



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**DIAGNÓSTICO DO MORMO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE  
FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO UTILIZANDO-SE  
DIFERENTES ANTÍGENOS E MÉTODOS DE  
INCUBAÇÃO**

**MARCILIA MARIA ALVES DE SOUZA**

**RECIFE - PERNAMBUCO**

**2012**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**DIAGNÓSTICO DO MORMO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE  
FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO UTILIZANDO-SE  
DIFERENTES ANTÍGENOS E MÉTODOS DE  
INCUBAÇÃO**

**MARCILIA MARIA ALVES DE SOUZA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Hélio Cordeiro Manso Filho**

**CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSÉ WILTON JÚNIOR**

**RECIFE - PERNAMBUCO**

**2012**

**DIAGNÓSTICO DO MORMO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE FIXAÇÃO DO  
COMPLEMENTO UTILIZANDO-SE DIFERENTES ANTÍGENOS E MÉTODOS DE  
INCUBAÇÃO**

**MARCILIA MARIA ALVES DE SOUZA**

**DISSERTAÇÃO DEFENDIDA E APROVADA PELA BANCA  
EXAMINADORA:**

**ORIENTADOR:**

---

Prof. Dr. Hélio Cordeiro Manso Filho

**EXAMINADORES:**

---

Dr<sup>a</sup> TOMOE NODAS SAUKAS

---

Dr. FERNANDO LEANDRO DOS SANTOS

---

Dra. VANIA LUCIA DE ASSIS SANTANA

**RECIFE - PERNAMBUCO  
2012**

"O que fazemos de bom ecoará para sempre. As boas obras não de sobrevivem nas vibrações de simpatia e de fraternidade que espalharão o sinal de nossa presença na terra".

Carlos A. Baccelli

"O SENHOR está  
comigo; não temerei o  
que me pode fazer o  
homem."

Salmo 118:6

## OFEREÇO

Aos meus pais, Amaro e  
Maria José (*in  
memoriam*) saudade eterna.

Aos meus filhos Danilo e  
Thomás, amores da minha  
vida.

A todos que colaboraram na  
execução deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

*\*À Deus que a mim permitiu tentar conquistar o grau de Mestre em Ciência Veterinária quando eu pensando estava em parar profissionalmente. Colocou em meu caminho pessoas que sem as quais não teria sido possível a execução deste trabalho.*

*\*À Dra. Diana Pinheiro, coordenadora do Laboratório Nacional Agropecuário de Pernambuco pertencente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA, que não só liberou-me para fazer o mestrado, como usar as amostras da instituição e o laboratório de diagnóstico bacteriológico, no qual trabalho há mais de duas décadas e considero minha segunda casa.*

*\*Ao meu orientador Prof. Dr. Hélio Manso, pela generosidade e compreensão, meu co-orientador Prof. Dr. Wilton Pinheiro, foi um grande parceiro e conselheiro.*

*\*Às colegas de trabalho e companheiras de mestrado Marta Nery, Eva Frutuoso e Elizete Oliveira, grandes incentivadoras.*

*\* Aos colegas do campo, Pedro Paulo da Silveira da Superintendência Federal da Agricultura -PE e Marcelo Brasil da Agencia de Defesa Agropecuária de Pernambuco- ADAGRO.*

*\* Prof. Dr. Fernando Leandro dos Santos, muita experiência e conhecimento no assunto em apreço, ajudou-me bastante.*

*\*Aos estagiários que passaram pelo laboratório durante o período, cada um deles teve uma participação especial: Betânia, Érika Samico, Pedro Paulo, Bruna, Gabryella Dumonte, Emanuela Florêncio e Marcus Vinicius.*

*\* Aos concluintes de veterinária: Diogo Farias, Cecilia Souza Leão(minha filha de coração) e Neurisvam Guerra trabalharam incansavelmente.*

*\*À Dra. Aleuda Vasconcelos , minha boa e velha amiga, incentivou-me bastante.*

*\*À Dra. Tomoe Noda Saukas, minha “eterna” professora, sempre solícita, grande incentivadora e colaboradora, foi de importância fundamental nessa conquista, sou-lhe imensuravelmente grata.*

*\* Aos companheiros de trabalho : Luiz Evandro, Dra. Andrea Padilha, Dra. Mabel Harrop Solange, Raab e Gizele .*

*\* À Dra. Vânia Santana minha jovem colega de trabalho, companheira de viagens de trabalho e a mentora dessa minha busca pelo título de Mestre, um agradecimento especial. sempre presente e preocupada com meu desempenho, cobrando , como uma mãe que cobra do filho estudo e dedicação ajudando em todos os sentidos , não tenho como retribuir o que ela fez por mim*

*\* À equipe do Setor de Virologia do LANAGRO-PE.*

*\* Ao meu esposo Alberto, que se tornou um exemplo de superação buscando uma graduação perdida na juventude, e conseguiu, depois de quase três décadas, assim como eu, fora da vida acadêmica.*

*\*À Fabiana e Jader pelo estímulo.*

*Os agradecimentos são muitos, perdoem-se aqueles que, por ventura, posso não*

*ter aqui mencionado. Sinto-me honrada por conviver com tantas pessoas especiais. Ser-lhes-ei eternamente grata; a todos, meu carinho.*

## SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1 ETIOLOGIA .....	14
2.2 EPIDEMIOLOGIA .....	17
2.3 PATOGÊNESE .....	20
2.4 PATOLOGIA .....	23
2.5 SINTOMATOLOGIA .....	25
2.6 DIAGNÓSTICO.....	28
2.7 TRATAMENTO .....	34
2.8 PREVENÇÃO E CONTROLE .....	35
2.9 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA.....	37
3 OBJETIVOS.....	38
4 REFERÊNCIAS.....	39
5. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	50
5.1 PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- BURKHOLDERIA MALLEI ATRAVÉS DA AVALIAÇÃO DE DOIS ANTÍGENOS COMERCIAIS UTILIZADOS NO TESTE DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO.....	50
5.2 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA DO MORMO FRENTE AO RITMO CIRCADIANO .....	61

## LISTA DE QUADROS

Pág

Quadro 1: Focos e casos de mormo, com número de mortos e destruídos, notificados à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2011c) no período de 1999 a 2004. ....	18
Quadro 2: Ocorrência de mormo em estados brasileiros, no período de 2005 e 2011, notificados à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2011c) .....	19

## LISTA DE FIGURAS

Pág.	
	Figura 1: Isolamento da <i>Burkholderia mallei</i> . 1a - Teste de Gram;
	1b – Crescimento em Agar sangue com glicerol 1% .....29
	Figura 2: Reação de Fixação do Complemento .....31

## RESUMO

O mormo é uma doença que acomete equídeos, produzida pela *Burkholderia mallei*, um cocobacilo, Gram-negativo, imóvel, anaeróbio e não esporulado (YABUUCHI et al., 1992), que pode ser transmitida para o homem, e seu agente utilizado como arma biológica (ULRICH, et al, 2006). Doença reemergente no Brasil desde 1999 tem sido motivo de discussão, no que concerne ao diagnóstico sorológico. Fixação do Complemento (FC) é o exame preconizado no programa de controle e erradicação do mormo, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2004) e pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para trânsito internacional (OIE 2008). Objetiva-se com este trabalho, avaliar os resultados do Teste de Fixação do Complemento frente a dois antígenos comercialmente disponíveis utilizando dois métodos de incubação, em soros de equinos de uma propriedade em Pernambuco.

Palavras-chave: diagnóstico sorológico, *Burkholderia mallei*, equinos.

## **ABSTRACT**

Glanders is a disease that affects equids, produced by *Burkholderia mallei*, a coccobacillus, gram-negative, immobile, and not sporulated anaerobic (Yabuuchi et al., 1992), which can be transmitted to humans, and his agent used as a biological weapon (Ulrich, et al, 2006). Reemerging disease in Brazil since 1999, has been the subject of discussion regarding the serological diagnosis. Complement Fixation Test (CFT) is recommended in the examination program for control and eradication of glanders by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (BRAZIL, 2004) and the World Organization for Animal Health (OIE) for international trade (OIE 2008) The Objective of this study was to evaluate the results of the Complement Fixation Test using two antigens commercially available and two methods of incubation in sera of horses from a property in Pernambuco.

Key Words: serological diagnosis, *Burkholderia mallei*, equids.

## **1. INTRODUÇÃO**

O mormo é uma doença zoonótica altamente contagiosa e frequentemente fatal, conhecida desde a antiguidade, que acomete principalmente equídeos, mas pode infectar diversas outras espécies animais. É causada 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 pode determinar quadros agudos, mais comuns em asininos e muares, ou crônicos, mais frequente em equídeos, com formas cutânea, pulmonar ou mista, com presença de abscessos nodulares cutâneos, que podem ulcerar, vasos linfáticos cutâneos espessados e endurecidos, com nodulações. Na forma pulmonar pode ocorrer febre alta, diminuição do apetite, tosse, dispneia progressiva e emaciação, ulceração do septo nasal, acompanhada de descarga nasal, inicialmente serosa, tornando-se mucopurulenta a hemorrágica, nódulos nas cavidades nasais e descargas oculares purulentas, com posterior aparecimento de cicatrizes em forma de estrela. A confirmação de diagnóstico de mormo em equídeos, no país, determina a eliminação desses animais, como medida de controle e erradicação da doença. O mormo está presente em diversos países do continente asiático, do oriente médio e de alguns países do continente americano, inclusive no Brasil, determina prejuízo econômico pela eutanásia dos animais e dificulta a comercialização de equídeos, de regiões ou países com mormo endêmico, além da possível repercussão na Saúde Pública, e sua importância por ser agente etiológico de arma biológica (CDC, s.d.; CDC, 2000; SRINIVASAN et al.,2001; ACHA; SZYFRES, 2003; WAAG; DeSHAZER, 2004; GILAD et al., 2007; OIE, 2009).

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 ETIOLOGIA**

O agente etiológico do mormo foi demonstrado pela primeira vez no final do século XVIII por Viborg, como agente comum da forma cutânea e da forma pulmonar (WILKINSON, 1981). Está classificado pelo ID 13373, segundo o Centro Nacional para Informação Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information) (NCBI, 2011), organização norte-americana para informação sobre padronização taxonômica. As diferentes denominações e seus proponentes, de acordo com o NCBI,

foram "Bacillus mallei" Zopf 1885, "Pfeifferella mallei" (Zopf 1885) Buchanan 1918, "Actinobacillus mallei" (Zopf 1885) Thompson 1933, "Malleomyces mallei" (Zopf 1885) Pribram 1933, "Loefferella mallei" (Zopf 1885) Holden 1935, "Acinetobacter mallei" (Zopf 1885) Steel and Cowan 1964, *Pseudomonas mallei* (Zopf 1885) Redfearn et al. 1966 (Approved Lists 1980) e *Burkholderia mallei* (Zopf 1885), prevalecendo atualmente a denominação proposta por Yabuuchi et al. (1992). Na nomenclatura é considerada uma proteobactéria, do grupo betaproteobactéria, da ordem *Burkholderiales*, família *Burkholderiaceae*, gênero *Burkholderia*, espécie *Burkholderia mallei* (*B.mallei*) (NCBI, 2011).

*Burkholderia mallei* é um bacilo Gram-negativo, com extremidades arredondadas, medindo de 2 a 5µm de largura e 0,3 a 0,5µm de largura, aeróbio, não esporulado e imóvel. Cora fracamente com derivados de anilina e fortemente com corantes contendo hidróxido de potássio ou ácido fênico, como o azul de metileno de Loeffler e a fucsina fenicada (MOTA et al., 2005; SILVA et al., 2009).

O agente do mormo pode ser cultivado em agar sangue, produzindo colônias não-hemolíticas e coloração ligeiramente acinzentada, após 48 horas de incubação a 37°C; em agar batata glicerinada produz pigmento amarelado, dando aspecto de mel à colônia, adquirindo coloração achocolatada após 48 horas de incubação a 37°C; agar PC, que contém cristal violeta, sais biliares, ticarcilina e polimixina B, permite crescimento de *B. mallei*, que modifica a coloração do meio para rosa, produzindo colônias circulares, lisas, brancas ou translúcidas, menores de 1 mm, e em agar Lennox LB com 4% de glicerol. Não existe meio seletivo comercial específico para o cultivo do bacilo do mormo, e alguns meios de cultura, como agar Ashdown e BSCA, não permitem o crescimento do agente (MOTA et al., 2000; ROMERO et al., 2006; GLASS et al., 2009; SILVA et al., 2009).

As provas bioquímicas são utilizadas para caracterizar as bactérias. A *B. mallei* é oxidase e catalase-positiva, reduz nitrato, hidrolisa a ureia, descarboxilisa a lisina e fermenta a glicose, sendo negativa para a produção de H<sub>2</sub>S, indol, não utiliza citrato e não fermenta maltose, lactose, manose e manitol, além de não reagirem ao VM e VP (AL-ANI et al., 1998; SILVA et al., 2009).

O bacilo do mormo é sensível à dessecação, luz solar, irradiação ultravioleta, ao calor, sendo destruído em 10 minutos ao aquecimento a 55°C, a diversos desinfetantes comuns, como desinfetantes à base de iodo, cloreto de mercúrio em álcool, permanganato de potássio, hipoclorito de sódio na concentração de 500ppm, etanol a

70% e glutaraldeído a 2%. Pode permanecer viável, pelo menos por um mês, em água de reservatório,

e condições de umidade favorecem sua sobrevivência (BEER, 1988; OIE, 2009). Os polissacarídeos capsulares são elementos que favorecem a resistência ao meio ambiente, sendo também um fator de virulência do micro-organismo (HIRSH; ZEE, 2003; OIE, 2009).

Na última década, muitas pesquisas publicadas tratam da caracterização genética e molecular da *B. mallei*, visando principalmente aumentar o conhecimento sobre a virulência e antigenicidade, para melhor compreensão da patogenia, aprimorar métodos de diagnóstico, elaboração de vacina eficaz e possibilidade de orientar tratamento, especialmente após o Centro para Controle e Prevenção de Doença (CDC) dos Estados Unidos da América ter classificado a bactéria na categoria B de arma de bioterrorismo, subsidiada por trabalhos que verificaram essa possibilidade (CDC, s.d.; WAAG; DeSHAZER, 2004; CHANTRATITA et al., 2006; GILAD et al., 2007).

*B.mallei* e *Burkholderia pseudomallei* são filogeneticamente muito similares, com sequências DNA 16S ribossomal quase idênticas (THIBAUT; VALADE; VIDAL, 2004). Há evidências moleculares que a *B. mallei* evoluiu após introdução no hospedeiro animal, com expansões de sequências de inserção (IS), eliminação de profago, rearranjo e redução do genoma por recombinação homóloga (NIERMAN et al., 2004; CHANTRATITA et al., 2006; LOSADA et al., 2010). A expansão maciça de elementos IS, como ISBma1, ISBma2 e IS407A ocorrem durante evolução da bactéria, e essa intervenção IS pode representar um componente chave de um mecanismo geral para evolução no hospedeiro suscetível, mediando deleção e rearranjos genômicos, sem afetar os padrões de expressão do gene original, podendo porém contribuir na variação da virulência observada entre amostras (LOSADA et al., 2010; SONG et al., 2010).

Através de estudo genético da *B. mallei* foram identificados dois cromossomos circulares (WHITLOCK; MARK ESTES; TORRES, 2007), com uma coleção de 650 genes relacionados à virulência, dentre eles os genes T3SS, CAP, sistema de secreção tipo III e sistema T6S (SCHELL; LIPSCOMB; DeSHAZER, 2008). Os genes variáveis são encontrados principalmente nas regiões contínuas flanqueadas por inserções sequenciais, que parecem mediar excisão e subsequente eliminação de genes que estão sob seleção reduzida no hospedeiro mamífero, sugerindo que a bactéria continua a evoluir através de eventos de combinação ao acaso mediados por IS, e a variação em sequências repetidas nos genes chaves pode determinar geração de variantes antigênicas

que podem inabilitar o hospedeiro suscetível para resposta imune adaptativa durável à infecção (NIERMAN et al., 2004; SCHELL; LIPSCOMB; DeSHAZER, 2008; LOSADA et al., 2010).

A cápsula polissacarídea da *B. mallei* é fator chave de virulência, e o gene *wcbF* é essencial para a produção do polissacarídeo capsular (WHITLOCK; MARK ESTES; TORRES, 2007), embora um grupo de outros genes também possam induzir a produção da cápsula (DeSHAZER et al., 2001).

Foi verificada variação no genoma após passagem da amostra de *B. mallei* ATCC 23344 em hospedeiro animal, gerando uma população bacteriana contendo genes que acumularam variação na sequência genômica de SSR e outros *loci*, não detectada em amostra mantida apenas em meio de cultura (MONASTYRSKAYA et al., 2004; FUSHAN et al., 2005; ROMERO et al., 2006; IIHARA et al., 2007), este fato pode justificar a variedade genética e molecular observada em amostras analisadas tanto no Paquistão (HOMSTRA et al., 2009), como no Brasil, confirmando a grande variabilidade intra e interespecies de *B. mallei* e *B. pseudomallei*, podendo essas diferenças serem úteis como assinatura molecular para identificação de cepas do agente do mormo (SILVA et al., 2009).

## 2.2 EPIDEMIOLOGIA

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

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

Atualmente, o mormo continua a ser relatado no Brasil, China, Índia, Irã, Iraque, Paquistão, Turquia e Emirados Árabes Unidos. A doença é considerada endêmica em

várias áreas do Oriente Médio, Ásia, África e América do Sul, embora a distribuição geográfica determinada através de pesquisas sorológicas para *B. mallei* seja complicada pelas reações cruzadas com *B. pseudomallei* (OIE, 2009).

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em 1811 e sua introdução provavelmente ocorreu pela importação de animais infectados da Europa (PIMENTEL, 1938). No período entre 1968 e 2000 não houve registro oficial da doença em território brasileiro, sendo considerada extinta pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (ITO et al., 2008). Em 2000, foi relatado (MOTA et al.) diagnóstico de mormo em equinos dos estados de Alagoas e Pernambuco, surgindo polêmica se houve uma re-emergência da doença ou se, anteriormente, houve falhas no diagnóstico. Após o diagnóstico do mormo nos Estados de Pernambuco e Alagoas foi observado que a doença ocorria em animais utilizados no trabalho da zona da mata dos dois estados, e em cavalos que participavam de vaquejadas e cavalgadas (MANSO FILHO et al., 2000). A partir dessa constatação a ocorrência de mormo no Brasil foi alta e continuada em alguns estados, de acordo com as notificações à OIE no período de 1999 a 2004 (OIE, 2011c), constantes no Quadro 1, e os dados da ocorrência de mormo, por estado, no período de 2005 a 2011 são apresentados no Quadro 2 (OIE, 2011c).

QUADRO 1. Focos e casos de mormo, no Brasil, com número de mortos e destruídos, notificados à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2011c) no período de 1999 a 2011.

ANO	FOCOS	CASOS	MORTOS	DESTRUIDOS
1999	03	07	0	07
2000	15	51	0	51
2001	57	484	0	481
2002	63	267	10	79
2003	24	36	0	36
2004	46	62	0	31
2005	34	55	0	42
2006	24	29	0	15
2007	32	34	13	25
2008	49	78	0	56
2009	34	161	0	152
2010	30	87	0	43
2011	17	40	01	35

Dados disponíveis em: [web.oie.int/hs2/sit\\_pays\\_mald\\_pl.asp?c\\_pays=26&c\\_mald=67](http://web.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=26&c_mald=67)

QUADRO 2. Ocorrência de mormo em estados brasileiros, no período de 2005 a 2011, notificados à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2011c).

ESTADO	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Alagoas	06	05	02	03	-	-	01
Pernambuco	09	08	07	10	17	16	29
Paraíba	03	07	13	15	11	07	05
R.Gde.Norte	09	-	05	16	03	04	02
Ceará	03	04	01	-	02	03	-
Piauí	01	-	-	-	-	-	-
Maranhão	-	-	01	-	-	-	-
Sergipe	-	-	-	-	-	02	-
Pará	01	-	01	03	-	-	02
Amazonas	02	-	-	-	-	-	01
São Paulo	-	-	-	02	-	-	-
Distrito Federal	-	-	-	-	01	-	-
TOTAL	34	24	30	49	34	29	-

Dados disponíveis em: [web.oie.int/hs2/sit\\_pays\\_mald\\_pl.asp?c\\_pays=26&c\\_mald=67](http://web.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=26&c_mald=67)

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

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

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

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

### **2.3 PATOGÊNESE**

A patogênese do mormo ainda é pouco conhecida, havendo poucos trabalhos sobre os mecanismos de atuação da *B. mallei* no organismo animal e a reação do hospedeiro ao agente infeccioso. A descoberta de mecanismos moleculares

determinados pela persistência do bacilo no hospedeiro e a indução de imunidade são importantes para programas que visem ações terapêuticas e produção de vacinas eficazes (LARSEN; JOHNSON, 2009).

As principais portas de entrada da *B. mallei* são os sistemas respiratório e digestório. Ao penetrar no sistema digestório, o agente atravessa a barreira da mucosa intestinal, atingindo posteriormente a corrente sanguínea, determinando septicemia, dirigindo-se e colonizando-se nos pulmões, pele e mucosas, podendo disseminar para o sistema linfático. A localização pulmonar do bacilo pode ocorrer através da via sanguínea ou através da penetração pelo sistema respiratório (MOTA, 2006).

Na porta de entrada, especialmente na faringe, formam-se lesões primárias, e a partir desse ponto a bactéria pode atingir o sistema linfático produzindo lesões nodulares. Estas mesmas lesões primárias podem ocorrer no septo nasal, tendo origem hematogênica, ou podem ser secundárias a foco pulmonar (PRITCHARD, 1995; SHARRER, 1995; HIRSH; ZEE, 2003).

A *B. mallei* é um patógeno intracelular facultativo, que pode sobreviver e replicar em linhagens de células fagocíticas (ROWLAND et al., 2006; WHITLOCK et al., 2009). Infecção experimental de camundongos BALB/c com *B. mallei*, por via intranasal, revelou a persistência da bactéria na porção inferior do sistema respiratório. O bacilo tem capacidade de penetrar em macrófagos alveolares, possivelmente esta penetração é mediada pelo receptor Fc do complemento, este é um mecanismo de escape celular da bactéria, permanecendo nos macrófagos alveolares livre da atuação dos mecanismos imunes inatos, atuando também na disseminação do bacilo, permitindo sua entrada no leito capilar do interstício pulmonar, possibilitando o agente atingir os linfonodos regionais (WHITLOCK et al., 2009). Com a disseminação o micro-organismo pode sobreviver e replicar nos macrófagos peritoniais, e desta forma ajudar na manutenção do agente no baço (WHITLOCK et al., 2009).

Através da avaliação pela tecnologia de imagem luminescente, foi verificado que camundongos infectados por via nasal apresentavam luminescência inicialmente nos pulmões, progredindo para o fígado e baço, em um período de até 72 horas após a infecção (MASSEY et al., 2011). Utilizando a técnica real-time PCR, Ulrich et al. (2005), também inoculando *B. mallei* em camundongos BALB/c, por meio de aerossol, obtiveram resultados positivos nos pulmões, uma hora após a infecção, e após 24 horas da infecção, no baço e fígado. Estes dados comprovam a rápida disseminação do agente

do mormo no organismo de camundongos após infecção aerógena, podendo-se supor que o mesmo possa ocorrer em outras espécies animais.

Para que haja penetração de um agente infeccioso na célula hospedeira há a necessidade de adsorção a receptores ou aderência à superfície celular. Não existem pesquisas publicadas relatando presença de receptores celulares para a *B. mallei*. Uma grande e diversa família de proteínas secretadas por bactérias Gram negativas foi denominada de autotransportadoras (AT). As AT tem diferentes papéis e muitas dessas proteínas influenciam na patogênese e imunidade, por exemplo mediando interação entre a bactéria e a célula hospedeira, agindo como invasinas, adesinas, proteases e fatores actina-nucleantes (LAZAR ADLER et al., 2011).

A motilidade intracelular das *Burkholderias* depende da polimerização da actina, que possibilita o movimento dentro e entre as células hospedeiras (STEVENS et al., 2005), contribuindo para a disseminação no organismo animal e na sobrevivência intracelular da bactéria (WHITLOCK et al., 2009), embora saiba-se pouco sobre esses mecanismos.

Mutações polares na *B. mallei* geram sistema de secreção tipo III (SST), que consiste em um sistema de entrega de proteína bacteriana necessária para o crescimento intracelular do bacilo em algumas células, induz formação de protrusões na membrana do macrófago, polimerização da actina e escape fagossomal (WHITLOCK; MARK ESTES; TORRES, 2007). O SST, como a actina, tem papel no tráfego intracelular e também pode facilitar a disseminação célula-célula, via motilidade baseada na actina. Nas bactérias Gram negativas o SST tem função de translocar proteínas efetoras bacterianas diretamente da célula hospedeira, permitindo ao patógeno bacteriano evadir ou alterar as defesas do hospedeiro, sendo esse sistema essencial para a virulência da *B. mallei* em camundongos BALB/c e hamster sírios, para a sobrevivência intracelularmente em culturas celulares (RIBOT; ULRICH, 2006).

O controle da produção de interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) **é crucial na regulação das** respostas imunes mediadas por células (SANTANIRAND et al., 1999). Em infecção experimental em camundongos foi observado que a *B. mallei* induz uma rápida e intensa produção de IFN $\gamma$  **no baço e, sistemicamente, verificada** pelos níveis séricos, a partir de cinco horas após a infecção, com pico em 24 horas após a infecção, havendo ainda aumento nos níveis de citocinas, em especial de interleucina-6 (IL-6), IL-12, IL-18, IL-27 e proteína-1 quimioatrativa de monócitos (MCP-1), sendo estas respostas importantes na defesa do organismo contra a infecção (ROWLAND et al., 2006).

Para a indução da produção de IFN $\gamma$  à infecção por *B. mallei* é crítica a atuação da IL-12, havendo também o envolvimento da IL-18 nesta indução (ROWLAND et al., 2006). A produção de IFN $\gamma$  e da IL-12 sofrem interferência da MCP-1 e de seu receptor CCR-2, tendo sido observado por Goodyear et al. (2010) que níveis de MCP-1 aumentam rapidamente na corrente sanguínea de camundongos após infecção intranasal, seguindo-se aumento desta quimiocina nos pulmões e no baço 24 horas após a infecção, e que camundongos isentos de MCP-1 e CCR-2 tinham impedimento marcante na sua habilidade para produzir IFN $\gamma$  e animais isentos de CCR-2 tinham produção de IL-12 diminuída nos pulmões.

As principais fontes de IFN $\gamma$  identificadas *in vitro*, nas infecções por *B. mallei*, são as células NK, Células T CD8 $^+$  e TCR $\gamma\delta$  (ROWLAND et al., 2006). Neutrófilos e macrófagos também influenciam esta resposta da imunidade inata, sendo necessários para controlar a rápida e precoce resposta orgânica à infecção, enquanto células T são importantes nos estágios posteriores da infecção (ROWLAND et al., 2010).

## 2.4 PATOLOGIA

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

Com a disseminação do agente etiológico e a resposta do organismo animal, as lesões são observadas em diversos órgãos e tecidos. À necropsia, podem ser observados abscessos cutâneos, com conteúdo purulento amarelo cremoso, aumento de volume e abscedação dos linfonodos, aumento de volume dos vasos linfáticos superficiais e ulcerações cutâneas, principalmente nos membros (SANTOS et al., 2001).

Na porção posterior do sistema respiratório e na cavidade torácica podem ser visualizadas áreas de inflamação proliferativa (SANTOS et al., 2001), hemorragias petequiais e equimóticas na pleura visceral e abscessos, que podem ser múltiplos

(MOTA et al., 2000), pleurite fibrinosa, com aderência entre os folhetos da pleura e espessamento da pleura visceral (SANTOS et al., 2001). Nos pulmões podem ocorrer pneumonia lobar e presença de abscessos isolados ou confluentes, dando aspecto de caverna, pequenos nódulos avermelhados, com área central acinzentada (SANTOS et al., 2001) e piogranulomas nos pulmões (MOTA et al., 2000), e em casos crônicos áreas de carnificação pulmonar (SANTOS et al., 2001).

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

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

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

Nos pulmões podem ser observados moderada a acentuada congestão, pequenos focos de hemorragia, presença de edema e fibrina, com localização interlobular e intra-alveolar, presença de piogranulomas, com área central necrótica, debris celulares e neutrófilos degenerados, circundados de macrófagos, células epitelióides e células gigantes, infiltrados no tecido de granulação, havendo ainda exsudato fibrinoso e

estroma conjuntivo e perifericamente edema (MOTA et al., 2000; SANTOS et al., 2001; HIRSH; ZEE, 2003).

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

## 2.5 SINTOMATOLOGIA

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

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

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

Em equinos, além da febre alta, podem ocorrer sintomas respiratórios incluindo narinas inchadas, presença de úlceras necróticas e nódulos nas passagens nasais, descarga nasal espessa, dispnéia inspiratória, tosse, sinais de pneumonia, e aumento de volume dos linfonodos das regiões do pescoço, principalmente dos linfonodos submaxilares que comumente estão edemaciados e doloridos, e da região mediastínica, e espessamento dos vasos linfáticos da face (SANTOS et al., 2001, ITO et al. 2008, LARSEN; JOHNSON, 2009)..Às vezes pode ser observado apenas edema no peito e o órbita ocorrer em poucos dias (SANTOS et al., 2001, ITO et al. 2008, LARSEN; JOHNSON, 2009).

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

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

A forma crônica do mormo é a forma mais comumente verificada em equinos, podendo apresentar sinais e sintomas variados, dependendo da via de infecção (WHITLOCK; MARK ESTES; TORRES, 2007), como as formas nasal, pulmonar e cutânea, podendo coexistir em um mesmo animal mais de uma forma (SANTOS et al., 2001; ITO, et al., 2008). Podem ser observados sinais de pneumonia com tosse,

respiração ruidosa, epistaxe, dispneia e estertores pulmonares; lesões no septo nasal, que se iniciam com nódulos e evoluem para úlceras, no processo de cicatrização formam cicatrizes em forma de estrelas; no início há uma secreção nasal serosa que evolui para purulenta com estrias de sangue. Podem ocorrer, também, nódulos elevados de consistência firme a flácida na pele, que drenam secreção purulenta amarelada, e com a evolução da doença, emagrecimento progressivo (PRITCHARD, 1995; SHARRER, 1995; AL-ANI et al., 1998; MOTA et al., 2000; MOTA, 2006). Outros animais, na fase inicial da doença, podem apresentar apenas semiflexão e abdução lateral do membro posterior (SANTOS et al., 2001; LARSEN; JOHNSON, 2009).

No mormo nasal, os animais podem apresentar, inicialmente, uma descarga nasal serosa, unilateral, que pode evoluir para purulenta de coloração amarelada a purulento hemorrágico, podendo tornar-se bilateral (SANTOS et al., 2001; ITO et al. 2008). Pode ocorrer a perfuração nasal, e os nódulos linfáticos submaxilares podem tornar-se aumentados e endurecidos; muitos podem supurar e drenar e as úlceras cicatrizadas adquirirão a forma estrelada (ITO et al., 2008). Além desses sinais e sintomas, cavalos com a forma crônica do mormo podem apresentar nódulos inflamatórios e úlceras nas passagens nasais, febre intermitente, letargia, perda de peso, dispnéia, diarreia, poliúria (AL-ANI et al., 1998; LARSEN; JOHNSON, 2009); em jumentos e mulas, pode ocorrer também tosse, letargia, perda de peso, além da concomitância de sinais e sintomas das outras formas (LARSEN; JOHNSON, 2009).

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

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

Em muares, criados a campo na Zona da Mata do Estado de Pernambuco, Rabelo et al. (2006) verificaram, em um grupo de 30 animais sorologicamente positivo e com sinais da doença, que os sintomas mais frequentes foram caquexia (70%), hipertrofia dos linfonodos submandibulares (70%), descarga nasal purulenta (66,67%), estertores respiratórios (66,33%), apatia (53,33%), edema de membros (53,33%). No grupo sorológico positivo, mas considerado pelos autores com ausência de sinais de mormo, foram observados, com maior frequência percentual, artrite (93,33%), edema peitoral (90,00%), edema de prepúcio (83,33%), nódulos nos vasos linfáticos (80,00%), taquipnéia (80,00%), abscesso subcutâneo (76,67%), hipertermia, claudicação, dispneia e úlcera nasal com frequência de 70%, hiperemia das mucosas e cicatriz em forma de estrela na mucosa nasal em 63,33% dos animais do grupo e hiperemia da mucosa nasal (53,33%). Observa-se, que apesar de não serem sugestivos, os sinais e sintomas observados pelos autores constam das possíveis alterações que podem ser observadas no mormo. Em mulas podem ocorrer lesões cutâneas, por longo tempo, aumento de volume e nódulos, na porção medial do jarrete e abdômen, úlceras que eliminam secreção purulenta com consistência de mel e coloração escura (MANSO FILHO et al., 2000).

Análises clínicas laboratoriais foram pouco estudadas em cavalos com mormo. Alterações hematológicas em muares foram descritas por Rabelo (2003), detectando, no grupo sorologicamente positivo e com sintomas da doença, valores significativamente menores do hematócrito, hemoglobina, volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média, e o leucograma desse grupo revelou aumento significativo nos valores médios de leucócitos, bastonetes, neutrófilos segmentados, e diminuição significativa dos valores médios de eosinófilos e de linfócitos. Na avaliação clínica de muares com mormo podem se detectadas diferenças significativas das taxas bioquímicas séricas de proteína total, albumina, alanina amino transferase, aspartato amino transferase, desidrogenase láctica, fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, creatina quinase, bilirrubina e frações, uréia e creatinina entre os grupos de animais sorologicamente negativos, de animais sorologicamente positivos, com e sem alterações clínicas sugestivas de mormo (RABELO et al., 2006). O proteinograma sérico de muares naturalmente infectados pela *B. mallei* pode apresentar aumento significativo do nível de proteína total, de  $\alpha$ -globulinas,  $\beta$ 2-globulinas e  $\gamma$ -globulinas, e diminuição significativa da relação albumina/globulina (MOTA et al., 2007).

Os equídeos podem sofrer infecção latente, apresentando descarga nasal, ocasionalmente respiração laboriosa e lesões pulmonares (ITO et al. 2008; LARSEN; JOHNSON, 2009).

## 2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico do mormo deve estar baseado nas observações das alterações clínicas, patológicas, dos dados epidemiológicos, da identificação do agente bacteriano, através de isolamento ou caracterização por métodos moleculares, de reação imunoalérgica e testes sorológicos (MOTA , 2006; AL-ANI & ROBERSON, 2007 ).

O exame clínico raramente possibilita um diagnóstico seguro, os sinais clínicos do mormo podem estar ausentes ou pouco desenvolvidos, principalmente na evolução crônica, frequente em cavalos. Na forma aguda do mormo deve-se levar em consideração para o diagnóstico clínico ocorrência de febre, dispneia, tosse e sinais de pneumonia, ulceração do septo nasal, descarga nasal mucopurulenta a hemorrágica, aumento de volume dos linfonodos das regiões do pescoço e do mediastino, espessamento dos vasos linfáticos e nódulos, úlceras e abscessos cutâneos (AL-ANI et al., 1998; SANTOS et al., 2001; WHITLOCK; MARK ESTES; TORRES, 2007, ITO et al. 2008; LARSEN; JOHNSON, 2009).

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

O isolamento de bacilo Gram-negativo, com extremidades arredondadas, medindo de 2 a 5µm de largura e 0,3 a 0,5µm de largura, aeróbio, não esporulado e imóvel (MOTA et al., 2005; SILVA et al., 2009; SPRAGUE et al., 2009), em vários meios de cultura, especialmente meios com adição de sangue de carneiro ou glicerol (MOTA et al., 2000; MOTA et al., 2005; ROMERO et al., 2006; GLASS et al., 2009; SILVA et al., 2009; WERNERY et al., 2011) (Figura 1), sua caracterização bioquímica, com reação positiva a oxidase e catalase, redução de nitrato, hidrólise de ureia, descarboxilação da lisina e fermentação da glicose, com reação negativa para a produção de H<sub>2</sub>S, indol, não utilização de citrato e não fermentação de maltose, lactose, manose e manitol, e reação negativa ao VM e VP (AL-ANI et al., 1998; SILVA et al., 2009; MOTA et al., 2010; WERNERY et al., 2011), e a prova de inoculação em animais de experimentação, especialmente em cobaios, produzindo prova de Strauss

positiva, constituem-se no método clássico e irrefutável de diagnóstico do mormo (MOTA et al., 2000; SILVA et al., 2005; GLASS et al., 2009).

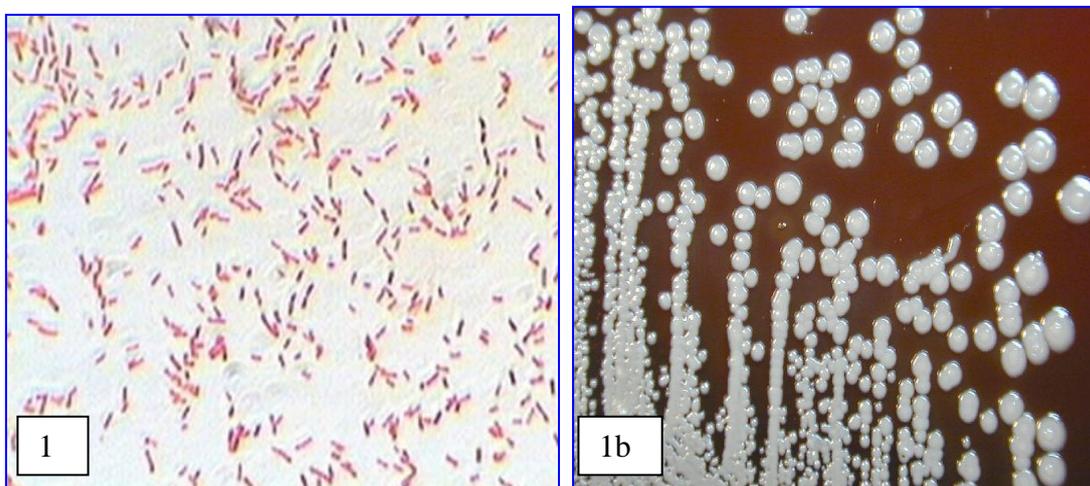


Figura 1: Isolamento da *Burkholderia mallei*. 1a –Teste de Gram; 1b – Crescimento em Agar sangue com glicerol 1%

Fonte: Arquivo pessoal

A utilização de ferramentas de investigação molecular na identificação da bactéria, após isolamento em meio de cultura ou em material clínico, tem sido investigada nas últimas décadas. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é um método de amplificação de ácidos nucleicos (DNA ou RNA), utilizando métodos de replicação *in vitro*. Variações na metodologia da PCR têm sido utilizadas na identificação da *Burkholderia mallei* em materiais biológicos e em culturas da bactéria, como a reação da transcriptase reversa na reação em cadeia da polimerase (RT-PCR), real-time RT-PCR, também denominada de reação cinética em cadeia da polimerase (KPCR), que amplifica e, simultaneamente, quantifica a molécula nucleica alvo, para uma ou mais sequências específicas, TaqMan RT-PCR, que utiliza sondas com dois tipos de substâncias fluorescentes, entre outras metodologias (TOMASO et al., 2006. LRICH et al., 2006a; ULRICH et al., 2006b).

*B. mallei*, na concentração de  $10^2$  células/mL em sangue ou em cultura de sangue, pode ser detectada pela técnica de PCR diretamente ou por hibridação com sonda (LEW; DESMARCHELIER, 1994). O sequenciamento do gene 16S ribossomal provê uma base para rápida identificação da bactéria e sua diferenciação com *B. pseudomallei* (GEE et al., 2003), que pode ser usado simultaneamente com a avaliação do gene flagelar *fliC*, através de real time PCR (TOMASO et al., 2004), ou por sondas

de hibridação fluorescente, que apresenta alta especificidade e valor preditivo de positividade e negatividade de 100% (TOMASO et al., 2005). O sequenciamento do DNA do gene 16S e PCR de fragmento amplificado com polimorfismo foram validados pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas americana para identificação da *B. mallei* e outros agentes patogênicos (JONES et al., 2005).

Outros alvos, como o gene *fliP*, foi pesquisado pela técnica real-time PCR, específico para 5'-nuclease ou para amplificação de fragmento de 989 bp de 20 amostras de *B. mallei*, os produtos de amplificação foram observados em todas as amostras de *B. mallei*, mas não em outras bactérias, demonstrando que a técnica permite identificação específica do agente do mormo, com aplicabilidade em amostras de vários tecidos de cavalos com infecção generalizada e possibilidade de automação, constituindo-se em ferramenta simples e rápida, com detecção específica e sensível (SCHOLZ et al., 2006; TOMASO et al., 2006). Através da aproximação *in silico* e utilizando cinco alvos cromossômicos, somente primer para o gene *bimA(ma)* foi específico para *B. mallei* na PCR (ULRICH et al., 2006b), detectando o bacilo em pulmão, baço e fígado de camundongos BALB/c infectados, com limite relativo de detecção no ensaio de 1 pg ou 424 genoma equivalentes, demonstrando a possibilidade de utilização deste teste em material clínico (ULRICH et al., 2006a).

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), contraímuno eletroforese (CIEF), imunoadsorção 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 técnicas conhecidas (NAUREEN et al., 2007; SPRAGUE et al., 2009; ELSCHNER et al., 2011). Na atualidade todos os testes sorológicos utilizados no diagnóstico do mormo apresentam problema devido à inadequada sensibilidade e especificidade dos antígenos utilizados nos testes, geralmente representados por preparações produzidas com células bacterianas inteiras, ocasionando reações falso positivas ou falso negativas (NEUBAUER et al., 2005; SPRAGUE et al., 2009).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Instrução Normativa nº 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). O teste de FC também é recomendado para o diagnóstico do

mormo pela OIE (OIE, 2011d). A coleta e remessa de material para diagnóstico devem ser realizadas por médico veterinário oficial ou cadastrado, enviando o material para o Laboratório Nacional Agropecuário em Pernambuco (LANAGRO-PE) ou laboratório credenciado pelo MAPA.

O teste de FC é confiável em populações equinas com baixa prevalência de mormo, sendo o teste de eleição para testar cavalos para ausência de infecção por *B. mallei* (SPRAGUE et al., 2009) (Figura 2). A sensibilidade do teste de FC é de pelo menos 97%, com resultados inespecíficos, falsos positivos, devido a reações cruzadas que podem ocorrer em cavalos com garrotilho, influenza equina e febre petequial, não sendo possível sua realização em soros com atividade anticomplementar e em soros hemolisados, resultados falso negativos podem ocorrer em animais emaciados e cronicamente debilitados (ELSCHNER et al., 2011).

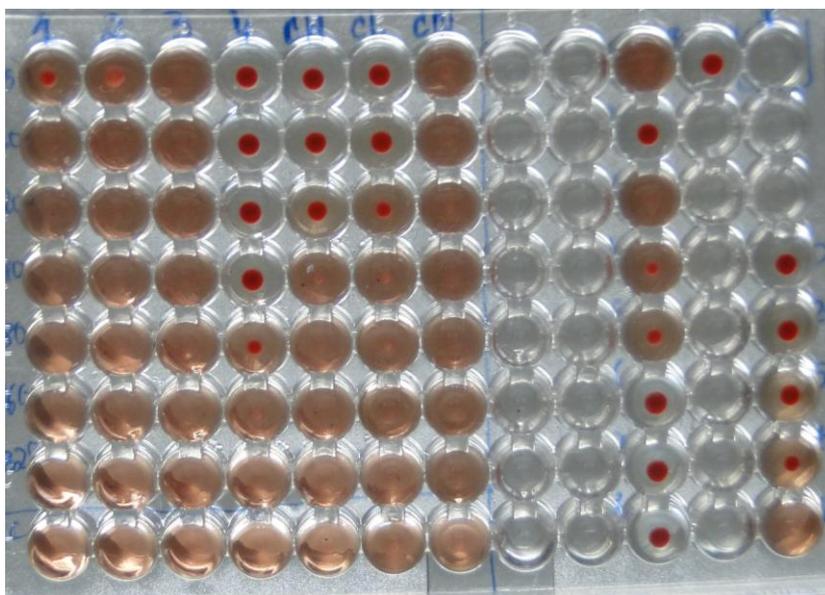


Figura 2: Reação de Fixação do Complemento

Fonte: Arquivo Pessoal

O resultado do teste de FC pode diferir dependendo do antígeno utilizado, como foi verificado por Khan et al. (2011) que obtiveram 100% e 99,39% de sensibilidade com antígenos produzidos na Alemanha, respectivamente antígenos CIDC e c.c.pro e 62,19%, com antígeno produzido nos Estados Unidos, a especificidade foi de 97,5%, 96,5% e 100,0%, respectivamente com esses três antígenos e valores preditivos positivo e negativo, de 97,04 e 100,00, 95,88 e 99,48 e 100,00 e 76,33, respectivamente, com os antígenos CIDC, c.c.pro e americano. Em dez casos de cavalos suspeitos de infecção pela *B. mallei*, 10% apresentaram resultado duvidoso e 90% foram negativos no teste de

FC realizado com antígeno c.c.Pro, e reação positiva em 30% dos casos, sem nenhum resultado duvidoso, com a utilização de antígeno produzido com a amostra Dubai7 (SPRAGUE et al., 2009). Estes resultados levantam a possibilidade de resultados divergentes, pela metodologia de produção do antígeno e pelas características moleculares e genéticas das amostras utilizadas na produção do antígeno, que podem diferir entre regiões ou países (HOMSTRA et al., 2009; SILVA, et al., 2009).

Estudos comparativos entre os testes sorológicos utilizados no diagnóstico do mormo indicam concordância de 70%, com valor *kappa* de 0,44 entre FC e ELISA competitivo (cELISA), com especificidade de 98,9% no cELISA para *B. mallei* (KATZ; DEWALD; NICHOLSON, 2000). Entretanto, Sprague et al. (2009) compararam o teste de FC e cELISA, verificando que ambos os testes tem especificidade e sensibilidade semelhantes, podendo haver problema de falso negativos em soros equinos com atividade anticomplementar ou hemolisados na FC, recomendando este teste para verificar ausência de mormo em cavalos, e possibilidade de falso positivos, pela presença de tampões lipêmicos, no cELISA, que tem a vantagem de poder ser automatizado, não havendo interferência de fatores anticomplementares, nem hemólise no soro.

Um estudo comparativo entre os testes de FC, reação de aglutinação com antígeno corado pelo rosa bengala (RB), CIET modificada e HAI, e teste alérgico com maleína, em animais com cultura positiva para *B. mallei*, verificou que o CIET modificado teve 100% de especificidade, em soros de animais negativos, quanto à sensibilidade dos testes detectou 90,0% no RB, 97,1% no teste de IHA, 91,4% no teste de FC, 81,4% no CIET modificado e 75,7% no teste alérgico com maleína. Não ocorreram falsos negativos com os testes de FC, IHA e RB, houve presença de falsos negativos no CIET modificado. Foram observadas reações cruzadas com anticorpos anti *B. pseudomallei* no teste com RB, sendo este fato importante em regiões com melioidose endêmica. Os valores preditivos positivos e negativos foram de 100 e 94 para RB, 100 e 98,2 para IHA, 100 e 96,7 para FC, 100 e 86,6 na maleinização e 90,5 e 88,6 para CIET modificado. A habilidade para identificar com exatidão casos positivos e negativos determinou os valores de acuidade de 98,8% para IHA, 96,9% para FC, 96,1% para RB, 90,6% para maleinização e 89,4% para CIET modificado (NAUREEN et al., 2007).

Com o objetivo de evitar falsos resultados observados com a utilização de antígeno com célula bacteriana inteira, foi elaborado um antígeno com

lipopolissacarídeos de *B. mallei* utilizado no teste de WB, que demonstrou especificidade maior que o teste de FC, porém com menor sensibilidade, tendo ocorrido ainda reação cruzada com anticorpos anti-*B. pseudomallei*, com o indicativo de ser utilizado como teste confirmatório para o diagnóstico de mormo (ELSCHNER et al., 2011). Com o mesmo objetivo foi elaborado um antígeno com proteína A de motilidade intracelular recombinante em *Escherichia coli*, usado em formato de ELISA indireto, com resultado de 100% de sensibilidade e 98,88% de especificidade, não havendo reação cruzada com *B. pseudomallei* (KUMAR et al., 2011).

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

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

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

O teste oftálmico é menos confiável que o teste intradermo-palpebral. Uma gota de PPD maleína é instilada no canto interno de um dos olhos. Em animais positivos para o mormo há edema palpebral, e às vezes na parte lateral da face, podendo ocorrer descarga ocular. No olho oposto podem ocorrer as mesmas alterações em menor grau (OIE, 2008). O teste cutâneo é realizado na porção média do pescoço, em área depilada e desinfetada, injetando-se 2,5mL de maleína diluída, via subcutânea, no centro da área.

O resultado positivo ocasiona aumento de temperatura corporal de 40<sup>0</sup>C ou mais, nas primeiras 15 horas, com formação de elevação edematosa dolorida no local em 24 horas. Animais negativos apresentam alterações mínimas, com edema local transitório, reações duvidosas devem ser repetidas após 14 dias, usando o dobro da dose de maleína (OIE, 2008). Estes dois modos de aplicação da maleína não estão contemplados na Instrução Normativa 24 do MAPA (BRASIL, 2004).

O mormo deve ser diferenciado de garrotilho, linfangite ulcerativa (SANTOS et al., 2001; AL-ANI; ROBERSON, 2007; OIE, 2008), linfangite epizoótica, esporotricose (SANTOS et al., 2001; AL-ANI; ROBERSON, 2007), tuberculose (SANTOS et al., 2001; OIE, 2008), rinosporidiose (SANTOS et al., 2001), melioidiose (AL-ANI; ROBERSON, 2007), botriomicose, varíola equina, trauma e alergia (OIE, 2008).

## **2.7 TRATAMENTO**

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

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

Resultados *in vitro* e *in vivo* verificaram sensibilidade da *B. mallei* a ceftazidime (HEINE et al., 2001; THIBAUT et al., 2004; GILAD et al., 2007; JUDY et al., 2009), cefotaxime (GILAD et al., 2007), ciprofloxacina (HEINE et al., 2001), cloranfenicol (THIBAUT et al., 2004; MOTA et al., 2005; GILAD et al., 2007; NAUREEN et al., 2010; SAQIB et al., 2010), co-trimoxazole (SAQIB et al., 2010), doxicilina (RUSSELL et al., 2000; HEINE et al., 2001; THIBAUT et al., 2004; NAUREEN et al., 2010; SAQIB et al., 2010), enrofloxacin (SAQIB et al., 2010), gentamicina (MOTA et al., 2005; NAUREEN et al., 2010; SAQIB et al., 2010), imipenem (HEINE et al., 2001; THIBAUT et al., 2004; GILAD et al., 2007), levofloxacin (JUDY et al., 2009), minociclina (THIBAUT et al., 2004), netilmicina (MOTA et al., 2005), ofloxacin, piperacilina (HEINE et al., 2001), tetraciclina (MOTA et al., 2005; GILAD et al., 2007), amoxicilina-clavulato (GILAD et al., 2007), piperacilina-tazobactam (THIBAUT et al., 2004; GILAD et al., 2007), trimetoprim-sulfa (MOTA et al., 2005; GILAD et al.,

2007; NAUREEN et al., 2010), co-amoxiclav (THIBAUT et al., 2004), ácido nalidíxico e ácido pipemídico (MOTA et al., 2005). Nos experimentos *in vivo*, o tratamento com antimicrobianos resultou em melhora do quadro clínico, com sobrevivência dos animais no período dos experimentos, porém sem eliminação total do bacilo do mormo (GILAD et al., 2007; JUDY et al., 2009).

O bacilo do mormo é resistente aos aminoglicosídeos (THIBAUT et al., 2004; SAQIB et al., 2010), ampicilina (NAUREEN et al., 2010), amoxicilina (THIBAUT et al., 2004; NAUREEN et al., 2010; SAQIB et al., 2010), ciprofloxacina, co-amoxidav, fluoroquinonas (SAQIB et al., 2010), macrolídeos (HEINE et al., 2001), norfloxacina (THIBAUT et al., 2004; NAUREEN et al., 2010; SAQIB et al., 2010), oxitetraciclina (NAUREEN et al., 2010; SAQIB et al., 2010), aztreonam, ceftiofina, cefoperazona, cefsulodina, eritromicina, ofloxacina, pefloxacina, ticarcilina (THIBAUT et al., 2004), cefradina, cefuroxime, ceftizoxime, ceftriaxome, ceftiofur, roxitromicina (NAUREEN et al., 2010), antibióticos derivados do ácido  $\beta$ -lactâmico, cefalotina, lincosamina, clindamicina, kanamicina, tobramicina e furaltadona (MOTA et al., 2005).

## **2.8 PREVENÇÃO E CONTROLE**

O controle e a prevenção de epizootias de mormo dependem da existência e eficiência de programa de detecção precoce e eliminação de animais positivos, cujas carcaças devem ser incineradas e enterradas, controle estrito de movimentação animal, procedimentos efetivos de quarentena e limpeza e desinfecção das áreas afetadas, alimentos e camas devem ser incinerados e enterrados, e veículos e equipamentos cuidadosamente desinfetados (OIE, 2009).

No Brasil, a vigilância e o controle do mormo em equídeos estão normatizados pelo MAPA, através da IN 24 (BRASIL, 2004), da Secretaria de Defesa Agropecuária, que determina a eliminação de animais com diagnóstico laboratorial positivo para mormo; controle rigoroso de trânsito interestadual, com prova de fixação do complemento negativa, com validade de 60 dias; quarentena e interdição da fazenda com casos diagnosticados sorologicamente. A interdição da propriedade somente será suspensa pelo serviço veterinário oficial, após eutanásia dos animais positivos e realização de dois exames sucessivos de FC de todo plantel, com intervalos de 45 a 90 dias, com resultados negativos. Carcaças de animais contaminados, alimentos e camas das baias, além de todos os materiais descartáveis devem ser queimados e enterrados. Devem ser realizadas limpeza e desinfecção das áreas de focos, com desinfetantes

comuns; veículos e equipamentos, como cabrestos, arreios e outros, também devem ser cuidadosamente lavados e desinfetados, devendo-se evitar baias e cochos coletivos. A aquisição de animais deve ser de áreas livres e com diagnóstico laboratorial negativo para o mormo.

Não há vacina comercializada contra o mormo (GILAD et al., 2007; SARKAR-TYSON et al., 2009). A proteção contra o desafio da infecção pelo bacilo do mormo através da vacinação deve levar em consideração a resposta imune celular, em adição à resposta humoral (BONDI& GOLDBERG, 2008), produção de IFN- $\gamma$  (WHITLOCK; MARK ESTES; TORRES, 2007; WHITLOCK et al., 2009) e TNF- $\alpha$  (WHITLOCK et al., 2007). Um fator complicador para elaboração de vacina eficaz é a capacidade da *B. mallei* penetrar e permanecer viável intracelularmente, em vacúolos de células eucarióticas, tornando-se inacessível a ação de anticorpos, neste contexto a resposta imune celular pode ser crítica para a proteção (BONDI; GOLDBERG, 2008).

As vacinas experimentais elaboradas utilizam três diferentes tecnologias: vacina morta de célula bacteriana inteira, vacina viva atenuada e vacina de subunidade. Amemiya et al. (2002) avaliaram, em camundongos BALB/c, três preparações vacinais produzidas com *B. mallei* morta pelo calor, pela radiação e de amostra mutante cápsula-negativa irradiada. Os animais não resistiram ao desafio com alta dose, por via intraperitoneal. A adição de IL-12 à vacina morta determinou geração de IgG<sub>2a</sub> sérica e proliferação de esplenócitos com aumento de produção de IFN- $\gamma$ , porém com possibilidade de infecção do baço de animais vacinados, após desafio (AMEMIYA et al., 2006; BONDI; GOLDBERG, 2008). Resultado oposto foi obtido por Sarkar-Tyson et al. (2009), com vacina produzida com *B. mallei*, *B. pseudomallei* e *B. thailandensis* inativadas por tratamento térmico, que resultou em alto grau de proteção contra melioidose e mormo.

Vacinas atenuadas foram elaboradas com amostras de *B. mallei* cápsula-negativa e com amostras com cadeia ramificada de amino-ácidos (ULRICH et al., 2005; WHITLOCK; MARK ESTES; TORRES, 2007), camundongos BALB/c foram vacinados, via aerossol, após desafio, não houve sobrevivente entre os animais vacinados com a vacina produzida com amostra mutante cápsula-negativa, e sobrevivência de 25% dos animais vacinados com amostra com cadeia ramificada de amino-ácidos, que permitiu colonização da *B. mallei* no baço dos camundongos vacinados. Vacina produzida com amostra virulenta atenuada, com perda de genes

associados a virulência, principalmente genes associados ao sistema de secreção III, determinou proteção em camundongos BALB/c, com eficácia aumentada pela adição de IL-12 (BONDI; GOLDBERG, 2008).

Polissacarídeos bacterianos são potentes estimuladores de resposta imune do hospedeiro e representam componentes críticos de vacinas de subunidades. Os lipopolissacarídeos (LPS) são antígenos imunodominantes em pacientes infectados com *B. pseudomallei*, sugerindo clinicamente que anticorpos contra esses antígenos protegem o hospedeiro da morte e altos títulos indicam resposta imune eficiente, inclusive de imunidade célula-mediada (WIERSINGA et al., 2006). LPS de *B. mallei* e *B. pseudomallei* são marcadamente similares, principalmente a estrutura química da cápsula (KNIREL et al., 1992; BURTNICK; BRETT; WOODS, 2002). Pela similaridade genética e estrutural existente entre os polissacarídeos destas espécie, é possível que uma vacina específica para LPS e/ou casula de *B. mallei* ou *B. pseudomallei* seja capaz de proteger contra ambos patógenos (BONDI; GOLDBERG, 2008). Tanto LPS como polissacarídeos capsulares foram avaliados em vacina contra *B. pseudomallei*, com produção de anticorpos IgM e IgG<sub>3</sub>, porém sem completa proteção no desafio (NELSON et al., 2004). Camundongos BALB/c receberam anticorpos monoclonais para três diferentes LPS, que os protegeram de morte pelo menos até 14 dias após infecção de alta dose de *B. mallei*, aplicada por aerossol, sugerindo que após esse tempo a bactéria persista intracelularmente, tornando-se inatingível aos anticorpos circulantes (TREVINO et al., 2006).

## **2.9 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE PÚBLICA**

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



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL:**

Verificar o efeito da temperatura de incubação e de diferentes antígenos utilizados no teste de fixação do complemento para diagnóstico do Mormo.

#### **3.2. ESPECÍFICO:**

- Avaliar as diferenças nos resultados do teste de fixação do complemento frente a dois antígenos comercialmente disponíveis;
- Avaliar os diferentes resultados do teste de fixação do complemento frente a diferentes temperaturas de incubação;
- Avaliar os resultados com análise estatística utilizando o teste exato de Fisher.

#### 4. 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. 2003. 398p.

AL-ANI, F. K. et al. Glanders in horses: Clinical, biochemical and serological studies in Iraq. **Veterinarski Arhiv**, v.68, n.5, p.155-162, 1998.

AL-ANI, F. K.; ROBERSON, J. Glanders in horses: A review of literature. **Veterinarski Arhiv**, v.77, p.203-218, 2007.

AMEMIYA, K. et al. Nonviable *Burkholderia mallei* Induces a Mixed Th1- and Th2-Like Cytokine Response in BALB/c Mice. **Infection and Immunity**, v.70, n.5, p.2319–2325, 2002.

AMEMIYA, K. et al. Interleukin-12 induces a Th1-like response to *Burkholderia mallei* and limited protection in BALB/c mice. **Vaccine**, v.24, p.1413–1420, 2006.

BEER, J. Infecção por *Loefflerellas*. **Doenças Infecciosas em Animais Domésticos**. Volume 2. Livraria Roca Ltda. 1988. p. 142-147.

BONDI, S. K.; GOLDBERG, J. B. Strategies toward vaccines against *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **Expert Review of Vaccines**, v.7, n.9, p.1357–1365, 2008.

BRASIL. 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.

BRASIL. 2006. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Classificação de Risco dos Agentes Biológicos. Editora MS, Brasília. 34p.

BURTINICK, M. N.; BRETT, P. J.; WOODS, D. E. Molecular and Physical Characterization of *Burkholderia mallei* O Antigens. **Journal of Bacteriology**, v.184, n.3, p.849–852, 2002

CDC (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION). s.d. Disponível em <http://www.cdc.gov/glanders/transmission/> Acesso em 30/11/2011.

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. et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the bioterror agent *Burkholderia mallei*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.74, n.3, p.345-347, 2006.

DeSHAZER, D. et al. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. **Microbial Pathogenesis**, v.30, n.5, p.253–269, 2001.

DeSHAZER, D.; WAAG, D. Glanders: new insights into an old disease. In L. LINDLER, F. LEBEDA, G. W. KORCH (ed.). **Biological weapons defense: infectious diseases and counterbioterrorism**. The Humana Press, Inc., Totowa, N.J. 2004. p.209-237.

ELSCHNER, M. et al. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. **BMC Veterinary Research**, v.7, p.4, 2011.

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

FUSHAN, A. et al. Genome-wide identification and mapping of variable sequences in the genomes of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **Research Microbiology**, v.156, n.2, p.278-288, 2005.

GEE, J. E. et al. Use of 16S rRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.10, p.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.

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

GOODYEAR, A. et al. Critical protective role for MCP-1 in pneumonic *Burkholderia mallei* infection. **Journal of Immunology**, v.184, n.3, p.1445-1454, 2010.

GREGORY, B. C.; WAAG, D. M. Glanders. In: DEPARTMENT OF THE ARMY. **Medical Aspects of Biological Warfare**. Borden Institute, U.S. Army Medical Department, Fort Detrick, Frederick, Maryland, USA. 2007. p.121-146

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

HEINE, H. S. In Vitro Antibiotic Susceptibilities of *Burkholderia mallei* (Causative Agent of Glanders) Determined by Broth Microdilution and E-Test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.7, p. 2119–2121, 2001.

HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**, 1<sup>a</sup>ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2003.446p.

HOMSTRA, H. et al. Molecular Epidemiology of Glanders, Pakistan. **Emerging Infectious Diseases**, v.15, n.12, p.2036–2039, 2009.

IIHARA, H. et al. Rapid Multiplex Immunofluorescent Assay to Detect Antibodies against *Burkholderia pseudomallei* and Taxonomically Closely Related Nonfermenters. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v.60, n.4, p.230-234, 2007.

ITO, F. et al. Programa de Vigilância de Zoonoses e Manejo de Equídeos do Estado de São Paulo. Módulo III: Outras zoonoses de importância em equídeos e vigilância epidemiológica em unidades municipais – Parte 2. **Boletim Epidemiológico Paulista**. 2008. Disponível em [http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa56\\_equideos.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa56_equideos.htm). Acesso em 04/11/2011.

JONES, S. W. et al. DNA assays for detection, identification, and individualization of select agent microorganisms. **Croatian Medical Journal**, v.46, n.4, p.522-529, 2005.

JUDY, B.M. et al. Comparison of the *in vitro* and *in vivo* susceptibilities of *Burkholderia mallei* to Ceftazidime and Levofloxacin. **BMC Microbiology**, v.9, n.1, p.88, 2009.

KATZ, J.; DEWALD, R.; NICHOLSON, J. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum*, and *Burkholderia mallei* infection in horses. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.12, n.1, p.46-50, 2000.

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.

KNIREL, Y. A. et al. Structure of the polysaccharide chains of *Pseudomonas pseudomallei* lipopolysaccharides. **Carbohydrate research**, v.233, p.185-193, 1992

KUMAR, S. et al. Use of a Recombinant *Burkholderia* Intracellular Motility A Protein for Immunodiagnosis of Glanders. **Clinical Vaccine Immunology**, v.18, n.9, p.1456-1461, 2011.

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

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

LEW, A. E.; DESMARCHELIER, P. M. Detection of *Pseudomonas pseudomallei* by PCR and hybridization. **Journal of Clinical Microbiology**, v.32, n.5, p.1326-1332, 1994.

LOSADA, L. et al. Continuing Evolution of *Burkholderia mallei* Through Genome Reduction and Large-Scale Rearrangements. **Genome Biology and Evolution**, v.2, p.102–116, 2010.

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

MASSEY, S. et al. In vivo Bioluminescence Imaging of *Burkholderia mallei* Respiratory Infection and Treatment in the Mouse Model. **Frontiers Microbiology**, v.2, p.174, 2011.

MONASTYRSKAYA, G. et al. Genome-wide comparison reveals great inter- and intraspecies variability in *B. pseudomallei* and *B. mallei* pathogens. **Research Microbiology**, v.155, n.9, p.781-793, 2004.

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

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

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

MOTA, R. A. et al. Proteinograma sérico em muarees naturalmente infectados pela *Burkholderia mallei*. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v.44, n.2, p.69-76, 2007

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

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

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.

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

NELSON, M. et al. Evaluation of lipopolysaccharide and capsular polysaccharide as subunit vaccines against experimental melioidosis. **Journal of Medical Microbiology**, v.53, p.1177-1182, 2004.

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.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). 2011. Disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=13373&lvl=3&p=mapview&p=has\\_linkout&p=blast\\_url&p=genome\\_blast&keep=1&srchmode=1&unlock](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=13373&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&keep=1&srchmode=1&unlock), Acesso em 03/12/2011.

NIERMAN, W. C. et al. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v.101, n.39, p.14246-14251, 2004.

OIE – World Animal Health Organization. 2008. Terrestrial Code. Chapter 2.5.11. Glanders. p.919-928. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.05.11\\_GLANDERS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.11_GLANDERS.pdf). Acesso em 24/10/2011.

OIE – World Animal Health Organization. 2009. Terrestrial Code. Chapter 12.10. Glanders. [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/GLANDERS\\_FINAL.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/GLANDERS_FINAL.pdf). Acesso em 24/10/2011.

OIE – World Animal Health Organization, 2011a, Disponível em: [http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease\\_timelines&disease\\_type=Terrestrial&disease\\_id=63](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines&disease_type=Terrestrial&disease_id=63), Acesso em 24/10/2011.

OIE - World Animal Health Organization. 2011b, em [http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease\\_status\\_lists](http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_status_lists). Acesso em 24/10/2011.

OIE - World Animal Health Organization. 2011c, Brazil / Glanders. Multiannual Animal Disease Status, Disponível em [http://web.oie.int/hs2/sit\\_pays\\_mald\\_pl.asp?c\\_pays=26&c\\_mald=67](http://web.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=26&c_mald=67). Acesso em 28/10/2011.

OIE – World Animal Health Organization. 2011d. Chapter 1.3. Prescribed and alternative diagnostic tests for OIE listed diseases., Disponível em [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahc/2010/en\\_chapitre\\_1.1.3.htm](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/en_chapitre_1.1.3.htm), Acesso em 23/03/2012.

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

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

RABELO, S. S. A. 2003. Infecção natural pela *Burkholderia mallei* em muarees procedentes da zona da mata do Estado de Pernambuco: Aspectos clínicos, hematológicos e bioquímicos séricos. Tese Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, UFRPE. 55p.

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

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

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

ROMERO, C. M. et al. Genome sequence alterations detected upon passage of *Burkholderia mallei* ATCC 23344 in culture and in mammalian hosts. **BMC Genomics**, v.7, p.228, 2006.

ROWLAND, C. A. et al. Critical Role of Type 1 Cytokines in Controlling Initial Infection with *Burkholderia mallei*. **Infection and Immunity**, v.74, n.9, p.5333-5340, 2006.

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

RUSSELL, P. et al. Comparison of efficacy of ciprofloxacin and doxycycline against experimental melioidosis and glanders. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.45, n.6, p.813-818, 2000.

SANTANIRAND, P. et al. Obligatory role of gamma interferon for host survival in a murine model of infection with *Burkholderia pseudomallei*. **Infection and Immunity**, v.67, p.3593-3600, 1999.

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

SAQIB, M. et al. Disc Diffusion Based In Vitro Antibiotic Susceptibility of Recent Isolates of *Burkholderia mallei*. **International Journal of Agriculture and Biology**, v.12, n.5, p.777–780, 2010.

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

SCHELL, M. A., LIPSCOMB, L.; DeSHAZER, D. Comparative Genomics and an Insect Model Rapidly Identify Novel Virulence Genes of *Burkholderia mallei*. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.7, p.2306–2313, 2008

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

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

SILVA, L. B. G.; et al. Lesões anátomo-histopatológicas em cobaias (*Cavia porcellus*), experimentalmente infectados pela *Burkholderia mallei*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.1, p.23-28, 2005.

SILVA, K. P. C. et al. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.5, p. 439-444, 2009.

SONG, H. et al. The Early Stage of Bacterial Genome-Reductive Evolution in the Host. **PLoS Pathogens**, v.6, n.5, 2010.

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

STEVENS, J. M. et al. Actin-binding proteins from *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* can functionally compensate for the actin-based motility defect of a *Burkholderia pseudomallei* bimA mutant. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.7857–7862, 2005.

THIBAULT, F.M. et al. Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* to 35 antimicrobial agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, n.6, p.1134-1138, 2004.

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

TOMASO, H. et al. Development of 5' nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the *Burkholderia mallei*//*Burkholderia pseudomallei* complex. **Diagnostic Molecular Pathology**, v.13, n.4, p.247-253, 2004.

**TOMASO, H. et al. Rapid presumptive identification of *Burkholderia pseudomallei* with real-time PCR assays using fluorescent hybridization probes. *Molecular and Cellular Probes*, v.19, n.1, p.9-20, 2005.**

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

**TREVIÑO, S. R. et al. Monoclonal Antibodies Passively Protect BALB/c Mice against *Burkholderia mallei* Aerosol Challenge. *Infection and Immunity*, v.74, n.3, p.1958–1961. 2006.**

**ULRICH, M. P. et al. Aerogenic vaccination with a *Burkholderia mallei* auxotroph protects against aerosol-initiated glanders in mice. *Vaccine*, v.23, n.16, p.1986-1989, 2005.**

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

**ULRICH, R. L et al. Development of a polymerase chain reaction assay for the specific identification of *Burkholderia mallei* and differentiation from *Burkholderia pseudomallei* and other closely related Burkholderiaceae. *Diagnostic Microbiology Infectious Diseases*, v.55, n.1, p.37-45, 2006b.**

**YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* genus and transfer seven species of the *Pseudomonas* homology group II to the new genus. *Journal of Microbiology Immunology*, v.36, p.1251-1275, 1992.**

**WAAG, D. M., DeSHAZER, D. Glanders: new insights into an old disease. In: LINDLER L.E.; LEBEDA, F.J.; KORCH, G.W. editors. *Biological weapons defense: infectious diseases and counterbioterrorism*. 1st ed. Totowa (NJ): Humana Press Inc. 2004. p.209–237.**

**WERNERY, U. et al. Natural *Burkholderia mallei* infection in dromedary, Bahrain. *Emerging Infectious Diseases*, v.17, n.7, p.1277-1279, 2011.**

WIERSINGA, W. J. et al. Melioidosis: insights into the pathogenicity of *Burkholderia pseudomallei*. **Nature Reviews. Microbiology**, v.4, n.4, p.272-282, 2006.

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

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

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

## **5. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

### **5.1 ARTIGO 1**

**PESQUISA DE ANTICORPOS ANTI- *BURKHOLDERIA MALLEI* ATRAVÉS  
DA AVALIAÇÃO DE ANTÍGENOS COMERCIAIS E TEMPERATURAS DE  
INCUBAÇÃO UTILIZADOS NO TESTE DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO**

**(Artigo formatado para o periódico *Transboundary and Emergency Diseases*)**

**Pesquisa de Anticorpos Anti- *Burkholderia mallei* através da Avaliação de Antígenos Comerciais e Temperaturas de incubação Utilizados no Teste de Fixação do Complemento**

Marcilia Maria Alves de Souza<sup>1</sup>; Hélio Cordeiro Manso Filho<sup>2</sup>

1 Laboratório Nacional Agropecuário, Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N Dois Irmãos 52171-030 Recife Pernambuco, Brasil

2 Universidade Federal Rural de Pernambuco CEP 52171-030, Recife, PE, Brasil

\*Corresponding author

Tel. 55-8134416311; Fax. 55-8134416311

MMAS [marcilia.souza@agricultura.gov.br](mailto:marcilia.souza@agricultura.gov.br)

HCMF: [hmanso@dz.ufrpe.br](mailto:hmanso@dz.ufrpe.br)

## **Resumo**

O mormo é uma doença infecto-contagiosa que acomete originalmente os equídeos, causada pela *Burkholderia mallei*, que pode ser transmitida para o homem e outros animais, e podendo ser usada como arma biológica. Doença reemergente no Brasil, desde 1999, tem sido motivo de discussão no que concerne ao diagnóstico sorológico. Este trabalho teve como objetivo verificar o efeito da temperatura de incubação e de diferentes antígenos utilizados no teste de fixação do complemento (FC) para diagnóstico do Mormo. Neste estudo foram utilizados dois antígenos: americano, produzido a partir de uma cepa de origem humana, e alemão, produzido com três cepas de origem animal, e dois modos de incubação: Quente (37°C/1 hora) e Frio (2°C a 8°C/18 horas). Foram utilizadas amostras de 95 cavalos, coletadas em cinco ciclos, e submetidas ao FC, frente aos dois antígenos e as duas temperaturas de incubação. O

antígeno americano detectou positividade de 0,37% para antígeno americano a quente, 3,21% para americano frio, 1,88% alemão quente e 3,18% alemão frio. Pode-se concluir que o modo de incubação e o antígeno utilizado no FC são pontos críticos, podendo aumentar ou diminuir o número de animais positivos, razão pela qual é imprescindível a utilização de outro teste sorológico de alta sensibilidade e especificidade, para confirmação do diagnóstico.

Palavras chave: Mormo, imunodiagnóstico, sorologia.

## **Introdução**

O Mormo, doença da lista da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) é uma doença altamente contagiosa dos solípedes causada pela *Burkholderia mallei*, uma bactéria Gram-negativa, imóvel, cocobacilo aeróbio (LOEFFLER, 1886; YABUUCHI *et al.*, 1992). *B. mallei* primariamente infecta cavalos, burros e mulas, entretanto humanos são considerados hospedeiros acidentais (WAAG e DeSHAZER, 2004) e podem ser infectados após o contato com animais doentes ou materiais infectados, sendo considerada uma grave doença zoonótica (ISUCVM, 2003). A maioria dos mamíferos apresenta certo grau de susceptibilidade. A infecção foi relatada em caprinos, ovinos, camelídeos, felinos, caninos, e vários carnívoros de zoológico, alimentados com carne de cavalos com mormo. Estresse, em virtude de trabalho excessivo, má alimentação e habitação em ambiente com condições sanitárias inadequadas são fatores que aumentam a probabilidade de ocorrência da doença (RADOSTITS *et al.*, 2002).

O mormo é endêmico no Oriente Médio, Norte da África e Ásia (ARUN *et al.*, 1999). Em 2004, o mormo equino foi notificado à O.I.E. pelos Emirados Árabes, e, nos últimos 14 anos, surtos de mormo tem sido relatados no Irã, Paquistão e Brasil (SCHOLTZ *et al.*, 2006). No Brasil a doença era considerada extinta desde 1968, reemergindo no estado de Pernambuco em 1999 (MOTA *et al.*, 2000).

O diagnóstico do mormo pode ser realizado através de provas sorológicas. A OIE indica a utilização apenas do teste de fixação do complemento para trânsito internacional, possibilitando o uso de outros métodos, embora a sensibilidade, especificidade e precisão dos testes ainda não tenham sido validados (KATZ *et al.*, 1999; NAUREEN *et al.*, 2007).

Devido a resultados discordantes apresentados na literatura e com o intuito de colaborar na solução da problemática do diagnóstico do mormo, objetivou-se com este

trabalho verificar as reações sorológicas de equinos frente a dois antígenos, comercializados internacionalmente, e duas temperaturas de incubação do teste de Fixação do Complemento.

## **Material e Métodos**

### **Amostras**

Foram utilizadas amostras séricas de 95 equinos provenientes de uma propriedade na Zona Mata do Estado de Pernambuco. Essas amostras foram obtidas assepticamente por venopunção da jugular, o sangue transferido para tubos *vaccuntainer* apropriados para retração de coágulos. Os soros obtidos foram transferidos para tubos plásticos tipo *eppendorf*, identificados individualmente, acondicionados em caixas isotérmicas e transportadas ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do MAPA, para processamento.

### **Delineamento Experimental**

O delineamento do estudo pressupôs cinco ciclos de coletas. Em cada ciclo foram coletadas amostras de sangue dos equinos três vezes ao dia (manhã, tarde e noite), durante três dias consecutivos. A primeira coleta, chamada Ciclo um (C 1), foi realizada na fazenda de origem a 79 Km de Recife. Em seguida, os animais foram deslocados para uma propriedade no Recife. Nesta propriedade os animais foram alojados em baias isoladas, onde foram submetidos a mais quatro períodos de coletas de sangue para CFT. O Ciclo Dois (C 2), ocorreu cinco dias após o primeiro ciclo; o Ciclo Três (C 3), onze dias após C 1; Ciclo Quatro (C4), 30 dias após o primeiro ciclo e Ciclo Cinco (C 5), 49 dias após C 1, totalizando 5700 reações de fixação do complemento.

### **Teste de Fixação do Complemento**

O teste de fixação do complemento foi executado de acordo com o protocolo estabelecido pela Instrução Normativa 12 do MAPA (BRASIL, 2004) em concordância com a técnica descrita no capítulo 2.5.8, do Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres (OIE, 2008), utilizando-se dois antígenos: um produzido nos Estados Unidos da América (Department of Agriculture, USA) produzido com a cepa China de origem humana, diluído a 1:125. E o segundo antígeno produzido por (c.c.Pro GmbH, Orberdola, Germany), composto pelas cepas Mukteswar (Índia), Borgor

(Indonésia) e Zagreb (Yugoslávia) oriundas de cavalo, diluído a 1:80. Para ambos os antígenos foram usados dois modos de incubação: a quente, em estufa a 37°C por uma hora, e a frio, em refrigeração entre 2° e 8°C por 18 horas. Nos testes foram realizadas diluições seriadas de soro de 1:5 até 1:320. As interpretações consideradas foram: NEGATIVA quando apresentavam 100% de hemólise, POSITIVA, 0% a 75% de hemólise na diluição 1:5 (ponto de corte) e INCONCLUSIVA, (suspeita) quando restavam algumas hemácias. Para um animal ser considerado positivo, as amostras teriam que resultar positiva em pelo menos duas coletas dentro de um mesmo ciclo.

### **Análise Estatística**

Para a análise de associação entre os ciclos e antígenos utilizou-se o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5% (ZAR, 1999). Para estas análises estatísticas foram considerados apenas os resultados positivos e negativos.

### **Resultados e Discussão**

Os resultados obtidos para o antígeno americano foram numérica e percentualmente inferiores na incubação a quente, em comparação com a incubação a frio, com diferença estatisticamente significativa em todos os ciclos. Para o antígeno alemão houve diferença significativa apenas nos ciclos C1 e C2, apesar do número de reagentes positivos na incubação a frio ter sido superior à incubação a quente (Tabela 1).

Tabela 1: Teste de Fixação do complemento para mormo, em cinco ciclos, frente aos antígenos americano e alemão e incubação quente e frio.

Ciclo	Americano		Valor de p	Alemão		Valor de p
	Quente Positivo	Frio Positivo		Quente Positivo	Frio Positivo	
1	3	37	0,000*	24	56	0,000*
2	3	49	0,000*	26	49	0,004*
3	3	46	0,000*	14	24	0,093
4	3	24	0,000*	21	34	0,065
5	9	27	0,001*	22	18	0,512

De um total de 5700 reações a comparação dos resultados, revelou grande diferença numérica, com positividade total de 21 reações (0,37%) antígeno americano a quente, 183 (3,21%) para americano frio, 107 (1,88%) alemão quente e 181 (3,18%) alemão frio.

A comparação entre o número de reações positivas (492) indicou que na incubação a quente houve diferença estatisticamente significativa nos cinco ciclos e, na incubação em temperatura de refrigeração, houve diferença significativa apenas nos C1 e C5 (Tabela 2).

Tabela 2: Comparação entre os métodos de incubação para o teste de fixação do complemento, utilizando-se dois antígenos

Ciclo	Incubação a Quente		Valor de p	Incubação a Frio		Valor de p
	Americano	Alemão		Americano	Alemão	
	Positivo	Positivo		Positivo	Positivo	
1	3	24	0,000*	37	56	0,031*
2	3	26	0,000*	49	49	1,000
3	3	14	0,006*	46	24	0,005*
4	3	21	0,000*	24	34	0,166
5	9	22	0,016*	27	18	0,162

A temperatura de incubação representa um importante papel no FC, embora existam poucos trabalhos a esse respeito, verificou-se que incubação resultou em uma maior fixação do complemento, conseqüentemente com maior número de reações positivas na incubação a frio, do que na incubação a quente. Segundo DEAN (1911), baixas temperaturas favorecem um retardamento na formação do complexo antígeno-anticorpo, permitindo maior adsorção do complemento, com maior número de reações positivas.

JACOBSTHAL (1910) assinalou que no Teste de Wassermann havia melhor fixação do complemento a 4°C do que a 37°C, em 200 soros testados. GUGGENHEIMER (1911) também obteve melhores resultados na incubação a frio do FC, para diagnóstico da sífilis em humanos. KHAN *et al.* (2011) investigaram três grupos de equídeos, usando antígeno americano para o diagnóstico do mormo nos dois modos de incubação, e comparando com o antígeno alemão apenas no modo a frio, detectando nos dois grupos maior percentual de positividade com o antígeno alemão.

Quanto aos antígenos, o americano é produzido apenas por uma cepa de origem humana, enquanto o alemão por um pool de três outras cepas, de origem equina. O número de reações positivas ao antígeno americano foi menor que o alemão, o qual pode ser explicado pela perda de antigenicidade por destruição ou bloqueio de epítomos, durante subculturações, segundo o afirmado por NEUBAUER *et al.*, 2005. Contudo, segundo FRITZ *et al.* (2000), a cepa chinesa de *B. mallei* tem sido considerada efetiva

na manutenção da cápsula após sucessivas passagens em hospedeiros não naturais, para produzir antígenos ou maleína, sendo o polissacarídeo capsular a chave para a virulência da *B.mallei*, como descrito por LOPEZ *et al.* (2003), além de estimular uma variedade de reações patofisiológicas no hospedeiro (BRETT *et al.* 2007).

KHAN *et al.* (2011) avaliaram a sensibilidade e especificidade de três antígenos comercialmente disponíveis para diagnóstico do mormo, verificando que a maior especificidade foi para o antígeno holandês CIDIC (100%), seguido do antígeno alemão c.c. Pro (99.39%) e por último pelo antígeno americano USDA, que mostrou menor sensibilidade (62.19%), com  $p < 0.05$ .

ELSCHNER *et al.* (2011) calcularam 94.5% de especificidade para o antígeno alemão com 5.5% de falsos positivos e SPRAGUE *et al.* (2009) encontraram 1% de falsos positivos em cavalos testados pelo FC. NAUREEN *et al.* (2007) citaram os falsos positivos como resultados de reação cruzada com *B. pseudomallei* e que uma das causas da não detecção de anticorpos específicos contra mormo poderia ser o tipo de antígeno utilizado na técnica, uma vez que a maioria das cepas utilizadas é de origem humana, como citado por ULRICH *et al.* (2006).

WHTLOCK *et al.* (2007) afirmaram que a interação hospedeiro-bactéria é pré-requisito para o início do processo infeccioso. Vários fatores de virulência podem estar presentes, como proteínas do *pili*, as quais estão também envolvidas no mecanismo de escape da bactéria durante a invasão de células fagocíticas e não fagocíticas, levando à sobrevivência da bactéria no hospedeiro. Desse modo, o reconhecimento imunogênico pode ser falho nesse estágio, culminando em falsos negativos nos testes sorológicos, devido a *B.mallei* ser capaz de sobreviver na célula hospedeira usando caminhos metabólicos alternativos para produção de energia (ULRICH *et al.*, 2004).

Segundo JIMENEZ (comunicação pessoal, 2010), isso pode ser explicado pelo fato da resposta imune do hospedeiro estar associada ao ciclo biológico individual, dependendo de vários fatores, como a expressão do antígeno (endógeno ou exógeno), período de incubação, dose do microrganismo, sorotipo, via de entrada, estágio da doença, etc. As manifestações aguda, sub-aguda e assintomática da doença indicam uma notável variação na resposta imune, levando a uma interação altamente complexa hospedeiro-patógeno. Isso explica a ocorrência de uma amostra sérica ser positiva e outra ser negativa, em um mesmo método de avaliação sorológica, de um mesmo animal.

## Conclusão

Pelos resultados encontrados no presente estudo, pode-se concluir que o modo de incubação e o antígeno utilizado no FC são pontos críticos, podendo aumentar ou diminuir o número de animais positivos, razão pela qual é imprescindível a utilização de outro teste sorológico de alta sensibilidade e especificidade, para confirmação do diagnóstico. No Brasil, há necessidade de pesquisas que comparem e avaliem a sensibilidade e especificidade dos diversos métodos diagnósticos, inclusive utilizando amostras brasileiras de *B. mallei* na produção de antígenos, para aumentar a confiabilidade do diagnóstico de mormo, contribuindo para maior eficiência nos programas de controle e erradicação do mormo no país.

## Referências Bibliográficas

- ARUN, S.; NEUBAUER, H.; GUREL, A. et al. Equine glanders in Turkey. **Veterinary Record. London**, v.144, p.255-258, 1999.
- 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, Brasília, em 12 de abril de 2004, seção 1, página 7.
- BRETT, P.J.; BURTNICK M;SNYDER D. et al. (2007). *Burkholderia mallei* express a unique lipopolysaccharide mixture that is a potent activator of human Toll-like receptor 4 complexes. *Molecular Microbiology*, Oxford, v.63, n.2, p.379–390, 2007.
- DEAN, H. R. The influence of temperature on the fixation of complement. *Proc. Roy. Soc. Med., London*, Vol. ix. P. 416. 1911.
- ELSCHNER, M.; SCHOLZ, H.C.; MELZER, F. et al. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. **BMC Veterinary Research**. 7: 4. Published online 2011 January 19. doi: 10.1186/1746-6148-7-4, 2011. Disponível em <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/7/4/> Acesso em: 15 mai, 2012.
- FRITZ, D.L.; VOGEL, P.; BROWN, D.R. et al. Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*). *Veterinary Pathology*, London, v.37, n.6, p.626-636. 2000.

GUGGENHEIMER, H. Veber den Einfluss der Temperatur anf die Wassermanshe Syphilis Reaction. Munchener Medizinische Wochenschrift., Munchen, N°26, p. 1392-3994. 1911, Bd. I viii.S.

ISUCVM, 2003. Disponível em: <http://www.state.nj.us/agriculture/divisions/ah/diseases/glanders.htm>. Acessado em 05 de janeiro de 2011.

JACOBSTHAL, E. Versuche Zueiner Optischen Serodiagnse der Syphilis Zeils.f. Immunitaestsf. Munchener Medizinische Wochenschrift Bd. VIII, H. 1, p. 107-128, Bd. Ivii. S. 689. 1910.

JIMENEZ, G. comunicação pessoal. 2010 (Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina Veterinária, Recife – PE, CEP: 52. 171-900.

KATZ, J. B.; CHIEVES, L. P.; HENNAGER, S. G. et al. Serodiagnosis of equine piroplasmosis, dourine, and glanders using an arrayed immunoblotting method. The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Thousand Oaks, v.11, p.292–294, 1999.

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.

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

LOPEZ, J.; COPPS, J.; WILHELMSSEN, C. et al. Characterization of Experimental Equine Glanders, Microbes and Infection 5: p. 1125-1131. (2003).

MOTA, R.A.; BRITO, M.F.; CASTRO, F.J.C. et al. Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v.20, n.4, p.155-159. 2000

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

NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L.D., ZACHARIAN, R. et al. Serodiagnosis of Burkholderia mallei infections in horses: State-of-the-art and perspectives. Journal of Veterinary Medicine B, Berlin, v.52, v.5, p.201–205. 2005.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES. "Glandders" In Manual of Standards For Diagnostic Tests and Vaccines, Paris Disponível em [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00076.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00076.htm). 2000. Acesso no dia 03 de janeiro de 2008.

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

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

SCHOLZ, H.C.; JOSEPH, M.; TOMASO, H. et al. Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based polymerase chain reaction assay. Diagnostic Microbiology Infectious Disease, Amsterdam, v.2054, n.4, p.241-247. 2006.

ULRICH, R.J.; DeSHAZER, D. Type III secretion: a virulence factor delivery system essential for the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. Infectious Immunology. Washington, DC. v. 72. p.1150-1154.2004.

ULRICH, M.P.; NORWOOD, D.A.; CHRISTENSEN, D.R. et al. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. Journal of Medical Microbiology, Reading, v.55, n.Pt 5, p.551-559. 2006.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. New Jersey: Prentice-Hall, 1999.

WAAG, D. M., DeSHAZER, D. Glanders: new insights into an old disease. In: LINDLER L.E.; LEBEDA, F.J.; KORCH, G.W. editors. Biological weapons defense: infectious diseases and counterbioterrorism. 1st ed. Totowa (NJ): Humana Press Inc. p.209–237. 2004.

WHITLOCK, G. C., MARK ESTES, D. & TORRES, A. G. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. FEMS Microbiology Letters, 277: 115–122. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00949.x. 2007.

YABUUCHI, E; KOSAKO, Y; OYAIZU, H. et al. 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, Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.



## **5.2 ARTIGO 2**

### **INFLUÊNCIA DO RITMO CIRCADIANO NA RESPOSTA SOROLÓGICA DO MORMO EM EQUINOS**

**(Artigo formatado para o periódico Pesquisa Veterinária Brasileira)**

## Influência do Ritmo Circadiano na Resposta Sorológica do Mormo em Equinos

Marcilia MA Souza<sup>2</sup>; Hélio C Manso Filho<sup>3</sup>

**RESUMO-** O mormo é uma doença infecto-contagiosa própria de equídeos, reemergente no Brasil desde 1999, enzoótica na maioria dos estados nordestinos, cujo diagnóstico sorológico é realizado através da técnica de fixação do complemento (FC). O ritmo ou ciclo circadiano sofre regulação de fatores exógenos, como o estresse, que interfere no sistema imune, causando inibição da resposta imune inata e adaptativa. Desconhece-se a sua influência na avaliação sorológica para o diagnóstico do mormo. O objetivo da pesquisa foi verificar se o ritmo circadiano influencia na resposta sorológica do mormo em equinos. No estudo foram utilizados 95 equinos, com coletas de sangue em três turnos diários, manhã, tarde e noite, durante três dias consecutivos, em cinco períodos. Os soros foram analisados pelo FC, utilizando antígeno americano e alemão, com incubação a quente e a frio. O antígeno americano detectou sete animais positivos (1,5%) nos três turnos, na incubação a quente, e 60 positivos, nos turnos da manhã e tarde, e 63 positivos no turno da noite, com oscilação de 12,6 a 13,3% de positividade. Com o antígeno alemão obteve-se 36 (7,6%), 33 (6,9%) e 38 (8,0%) de positividade, respectivamente nos três turnos, na incubação a quente e 61 (12,8%), 51 (10,7%) e 69 (14,5%) de positivos, nos mesmos turnos, na incubação a frio. A análise estatística dos resultados indicou que não houve diferença significativa no número de reagentes positivos ao FC nos três períodos diários, não havendo influência do ritmo circadiano na resposta sorológica para diagnóstico do mormo.

**TERMOS DE INDEXAÇÃO:** Sorologia, ritmo circadiano, equino.

1

## INTRODUÇÃO

---

<sup>1</sup> Recebido em .....

Aceito para publicação em .....

2 Laboratório Nacional Agropecuário, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N Dois Irmãos 52171-030 Recife Pernambuco, Brasil

3 Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N Dois Irmãos 52171-030 Recife Pernambuco, Brasil

MMAS [marcilia.souza@agricultura.gov.br](mailto:marcilia.souza@agricultura.gov.br)

HCMF: [hmanso@dz.ufrpe.br](mailto:hmanso@dz.ufrpe.br)

O mormo é uma doença infecto-contagiosa e zoonótica (ACHA e SZIFRES, 2003), que acomete principalmente equídeos, tem caráter enzoótico no oriente médio, norte da África e Ásia (ARUN *et al.*, 1999). No Brasil a doença era considerada extinta desde 1968, reemergindo no estado de Pernambuco em 1999 (MOTA *et al.*, 2000). A Instrução Normativa nº 24 da Secretaria de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) determina que as propriedades com um ou mais animais com diagnóstico de mormo serão consideradas focos da doença, interditadas e submetidas a regime de saneamento, sendo os positivos sacrificados imediatamente (BRASIL, 2004).

Seguindo recomendação da Organização Mundial para Saúde Animal (OIE), o MAPA adota no Brasil o Teste de Fixação do Complemento (FC) para o diagnóstico sorológico do mormo (BRASIL, 2004).

O ritmo ou ciclo circadiano refere-se a um período aproximado de 24 horas, provindo do latim *circa*, que significa em torno de, e *diem*, dia (HALBERG *et al.*, 2003). O sistema circadiano provê meios para adaptar a fisiologia interna às constantes mudanças dos estímulos ambientais que ocorrem pelo movimento de rotação do planeta (MURPHY, 2010). O eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) é o sistema hormonal chave, com padrão circadiano bem caracterizado (PAZ-FILHO, WONG e LICÍNIO, s.d.).

Em equinos, evidências sugerem que a ativação imune periférica pode agir como um sinal de reposicionamento para os sensores circadianos no sangue periférico, contribuindo para reações imunes inatas e manutenção da homeostase nos tecidos, que agem como primeira linha de defesa durante o desafio infeccioso (MURPHY *et al.*, 2007). O estresse atua em vários sistemas, inclusive com interações no sistema imune e nas reações inflamatórias (KASSI *et al.*, 2012). Foi verificado que o exercício de enduro aumenta de duas a três vezes o nível plasmático do cortisol, não refletindo a secreção adrenal que tem aumento de seis vezes, sugerindo que a eliminação e a distribuição total do cortisol aumenta durante o exercício (LASSOURD *et al.*, 1996), o qual é considerado estresse para o animal. Compreende-se que a concentração plasmática do cortisol em cavalos tem pico pela manhã, entre 6:00 e 9:00 horas, e menores valores no início da noite, entre 18:00 e 21:00 horas, podendo ser alterado por perturbações em seus hábitos (IRVINE e ALEXANDER, 1994).

Profissionais veterinários que trabalham a campo questionam sobre a possibilidade do período da coleta de matérias biológicas influenciar sobre os resultados de testes sorológicos, neste caso, para o diagnóstico do mormo. Assim, objetivou-se com este trabalho verificar se o ritmo circadiano influencia na resposta sorológica do mormo em equinos, através da técnica de fixação do complemento.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras**

Foram utilizadas amostras séricas de 95 equinos provenientes de uma propriedade na Zona Mata do Estado de Pernambuco. Essas amostras foram obtidas assepticamente por venopunção da jugular, o sangue transferido para tubos *vaccutainer* apropriados para retração de coágulos. Os soros obtidos foram transferidos paratubos de poliestireno, identificados individualmente, acondicionados em caixas isotérmicas e transportadas ao Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO) do MAPA, para processamento.

### **2.2 Delineamento Experimental**

O delineamento do estudo pressupôs cinco ciclos de coletas. Em cada ciclo foram coletadas amostras de sangue dos equinos três vezes ao dia (manhã, tarde e noite), durante três dias consecutivos. A primeira coleta, Ciclo um (C 1), foi realizada na fazenda de origem a 79 Km de Recife. Em seguida, os animais foram deslocados para uma propriedade no Recife. Nesta propriedade os animais foram alojados em baias isoladas, onde foram submetidos a mais quatro períodos de coletas de sangue para FC. O Ciclo Dois (C 2), ocorreu cinco dias após o primeiro ciclo; o Ciclo Três (C 3), onze dias após C 1; Ciclo Quatro (C4), 30 dias após o primeiro ciclo e Ciclo Cinco (C 5), 49 dias após C 1, totalizando 5700 reações de fixação do complemento.

### **2.2. Teste de Fixação do Complemento**

O teste de fixação do complemento foi executado de acordo com o protocolo estabelecido pela Instrução Normativa 12 do MAPA (BRASIL, 2004) em concordância com a técnica descrita no capítulo 2.5.8, do Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres (OIE, 2008), utilizando-se dois antígenos: um produzido nos Estados Unidos da América (Department of Agriculture, USA) produzido com a cepa China de origem humana, diluído a 1:125; E o segundo antígeno produzido por c.c.Pro GmbH, Orberdola, Germany, composto pelas cepas Mukteswar (Índia), Bogor (Indonésia) e Zagreb (Yugoslávia), oriundas de cavalos, diluído a 1:80. Para ambos os antígenos foram usados dois modos de incubação: a quente, em estufa a 37°C por uma hora, e a frio, em refrigeração entre 2° e 8°C por 18 horas. Nos testes foram realizadas diluições seriadas de soro de 1:5 até 1:320. As interpretações consideradas foram: NEGATIVA quando apresentavam 100% de hemólise, POSITIVA, 0% a 75% de hemólise na diluição 1:5 (ponto de corte) e INCONCLUSIVA, suspeita, quando restavam algumas hemácias. Para um animal ser considerado positivo, as amostras teriam que resultar positiva em pelo menos duas coletas dentro de um mesmo ciclo.

### **2.3 Análise Estatística**

Para a análise de associação entre os turnos e resultado sorológico utilizou-se o teste exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5% (ZAR, 1999).

## **RESULTADO E DISCUSSÃO**

As frequências absolutas e relativas nos três turnos, manhã, tarde e noite, nos cinco ciclos, usando o antígeno americano, tanto a quente como a frio, não apresentaram diferença estatisticamente

significativa,  $p=1,000$  e  $p=0,945$ , respectivamente. O número de soros positivos na incubação a frio foram numérica e porcentualmente superiores ao observado na incubação a quente (Tabela 1).

O FC realizado com antígeno alemão revelou diferenças numéricas e percentuais entre os três turnos pesquisados, tanto na incubação em estufa, como em refrigeração, porém estatisticamente não foram significativas, com valor de  $p = 0,825$  e  $0,213$ , respectivamente (Tabela 2).

Os resultados obtidos para o antígeno americano foram numérica e porcentualmente inferiores na incubação a quente em comparação com a incubação em temperatura a frio, enquanto que, para o antígeno alemão, o número de reagentes positivos na incubação a frio apresentou-se superior à incubação a quente.

Os resultados indicam que o período do dia, no qual se efetuou a coleta, não interferiu nas reações séricas ao FC, não havendo, portanto, interferência do ciclo circadiano no diagnóstico sorológico do mormo. Fatores externos que variam durante os períodos diários, como temperatura, incidência de luz solar, atividade física e outros não produziram estresse suficiente para interferir na positividade ou negatividade das reações sorológicas, apesar da informação luminosa produzir alterações no sistema circadiano (MURPHY, 2010), porém, provavelmente sem produzir alterações dos níveis de cortisol (IRVINE e ALEXANDER, 1994), capaz de determinar alterações no sistema imune, como foi detectado por AKIRA et al. (1990) e KASSI et al. (2012).

As citocinas imunes e outros mediadores da inflamação são potentes ativadores da resposta central do estresse, no sistema de neurotransmissores, com feedback entre o sistema imune/inflamatório e o sistema nervoso central (KASSI et al., 2012). As três principais citocinas, fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1) e interleucina 6 (IL-6) podem estimular o eixo HPA *in vivo*, sozinho ou em sinergismo com outros fatores, bloquear significativamente a produção de anticorpos neutralizantes (AKIRA et al., 1990), inibir a atividade de células *natural killer* (HIRANO et al., 1990) e a síntese de prostanóides e glicocorticóides (AKIRA et al., 1990), embora não inibam todos os componentes do sistema imune (DHABHAR, 2002).

Os principais hormônios glicocorticóides do estresse e catecolaminas afetam a seleção da resposta de células T auxiliaadoras (Th1) e Th2. Os glicocorticóides, como as catecolaminas, inibem diretamente a produção de citocinas tipo 1, como IL-12, IL-2, TNF e interferon (IFN), que atuam na imunidade celular e formação de Th1, favorecendo, inversamente, a produção de citocinas tipo 2, como IL-10, IL-4, IL-13 e Th2, que induzem a imunidade humoral (ELENKOV e CHROUSOS, 2002).

Resposta excessiva do eixo HPA e prolongada mudança de Th2 tem sido associadas à reincidência de infecções micobacterianas, progressão da infecção pelo vírus humano da imunodeficiência, infecções subsequentes a injúrias traumáticas e queimaduras e aumento da incidência de crescimento tumoral e metástases (ELENKOV e CHROUSOS, 1999). Em humanos e camundongos, a regulação temporal produz flutuações circadianas de muitas citocinas, incluindo IFN, IL-1b, IL-6 e TNF, de linfócitos T e B e células *natural killer* (ARJONA e SARKAR, 2008). Pode-se supor que os fatores estressantes externos tenham atuação no início da infecção, com repercussão na resposta imune à infecção, pela diminuição de funções imunes importantes, como apresentação de antígeno, proliferação de leucócitos e secreção de citocinas (ELENKOV e

CHROUSOS, 2002), com menor atuação em infecções crônicas pela *Burkholderia mallei*, concluindo-se que o período do dia para a coleta de material não interfere na resposta sorológica para o diagnóstico do mormo em equinos, através do teste de Fixação do Complemento.

**Agradecimentos.** À ADAGRO pela coleta das amostras; à Professora Dra. Tomoe Nodas Saukas pelo suporte técnico; Aos técnicos de laboratório do Laboratório de Diagnóstico Bacteriológico pela ajuda no processamento das amostras e à coordenação do LANAGRO/PE pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- ACHA, P.N.; SZIFRES, B. Glanders. In: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Pan American Health Organization, Washington, DC. p.142-145. 2003.
- AKIRA, S, HIRANO, T; TAGA, T. et al. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). The FASEB Journal, Bethesda, v. 4, p.2860-2867. 1990.
- ARJONA, A.; SARKAR, D.K. Are circadian rhythms the code of hypothalamic-immune communication? Insights from natural killer cells. Neurochemical Research, New York, n.33, p.708-718, 2008.
- ARUN, S.; NEUBAUER, H.; GUREL, A. et al. Equine glanders in Turkey. Veterinary Record. London, v.144, p.255-258, 1999.
- 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, Brasília, em 12 de abril de 2004, seção 1, página 7.
- DHABHAR, F.S. Stress-induced augmentation of immune function--the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. Brain Behavior Immunology, Amsterdam, v.16, p.785-789. 2002.
- ELENKOV, I.J.; CHROUSOS, G.P. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. Trends Endocrinology Metabolism, New York, v.10, p.359-368. 1999.
- ELENKOV, I.J.; CHROUSOS, G.P. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. Annals of New York Academy of Science, New York, v.966, p.290-303. 2002.
- HALBERG, F.; CORNÉLISSEN, G.; KATINA, G. et al. Transdisciplinary unifying implications of circadian findings in the 1950s. Journal of Circadian Rhythms 2003, 1:2 doi:10.1186/1740-3391-1-2. Disponível em <http://www.JCircadianRhythms.com/content/1/1/2>. Acesso em 09 nov 2012.
- HIRANO, T.; AKIRA, S.; TAGA, T. et al. Biological and clinical aspects of interleukin 6. Immunology Today, Amsterdam, v.11, p.443-449. 1990.

- IRVINE, C.H.; ALEXANDER, S.L. Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology*, Stoneham, v.11, n.2, p.227-238. 1994.
- KASSI, E.; TSIGOS, C.; KYROU, I. et al. STRESS, ENDOCRINE PHYSIOLOGY AND PATHOPHYSIOLOGY Chapter 8. Updated: June 1, 2012. *ADRENAL PHYSIOLOGY AND DISEASES*. George Chrousos – Editor. Disponível em <http://www.endotext.org/adrenal/adrenal27/adrenalframe27.htm>. Acesso em 09 nov 2012.
- LASSOURD, V.; GAYRARD, V.; LAROUTE, V. et al. Cortisol disposition and production rate in horses during rest and exercise. *The American journal of physiology*, Bethesda, v.271, n.1 Pt-2, p.R25-33. 1996.
- MOTA, R.A.; BRITO, M.F.; CASTRO, F.J.C. et al. Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Rio de Janeiro, v.20, n.4, p.155-159. 2000
- MURPHY, B.A. Chronobiology and the horse: recent revelations and future directions. *The Veterinary Journal*, London, v.185, n.2, p.105-114. 2010.
- MURPHY, B.A.; VICK, M.M.; SESSION, D.R. et al. Acute systemic inflammation transiently synchronizes clock gene expression in equine peripheral blood. *Brain, behavior, and immunity*, San Diego, v.21, n.4, p.467-476. 2007.
- OIE – World Animal Health Organization. 2008. *Terrestrial Code*. Chapter 2.5.11. Glanders. p.919-928. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/2.05.11\\_GLANDERS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.11_GLANDERS.pdf). Acesso em 24/10/2011.
- PAZ FILHO, G.; WONG, M-L.; LICINIO, J. CIRCADIAN RHYTHMS OF THE HPA AXIS AND STRESS. Chapter 27. In *ADRENAL PHYSIOLOGY AND DISEASES*. George Chrousos – Editor. Disponível em <http://www.endotext.org/adrenal/adrenal27/adrenalframe27.htm>. Acesso em 09 nov 2012
- ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1999.

Tabela 1: Frequências Absoluta e Relativa (F.A. e F.R.) do teste de fixação de complemento para mormo, com antígeno americano, de acordo com os turnos, em incubação a Quente e a Frio.

Turno	Antígeno Americano								Valor de p	
	Quente				Valor de p	Frio				
	Positivo		Negativo			Positivo		Negativo		
	F.A.	F.R.	F.A.	F.R.		F.A.	F.R.	F.A.		F.R.
Manhã	7	1,5	468	98,5	1,000	60	12,6	415	87,4	0,945
Tarde	7	1,5	468	98,5		60	12,6	415	87,4	
Noite	7	1,5	468	98,5		63	13,3	412	86,7	

Tabela 2: Frequências Absoluta e Relativa (F.A. e F.R.) do teste de fixação de complemento para mormo, com antígeno alemão, de acordo com os turnos, na incubação a Quente e a Frio).

Turno	Antígeno Alemão								Valor de p	
	Quente				Valor de p	Frio				
	Positivo		Negativo			Positivo		Negativo		
	F.A.	F.R.	F.A.	F.R.		F.A.	F.R.	F.A.		F.R.
Manhã	36	7,6	439	92,4	0,825	61	12,8	414	87,2	0,213
Tarde	33	6,9	442	93,1		51	10,7	424	89,3	
Noite	38	8,0	437	92,0		69	14,5	406	85,5	

**Study of Anti-*Burkholderia mallei* Antibodies: Evaluation of Commercial Antigens and Incubation Temperature in Complement Fixation Test**

Marcilia Maria Alves Souza<sup>1</sup>; Hélio Cordeiro Manso Filho<sup>2</sup>

1 Brazilian National Laboratory for Agriculture, Ministry of Agriculture,  
Livestock and Food Supply, Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N 52171-030 Dois

Irmãos-Recife Pernambuco, Brazil

2 Rural Federal University of Pernambuco

\* Corresponding author

E-mail addresses:

MMAS [marcilia.souza@agricultura.gov.br](mailto:marcilia.souza@agricultura.gov.br)

HCMF: [hmanso@dz.ufrpe.br](mailto:hmanso@dz.ufrpe.br)

## **Abstract**

Glanders is an infectious disease caused by *Burkholderia mallei* that affects horses, but can be transmitted to humans and other animals and may also be used as a biological weapon. This disease reemerged in Brazil in 1999 and the serological diagnosis has since been the subject of discussion. The aim of the present study was to evaluate the effect of incubation temperature and different antigens in the complement fixation test for the diagnosis of glanders. Samples from 95 horses were collected in five cycles and submitted to the complement fixation test for the comparison of two antigens (an American antigen produced from a strain of human origin and a German antigen produced with three strains of animal origin) and two modes of incubation [warm (37 °C/1 hour) and cold (2 °C to 8 °C/18 hours)]. Positivity was 0.37% and 3.21% with the American antigen in the warm and cold incubation tests, respectively, and 1.88% and 3.18% with the German antigen in the warm and cold incubation assays, respectively. Based on the present findings, the mode of incubation and the antigen used in the complement fixation test are critical factors to the determination of the number of animals positive for glanders. It is therefore necessary to use other serologic tests with adequate sensitivity and specificity for the confirmation of the diagnosis.

**Keywords:** Glanders, immunodiagnosis, serology

## **Introduction**

Glanders is a highly contagious disease caused by *Burkholderia mallei*, which is a Gram-negative, immobile, aerobic coccobacillus (Loeffler, 1886; Yabuuchi et al., 1992). *B. mallei* primarily infects horses, donkeys and mules, but humans may be incidental hosts (WAAG and DESHAZER, 2004) and can become infected after contact with sick animals or infected materials. Glanders is considered a serious zoonotic disease (ISUCVM, 2003). Most mammals exhibit some degree of susceptibility. Infection has been reported in goats, sheep, camels, cats, dogs and carnivores in zoos fed beef and horse meat infected with glanders. Stress due to overwork, a poor diet and housing in an environment with inadequate sanitary conditions are factors that increase the likelihood of the occurrence of this disease (Radostits et al., 2002).

Glanders is endemic in the Middle East, North Africa and Asia (Arun et al., 1999). In 2004, equine glanders was reported to the World Organisation for Animal Health (OIE) by the United Arab Emirates. Outbreaks of glanders have been reported in Iran, Pakistan and Brazil in the past 14 years (Scholtz et al., 2006). Specifically in Brazil, the disease had been considered extinct since 1968, but reemerged in 1999 in the state of Pernambuco (Mota et al., 2000).

The diagnosis of glanders is performed by serological tests. The OIE recommends the use of only the complement fixation test for international trade. Other methods are also available, but the sensitivity, specificity and accuracy of these tests have not yet been validated (Katz et al. 1999; Naureen et al. 2007).

Considering the conflicting results in the literature, the aim of the present study was to evaluate two internationally marketed antigens and two incubation temperatures in the complement fixation test for the diagnosis of glanders.

## **Materials and Methods**

### **Samples**

Serum samples were taken from 95 horses at a property in the state of Pernambuco, Brazil. The samples were obtained aseptically by jugular venopuncture and transferred to vacountainer tubes suitable for clot retraction. Sera were transferred to polystyrene tubes, individually identified, packed in coolers and transported to the Brazilian National Agricultural Laboratory of the Ministry of Agriculture and Livestock Farming.

### **Experimental Design**

The study design involved five cycles of serum collections. In each cycle, blood samples were collected three times a day (morning, afternoon and evening) over three consecutive days. The first collection, denominated cycle one (C1), was performed at the farm of origin, 79 km from the city of Recife. The animals were then transported to a property in Recife, where they were housed in separate bays and submitted to four periods of blood collection for the complement fixation test. C2 occurred five days after the first cycle; C3 occurred eleven days after the first cycle; C4 occurred 30 days after the first cycle; and C5 occurred 49 days after the first cycle, totaling 5700 complement fixation reactions.

### **Complement Fixation Test**

The complement fixation test was performed following the protocol established by Normative Instruction 12 (BRAZIL, 2004) of the Brazilian Ministry of Agriculture and Livestock Farming in accordance with the technique described in Chapter 2.5.8 of the Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE, 2008), using two antigens: one from the United States (U.S. Department of Agriculture) produced with a

Chinese strain of human origin and diluted to 1:125 and another produced by CCPro GmbH (Oberdorla, Germany) composed of the horse-derived Mukteswar (India), Borgor (Indonesia) and Zagreb (Yugoslavia) strains and diluted to 1:80. Both antigens were used with two incubation modes: warm (37 °C for one hour) and cold (refrigeration between 2 ° and 8 °C for 18 hours). Serial dilutions of the serum from 1:5 to 1:320 were used in the assays. The following interpretations were considered: NEGATIVE – 100% hemolysis; POSITIVE – 0 to 75% hemolysis at a dilution of 1:5 (cut-off point); and INCONCLUSIVE (SUSPECTED) – when remaining red blood cells are detected. For an animal to be considered positive, samples had to be positive in at least two collections in the same cycle.

### **Statistical Analysis**

Fisher's exact test was used to determine associations between cycles and antigens. The level of significance was set to 5% ( $p < 0.05$ ) (Zar, 1999). Only positive and negative results were considered in the statistical analysis.

### **Results and Discussion**

Statistically significant differences between the warm and cold assays were found in all cycles using the American antigen, with lower absolute and percentage rates of positivity achieved with warm incubation. For the German antigen, significant differences between incubation modes were only detected in C1 and C2, but the number of positive results was generally higher in the cold incubation assays (Table 1).

Significant numerical differences were detected in the total of 5700 reactions among the different methods: 21 positive reactions (0.37%) with the American antigen in warm incubation mode; 183 (3.21%) with the American antigen in cold incubation mode;

107 (1.88%) with the German antigen in warm incubation mode and 181 (3.18%) with the German antigen in cold incubation mode.

The comparison of the number of positive reactions (492) detected with the different antigens indicated significant differences in all five cycles using warm incubation, whereas significant differences between antigens were only detected in C1 and C3 using cold incubation (Table 2).

Although few studies have addressed this aspect, incubation temperature plays an important role in the complement fixation test. In the present study, a greater number of positive reactions were found with the cold incubation protocol in comparison to warm incubation. According to Dean (1911), low temperatures favor a delay in the formation of the antigen-antibody complex, allowing greater adsorption of the complement and a higher number of positive reactions. Analyzing in 200 sera, Jacobsthal (1910) found that the Wassermann test achieved better complement fixation at 4 °C in comparison to 37 °C. Guggenheimer (1911) also achieved better results on the complement fixation test with cold incubation for the diagnosis of syphilis in humans.

Khan et al. (2011) investigated three groups of horses using the American antigen for diagnosis of glanders with two incubation modes and the German antigen with cold incubation alone and found a greater proportion of positive reactions with the German antigen. The American antigen is produced by a strain of human origin, while the German antigen is composed of a pool of three strains of equine origin. In the present study, a fewer number of positive reactions were found with the American antigen, which may be explained by the loss of antigenicity due to the destruction or blockade of epitopes during subcultures (Neubauer et al., 2005). However, according to Fritz et al. (2000), the Chinese strain of *B. mallei* has been considered effective in maintaining the capsule after successive passages in non-natural hosts to produce mallein or antigens. The

capsular polysaccharide is key to the virulence of *B. mallei* (Lopez et al., 2003) and stimulates a variety of pathophysiological responses in the host (Brett et al., 2007).

Khan et al. (2011) evaluated the sensitivity and specificity of three commercially available antigens for the diagnosis of glanders and found the greatest specificity with the Dutch antigen CIDIC (100%), followed by the German cc Pro (99.39%) and a significantly lower rate ( $p < 0.05$ ) with the American antigen (62.19%). Elschner et al. (2011) estimated 94.5% specificity for the German antigen, with a 5.5% false-positive rate and Sprague et al. (2009) found a 1% false-positive rate in horses tested by complement fixation. Naureen et al. (2007) cited false positives as a result of cross-reactions with *B. pseudomallei* and report that the type of antigen could be one of the reasons for the failure to detect specific antibodies against glanders, since most strains employed are of human origin (Ulrich et al., 2006).

According to Whtlock et al. (2007), the bacterium-host interaction is a prerequisite for the initiation of the infectious process. Several virulence factors may be present as pilin proteins, which are involved in the bacterial escape mechanism during the invasion of phagocytes and non-phagocytic cells, allowing the survival of the bacterium in the host. Thus, immunogenic recognition may be flawed in this stage, resulting in false-negative serological tests due to the fact that *B. mallei* is able to survive in the host cell by using alternative metabolic pathways for the production of energy (Ulrich et al. 2004). According Jimenez (personal communication, 2010), this may be explained by the fact that the host immune response is associated with the individual biological cycle and depends on a number of factors, such as antigen expression (endogenous or exogenous), incubation period, microorganism load, serotype, path of entry, disease stage, etc. The acute, sub-acute and asymptomatic manifestations of the disease indicate remarkable variations in the immune response, leading to a highly complex host-pathogen

interaction, which explains the occurrence of both positive and negative serum samples using the same serological evaluation method on samples from the same animal.

### **Conclusion**

Based on the present findings, the mode of incubation and the antigen used in the complement fixation test are critical factors to the determination of the number of animals positive for glanders. It is therefore necessary to use other serologic tests with adequate sensitivity and specificity for the confirmation of the diagnosis. There is need for research in Brazil to evaluate and compare the sensitivity and specificity of different diagnostic methods using Brazilian samples of *B. mallei* for the production of antigens to increase the reliability of the diagnosis. Such studies could contribute toward greater efficacy in the control and eradication of glanders.

## References

Arun, S.; Neubauer, H., Gurel, A. et al. Equine Glanders in Turkey. *Veterinary Record*. London, v.144, p.255-258, 1999.

BRAZIL. 2004. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Agriculture Defense Department. Instruction No 24 of 5 April 2004, the Secretariat of Agricultural Protection, published in the Official Gazette, Brasilia, on April 12, 2004, section 1, page 7.

Dean, H. R. The Influence of temperature on the fixation of complement. *Proc. Roy. Med Soc, London*, Vol. lxxxi.. 1911, 416p.

Elschner, M.; Scholz, H. C.; Melzer, F.; Saqib, M.; Peggy, M.; Rassabach, A.; Dietzsch, M.; Schmoock, G.; Santana, VLA.; Souza, MMA.; Werneryal, R.; Neubauer, H.; Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of Glanders. *BMC Veterinary Research*. 7: 4. Published online January 19, 2011. doi: 10.1186/1746-6148-7-4, 2011. Disponível <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/7/4/> Accessed on: 15 May, 2012.

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*, London, v. 37, n.6, p.626-636. 2000.

Guggenheimer, H. Veber den Einfluss Temperatur der die anf Wassermanshe Syphilis Reaction. *Munchener Medizinische Wochenschrift.*, Munchen, No. 26, p. 1392-3994. 1911, Bd I viii.S.

Jacobsthal, E. Versuche Zueiner Optischen Serodiagnse der Syphilis Zeils.f. Immunitaestsf. *Munchener Medizinische Wochenschrift* Bd VIII, H. 1, p. 107-128, Bd Ivii. S. 689. 1910.

Jimenez, G. personal communication. 2010 (Federal Rural University of Pernambuco, Department of Veterinary Medicine).

Katz, J. B.; Chieves, L. P.; Hennager, S. G.; Nicholson, J. M.; Fisher, T. A.; Serodiagnosis of equine piroplasmosis, dourine, and Glanders using an arrayed immunoblotting method. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Thousand Oaks, v.11, p.292-294, 1999.

Khan, I., Wieler, L.H.; Melzer, F.; Gwida, M.; Santana, V.L.A.; Souza, M.M.A.; Saqib, M.; Neubeuer, H.; Elshner, M.; 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.

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

Lopez, J.; Copps, J.; Wilhelmsen, C.; Moore, R.; Kubai, J.; St-Jacques, M.; Halayo, S.; Kranendonk, C.; Tobac, S.; De Shazer, D.; Fritz D.L.; Tom, M.; Woods, D.E.; Characterization of Experimental Equine Glanders, *Microbes and Infection* 5: p. From .1125 to 1131. (2003).

Mota, R. A.; Brito, M.F.; Castro, F.J.C.; Massa, M.; Glanders in horses in the states of Pernambuco and Alagoas. *Brazilian Veterinary Research*, Rio de Janeiro, v.20, n.4, p.155-159. in 2000

Naureen, A., Saqib, M.; Muhammad, G.; Muhammad H.H.; Muhammad, N.A.; Comparative Evaluation of Rose Bengal Plate Agglutination Test, Test Mallein, and Some Conventional Serological Tests for Diagnosis of Equine Glanders. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, Thousand Oaks, v.19, n.4, p.362-367, 2007.

Neubauer, H., Sprague, L.D., Zacharian, R.; Tomaso, H.; Dahouk, S.Al.; Wernery, R.; Wernery, U.; Scholz, C.; Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses:

State-of-the-art and perspectives. *Journal of Veterinary Medicine B, Berlin*, v.52, v.5, p.201-205. 2005.

OIE Glanders In *Manual of Diagnostic Tests and Standards For Vaccines*, Paris Available in [http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A\\_00076.htm](http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_00076.htm). 2000. Access on 03 January 2008.

Radostits, O. M. et al. *Veterinary Clinic*. 9th ed. Rio de Janeiro: Ed Guanabara Koogan 2002, p1737.

Scholz, H. C.; Joseph, M.; Tomaso, H. et al. Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of Glanders in the United Arab Emirates by a newly developed flip-based polymerase chain reaction assay. *Infectious Disease Diagnostic Microbiology*, Amsterdam, v.2054, n.4, p.241-247. 2006.

Ulrich, R. J., DeShazer, D. Type III secretion: a virulence factor delivery system essential for the pathogenicity of *Burkholderia mallei*. *Infectious Immunology*. Washington, DC. v. 72. p.1150-1154.2004.

Ulrich, M.P; Norwood, D.A; Christensen, D.R. et al. Using real-time PCR to detect *Burkholderia mallei* Specifically. *Journal of Medical Microbiology*, Reading, v.55, n.Pt 5, p.551-559. 2006.

Zar, J.H. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1999.

Waag, D. M., DeShazer, D. Glanders: new insights into an old disease. In: Lindler LE, Lebeda, FJ; Korch, GW. *Biological weapons defense: infectious diseases and counterbioterrorism*. 1st ed. Totowa (NJ): Humana Press Inc.2004, p.209-237.

Whitlock, G. C., Mark These, D. Torres & A. G. Glanders: off to the races with *Burkholderia mallei*. *FEMS Microbiology Letters*, 277: 115-122. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00949.x. 2007.

Yabuuchi, E; Kosako, Y; Oyaizu, H. et al. 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, Tokyo, v.36, p.1251-1275, 1992.

Table 1: Complement fixation test for glanders in five cycles with different antigens (American and German) and modes of incubation (warm and cold)

Cycle	American		p-value	German		p-value
	Warm	Cold		Warm	Cold	
	Positive	Positive		Positive	Positive	
<b>1</b>	3	37	0.000*	24	56	0.000*
<b>2</b>	3	49	0.000*	26	49	0.004*
<b>3</b>	3	46	0.000*	14	24	0.093
<b>4</b>	3	24	0.000*	21	34	0.065
<b>5</b>	9	27	0.001*	22	18	0.512

Table 2: Comparison of two antigens (American and German) for complement fixation test according to incubation mode (warm and cold)

Cycle	Warm incubation		p-value	Cold incubation		p-value
	American	German		American	German	
	Positive	Positive		Positive	Positive	
<b>1</b>	3	24	0.000*	37	56	0.031*
<b>2</b>	3	26	0.000*	49	49	1.000
<b>3</b>	3	14	0.006*	46	24	0.005*
<b>4</b>	3	21	0.000*	24	34	0.166
<b>5</b>	9	22	0.016*	27	18	0.162

# Transboundary and Emerging Diseases

---

© Blackwell Verlag GmbH

Edited By: Paul Kitching, Marta Sabara, Gavin Thomson and Dirk Werling

Impact Factor: 1.809

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2011: 22/145 (Veterinary Sciences); 48/70 (Infectious Diseases)

Online ISSN: 1865-1682

## Author Guidelines

### Content of Author Guidelines:

1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Submission of Manuscripts,
4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure,
6. After Acceptance.

**Relevant Documents:** [Copyright Transfer Agreement](#), [Colour Work Agreement Form](#)

**Useful Websites:** [Submission Site](#), [Articles published in Transboundary and Emerging Diseases](#), [Author Services](#), [Blackwell Publishing's Ethical Guidelines](#), [Guidelines for Figures](#)

### 1. GENERAL

*Transboundary and Emerging Diseases* brings together in one place the latest research on infectious animal diseases considered to hold the greatest economic threat to animals worldwide. The journal provides a venue for global research on the sources favoring their diagnosis, prevention and management, and for papers on veterinary public health, pathogenesis, epidemiology, statistical modeling, diagnostics, biosecurity issues, genomics, vaccine development and rapid communication of new outbreaks.

**INFLUENCE OF CIRCADIAN RHYTHM IN SEROLOGICAL RESPONSE OF  
HORSES TESTED FOR GLANDERS**

Marcilia Maria Alves Souza<sup>1</sup>; Hélio Cordeiro Manso-Filho<sup>2</sup>

1 Brazilian National Laboratory for Agriculture, Ministry of Agriculture and Livestock  
Farming, Rua Dom Manoel de Medeiros, S / N 52171-030 Dois Irmãos-Recife  
Pernambuco, Brazil

2 Rural Federal University of Pernambuco

\* Corresponding author

E-mail addresses:

MMAS [marcilia.souza@agricultura.gov.br](mailto:marcilia.souza@agricultura.gov.br)

HCMF: [hmanso@dz.ufrpe.br](mailto:hmanso@dz.ufrpe.br)

## **ABSTRACT**

Glanders is an infectious disease of equines that reemerged in Brazil in 1999 and is currently enzootic in most states of the northeastern region of the country. The serological diagnosis is performed using the complement fixation test (CFT). The circadian rhythm of an organism is influenced by a number of exogenous factors, such as stress, which affects the immune system and causes the inhibition of innate and adaptive immune responses. However, the influence of circadian rhythm on serology tests for the diagnosis of glanders remains unknown. The aim of the present study was to determine whether circadian rhythm influences the serological response of horses tested for glanders. For such, 95 horses were analyzed, with blood samples taken during three daily shifts (morning, afternoon and evening) over for three consecutive days in five distinct periods. Sera were analyzed by CFT using American and German antigens with warm and cold incubation. The American antigen detected seven animals as positive (1.5%) in the three shifts using warm incubation as well as 60 animals as positive in the morning and afternoon shifts and 63 as positive in the evening shift (12.6 to 13.3% positivity rate). With the German antigen, positive results were obtained with warm incubation in 36 (7.6%), 33 (6.9%) and 38 (8.0%) animals in the morning, afternoon and evening shifts, respectively, and positive results were obtained with cold incubation in 61 (12.8%), 51 (10.7%) and 69 (14.5%) in the same shifts. The statistical analysis revealed no significant differences in the number of positive reactions by CFT among the three different shift, demonstrating that circadian rhythm exerts no influence on serology for the diagnosis of glanders.

Keywords: Serology, circadian rhythm, horse.

## INTRODUCTION

Glanders is an infectious zoonotic disease (ACHA and SZIFRES, 2003) that primarily affects horses and is enzootic in the Middle East, North Africa and Asia (ARUN et al., 1999). In Brazil, the disease was considered extinct in 1968, but re-emerged in the state of Pernambuco in 1999 (MOTA et al., 2000). Normative Instruction 24 of the Brazilian Ministry of Agriculture and Livestock Farming determines that properties that have one or more animals diagnosed with glanders are considered focal points of the disease and subjected to closure and sanitation procedures, with all positive animals immediately sacrificed (BRAZIL, 2004). Following the recommendations of the World Organisation for Animal Health (OIE), the Brazilian Ministry of Agriculture and Livestock Farming adopts the complement fixation test (CFT) for the serological diagnosis of glanders (BRAZIL, 2004).

Circadian rhythm refers to a period of approximately 24 hours, from the Latin *circa*, meaning around, and *diem*, meaning day (HALBERG et al., 2003). The circadian system provides means for adapting internal physiology to the changing environmental stimuli that occur with the rotation of the planet (MURPHY, 2010). The hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is the key hormonal system and exhibits a clear circadian pattern (PAZ-FILHO et al., 2012).

Evidence suggests that peripheral immune activation in horses may act as a repositioning signal for circadian sensors in peripheral blood, contributing to innate immune responses and the maintenance of homeostasis in tissues, which is the first line of defense during infection (MURPHY et al., 2007). Stress acts on multiple systems, including interactions with the immune system and inflammatory reactions (KASSI et al., 2012). Endurance exercise, which is considered a source of stress for animals, has been found to increase the level in plasma cortisol two-to-threefold, with a six-fold increase in adrenal secretion, suggesting that the distribution total cortisol increases during exercise (LASSOURD et al. 1996). The plasma concentration of cortisol in horses peaks in the morning between 6:00 and 9:00 AM, with a lower level found in early evening between 6:00 and 9:00 PM; however, this pattern can be altered by a change in habit (IRVINE and ALEXANDER, 1994).

Veterinary professionals who work in the field have considered the possibility that the time of day for the collection of biomaterial exerts an influence on the results of serological tests. Thus, the aim of the present study was to determine whether circadian rhythm influences the serological response of horses tested for glanders using the CFT.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Samples**

Serum samples were taken from 95 horses at a property in the state of Pernambuco, Brazil. The samples were obtained aseptically by jugular venopuncture and transferred to vacountainer tubes suitable for clot retraction. Sera were transferred to polystyrene tubes, individually identified, packed in coolers and transported to the Brazilian National Agricultural Laboratory of the Ministry of Agriculture and Livestock Farming for processing.

### **2.2 Experimental Design**

The study design involved five cycles of serum collections. In each cycle, blood samples were collected three times a day (morning, afternoon and evening) over three consecutive days. The first collection, denominated cycle one (C1), was performed at the farm of origin, 79 km from the city of Recife. The animals were then transported to a property in Recife, where they were housed in separate bays and submitted to four periods of blood collection for the CFT. C2 occurred five days after the first cycle; C3 occurred eleven days after the first cycle; C4 occurred 30 days after the first cycle; and C5 occurred 49 days after the first cycle, totaling 5700 complement fixation reactions.

#### **2.2. Complement Fixation Test**

The complement fixation test was performed following the protocol established by Normative Instruction 12 (BRAZIL, 2004) of the Brazilian Ministry of Agriculture and Livestock Farming in accordance with the technique described in Chapter 2.5.8 of the Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE, 2008), using two antigens: one from the United States (U.S. Department of Agriculture) produced with a Chinese strain of human origin and diluted to 1:125 and another produced by CCPPro GmbH (Oberdorla, Germany) composed of the horse-derived Mukteswar (India), Borgor (Indonesia) and Zagreb (Yugoslavia) strains and diluted to 1:80. Both antigens were used with two incubation modes: warm (37 °C for one hour) and cold (refrigeration between 2 ° and 8 °C for 18 hours). Serial dilutions of the serum from 1:5 to 1:320 were used in the assays. The following interpretations were considered: NEGATIVE – 100% hemolysis; POSITIVE – 0 to 75% hemolysis at a dilution of 1:5

(cut-off point); and INCONCLUSIVE (SUSPECTED) – when remaining red blood cells are detected. For an animal to be considered positive, samples had to be positive in at least two collections in the same cycle.

### 2.3 Statistical Analysis

Fisher's exact test was used to determine associations between shifts and serological results. The level of significance was set to 5% ( $p < 0.05$ ) (ZAR, 1999).

## RESULTS AND DISCUSSION

No differences among the morning, afternoon and evening shifts were found using the American antigen in either the warm and cold assays ( $p = 1.000$  and  $p = 0.945$ , respectively). Absolute and relative frequencies of positive sera were greater using the cold incubation protocol in comparison to warm incubation (Table 1).

No statistically significant differences among the morning, afternoon and evening shifts were found using the German antigen in either the warm and cold assays ( $p = 0.825$  and  $p = 0.213$ , respectively). As occurred with the American antigen, absolute and relative frequencies of positive sera were greater using the German antigen with the cold incubation protocol in comparison to warm incubation (Table 2).

The findings indicate that the time of day at which serum collection is performed exerts no influence on the reaction in the CFT for the diagnosis of glanders. External factors that vary throughout the day, such as temperature, sunlight and physical activity, apparently do not produce enough stress to affect the results of serological reactions. While changes in luminosity alter the circadian rhythm (MURPHY, 2010), it is likely that this factor is insufficient to produce changes in cortisol levels (IRVINE and ALEXANDER, 1994) capable of altering the immune system (AKIRA et al., 1990; KASSI et al., 2012).

Cytokines and other immune mediators of inflammation are potent activators of the central stress response in the neurotransmitter system, with feedback between the immune/inflammatory and central nervous system (KASSI et al., 2012). The three major cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$  [TNF- $\alpha$ ], interleukin 1 [IL-1] and interleukin 6 [IL-6]) can stimulate the HPA axis *in vivo* (either alone or in synergy with other factors), significantly block the production of neutralizing antibodies (AKIRA et al.

1990) and inhibit the activity of natural killer cells (HIRANO et al., 1990) as well as the synthesis of prostanoids and glucocorticoids (AKIRA et al. 1990), but do not inhibit all components of the immune system (DHABHAR, 2002). Major glucocorticoid stress hormones and catecholamines affect the selection of the response of T helper cells (Th1 and Th2). Like catecholamines, glucocorticoids directly inhibit the production of type 1 cytokines, such as IL-12, IL-2, TNF- $\alpha$  and interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ), which act on cell immunity and the formation of Th1, inversely favoring the production of type 2 cytokines, such as IL-10, IL-4, IL-13 and Th2, which induce humoral immunity (ELENKOV and CHROUSOS, 2002).

An excessive HPA axis response and prolonged alteration in Th2 have been associated with the recurrence of mycobacterial infections, the progression of infection by the human immunodeficiency virus, infection following traumatic injuries and burns and increased incidences of tumor growth and metastasis (ELENKOV and CHROUSOS, 1999). In humans and mice, the temporal regulation of circadian fluctuations produces several cytokines, including IFN- $\alpha$ , IL-1b, IL-6 and TNF- $\alpha$  in T and B lymphocytes and natural killer cells (ARJONA and SARKAR, 2008). One may assume that external stressors act in the onset of infection, with repercussions in the immune response and a decline in important immune functions, such as antigen presentation, leukocyte proliferation and cytokine secretion (ELENKOV and CHROUSOS, 2002), but exert less of an influence in chronic infection by *Burkholderia mallei*.

## CONCLUSION

Based on the findings of the present study, circadian rhythm exerts no influence on serology tests for the diagnosis of glanders using the complement fixation test.

## REFERENCES

- ACHA, P.N.; SZIFRES, B. Glanders. In: Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Pan American Health Organization, Washington, DC. p.142-145. 2003.
- AKIRA, S, HIRANO, T; TAGA, T. et al. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). The FASEB Journal, Bethesda, vol. 4, p.2860-2867. 1990.

ARJONA, A., SARKAR, D.K. Are circadian rhythms the code of hypothalamic-immune communication. Insights from natural killer cells. *Neurochemical Research*, New York, n.33, p.708-718, 2008.

ARUN, S.; NEUBAUER, H., Gurel, A. et al. Equine Glanders in Turkey. *Veterinary Record*. London, v.144, p.255-258, 1999.

BRAZIL. 2004. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Agriculture Defense Department. Instruction No 24 of 5 April 2004, the Secretariat of Agricultural Protection, published in the Official Gazette, Brasilia, on April 12, 2004, section 1, page 7.

Dhabhar, FS Stress-induced augmentation of immune function - the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Behavior Brain Immunology*, Amsterdam, v.16, p.785-789. 2002.

ELENKOV, I.J.; Chrousos, G.P. Stress Hormones, Th1/Th2 patterns, Pro / Anti-inflammatory Cytokines and Susceptibility to Disease. *Trends Endocrinology Metabolism*, New York, v.10, p.359-368. 1999.

ELENKOV, I.J.; Chrousos, G.P. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of New York Academy of Science*, New York, v.966, p.290-303. 2002.

Halberg, F., Cornelissen, G.; Katina, G. et al. Transdisciplinary unifying implications of circadian findings in the 1950s. *Journal of Circadian Rhythms* 2003, 1:2 doi: 10.1186/1740-3391-1-2. Available in <http://www.JCircadianRhythms.com/content/1/1/2>. Access on 09 Nov 2012.

HIRANO, T., Akira, S., TAGA, T. et al. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunology Today*, Amsterdam, v.11, p.443-449. 1990.

IRVINE, CH; ALEXANDER, SL Factors Affecting the circadian rhythm in plasma cortisol Concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology*, Stoneham, v.11, n.2, p.227-238. 1994.

Kassi, E.; Tsigos, C.; Kyrou, I. et al. STRESS, *Endocrine Physiology and Pathophysiology Chapter 8*. Updated: June 1, 2012. ADRENAL PHYSIOLOGY AND DISEASES. George Chrousos - Editor. Available in <http://www.endotext.org/adrenal/adrenal27/adrenalframe27.htm>. Access on 09 Nov 2012.

LASSOURD, V.; GAYRARD, V.; LAROUTE, V. et al. Cortisol disposition and production rate in horses During rest and exercise. *The American Journal of Physiology*, Bethesda, v.271, Pt n.1-2, p.R25-33. 1996.

MOTA, R. A.; BRITO, M.F.; CASTRO, F.J.C. et al. Glanders in horses in the states of Pernambuco and Alagoas. *Brazilian Veterinary Research*, Rio de Janeiro, v.20, n.4, p.155-159. In 2000

MURPHY, BA Chronobiology and the horse: recent revelations and future directions. *The Veterinary Journal*, London, v.185, n.2, p.105-114. 2010.

MURPHY, B.A.; VICK, M.M.; SESSION, D. R. et al. Acute systemic inflammation transiently synchronizes clock gene expression in equine peripheral blood. *Brain, behavior, and immunity*, San Diego, v.21, n.4, p.467-476. 2007.

PEACE SON, G.; WONG, M-L.; Licinio, J. Circadian RHYTHMS OF THE HPA AXIS AND STRESS. Chapter 27. In *ADRENAL PHYSIOLOGY AND DISEASES*. George Chrousos - Editor. Available in <http://www.endotext.org/adrenal/adrenal27/adrenalframe27.htm>. Accessed on November 9, 2012

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. New Jersey: Prentice-Hall, 1999.

Table 1: Absolute and relative (N and %) frequencies of results of complement fixation test for the diagnosis of glanders using American antigen according to collection period and incubation protocol

Period	American Antigen								p-value	
	Warm				p-value	Cold				
	Positive		Negative			Positive		Negative		
	N	%	N	%		N	%	N		%
Morning	7	1.5	468	98.5	1.000	60	12.6	415	87.4	0.945
Afternoon	7	1.5	468	98.5		60	12.6	415	87.4	
Evening	7	1.5	468	98.5		63	13.3	412	86.7	

Table 2: Absolute and relative (N and %) frequencies of results of complement fixation test for the diagnosis of glanders using German antigen according to collection period and incubation protocol

Period	German Antigen								p-value	
	Warm				p-value	Cold				
	Positive		Negative			Positive		Negative		
	N	%	N	%		N	%	N		%
Morning	36	7.6	439	92.4	0.825	61	12.8	414	87.2	0.213
Afternoon	33	6.9	442	93.1		51	10.7	424	89.3	
Evening	38	8.0	437	92.0		69	14.5	406	85.5	

## Equine Veterinary Journal

---

© EVJ Ltd

Edited By: Celia M. Marr

Impact Factor: 1.456

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2011: 34/145 (Veterinary Sciences)

Online ISSN: 2042-3306

Associated Title(s): [Equine Veterinary Education](#)

### Author Guidelines

#### Author Guidelines

**Content of Author Guidelines: 1. General Introduction, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Types Accepted, 4. Manuscript Format and Structure, 5. Submission of Manuscripts, 6. After Acceptance, 7. Pre-Submission Checklist**

Relevant Documents: Copyright Transfer Agreement Form

Useful Websites: Submission Site, Articles published in Equine Veterinary Journal, Author Services, Wiley-Blackwell Publishing's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures, Complaints Procedure

### EQUINE VETERINARY JOURNAL

#### AUTHOR GUIDELINES

##### 1. GENERAL INTRODUCTION

*Equine Veterinary Journal (EVJ)* publishes evidence to improve clinical practice or expand scientific knowledge underpinning equine veterinary medicine. This unrivalled international scientific journal is published 6 times per year with around 128 pages per issue, containing articles with original and potentially important findings. Contributions are received from sources worldwide.

*EVJ* publishes original articles and reviews on all aspects of equine veterinary science. Categories include General Articles, Short Communications, Technical Notes, Case Reports and Retrospective Series and Review Articles (see section 3). They present new developments in research being carried out both by researchers in institutes and from

clinicians in practice devoted to equine and/or comparative physiology, pathology, medicine or surgery.

Original Manuscripts first undergo an Internal Editorial Assessment to ensure that the manuscript content is of interest to our readership and the manuscript format conforms to our guidelines described below. If deemed appropriate, manuscripts are then assessed by at least two external peer reviewers and our review process is double-blinded (i.e. the reviewers are not identified to the authors and vice versa, see Marr, C.M. (2011) Masking the peer review process: better or worse? *Equine vet J*, 43, 249). Many manuscripts also undergo assessment by an individual with expertise in study design and data analysis. Our median time for completing the review process for original submission is less than 5 weeks. If accepted for publication, the copyright becomes the property of EVJ Ltd. Accepted manuscripts are pre-published and submitted for indexing within a few days of acceptance.