for example: 3.2.2.1. Heading title).

Abstract

As a primary goal, the abstract should render the general significance and conceptual advance of the work clearly accessible to a broad readership. References should not be cited in the abstract. The text

of the abstract section should be in 12 point normal Times New Roman. See Summary Table for abstract requirement and length according to article type.

For Clinical Trial article types, please include the Unique Identifier and the URL of the publicly accessible website on which the trial is registered.

Keywords

All article types: you may provide up to 8 keywords; at least 5 are mandatory.

Text

The body text is in 12 point normal Times New Roman. New paragraphs will be separated with a single empty line. The entire document should be single-spaced and should contain line numbers in order to facilitate the review process. Your manuscript should be written using either LaTeX or MS-Word.

Nomenclature

Non-standard abbreviations should be defined when first used in the text.

Equations should be inserted in editable format from the equation editor.

Gene symbols should be italicized; protein products are not italicized.

Chemical compounds and biomolecules should be referred to using systematic nomenclature, preferably using the recommendations by IUPAC.

We encourage the use of Standard International Units in all manuscripts.

Sections

Your manuscript is organized by headings and subheadings.

For Original Research Articles, Clinical Trial Articles, and Technology Reports the section headings should be those appropriate for your field and the research itself. It is recommended to organize your manuscript in the following sections or their equivalents for your field:

Introduction

Succinct, with no subheadings.

Material and Methods

This section may be divided by subheadings. This section should contain sufficient detail so that when read in conjunction with cited references, all procedures can be repeated.

Results

This section may be divided by subheadings. Footnotes should not be used and have to be transferred into the main text.

Discussion

This section may be divided by subheadings. Discussions should cover the key findings of the study; discuss any prior art related to the subject so to place the novelty of the discovery in the appropriate context; discuss the potential short-comings and limitations on their interpretations; discuss their

integration into the current understanding of the problem and how this advances the current views; speculate on the future direction of the research and freely postulate theories that could be tested in the future.

For Clinical Case Studies the following sections are mandatory:

Introduction

Include symptoms at presentation, physical exams and lab results.

Background

This section may be divided by subheadings. Include history and review of similar cases.

Discussion

This section may be divided by subheadings. Include diagnosis and treatment.

Concluding Remarks

For all other article types there are no mandatory sections.

Conflict of Interest Statement

Frontiers follows the recommendations by the International Committee of Medical Journal Editors (http://www.icmje.org/ethical_4conflicts.html) which require that all financial, commercial or other relationships that might be perceived by the academic community as representing a potential conflict of interest must be disclosed. If no such relationship exists, authors will be asked to declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest. When disclosing the potential conflict of interest, the authors need to address the following points:

Did you or your institution at any time receive payment or services from a third party for any aspect of the submitted work?

Please declare financial relationships with entities that could be perceived to influence, or that give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

Please declare patents and copyrights, whether pending, issued, licensed and/or receiving royalties relevant to the work.

Please state other relationships or activities that readers could perceive to have influenced, or that give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

Author and Contributors

When determining authorship the following criteria should be observed:

Substantial contributions to the conception or design of the work; or the acquisition, analysis, or interpretation of data for the work; AND

Drafting the work or revising it critically for important intellectual content; AND

Final approval of the version to be published; AND

Agreement to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Contributors who meet fewer than all 4 of the above criteria for authorship should not be listed as authors, but they should be acknowledged. (http://www.icmje.org/roles_a.html)

The statement about the authors and contributors can be up to several sentences long, describing the tasks of individual authors referred to by their initials and should be included at the end of the manuscript before the References section.

Acknowledgments

This is a short text to acknowledge the contributions of specific colleagues, institutions, or agencies that aided the efforts of the authors. A statement about the principal source of funding should be inserted if appropriate, including grant numbers if appropriate.

References

All citations in the text, figures or tables must be in the reference list and vice-versa. The references should only include articles that are published or accepted. For accepted but unpublished works use in press instead of page numbers. Unpublished data, submitted manuscripts, or personal communications should be cited within the text only. Personal communications should be documented by a letter of permission. Any inclusion of verbatim text must be contained in quotation marks and clearly reference the original source.

REGULAMENTO EDITORIAL E NORMAS DE ESTILO
DA REVISTA PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). **Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.**

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de “Notas Científicas”, não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de “INDEX TERMS” ou “TERMOS DE INDEXAÇÃO”, respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do “Style Manual for Biological Journals” (American Institute for Biological Sciences), o “Bibliographic Guide for Editors and Authors” (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pvb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob “Instruções aos Autores” (www.pvb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a **página** deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta “Inserir” do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso)**;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano; se dois trabalhos não se distinguirem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, “(Resumo)” ou “(Apud Fulano e o ano.)”**; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista **uma só vez**. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a

Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exememplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et. al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), **e sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

preferencialmente enviadas por via eletrônica. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão “jpg”), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse **caso**, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra “pé”. Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos (“slides”). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope. Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho.**

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto.** Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com “a” em cada Quadro;** as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.

5. CONCLUSÕES

A qPCR demonstrou ser uma boa ferramenta de diagnóstico para identificação da *B. mallei* com a utilização de amostras clínicas, podendo também ser utilizada como técnica complementar de diagnósticos sorológicos. Em contrapartida o elevado custo de equipamentos e reagentes pode ser um impedimento para realização da técnica em laboratórios de rotina.

A fixação do complemento e ELISA indireto são técnicas sorológicas que podem ser empregadas tendo como aliado o western blotting como teste confirmatório, devendo seu uso ser implementado para o trânsito de animais como diagnóstico, pois apresenta resultados confiáveis e satisfatórios na detecção da enfermidade.