



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DO MORMO

CECILIA MARIA DE SOUZA LEÃO E SILVA

RECIFE

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E FISIOLOGIA ANIMAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DO MORMO

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Ciência Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

Co-orientadora: Dra. Vânia Lúcia de Assis Santana

CECILIA MARIA DE SOUZA LEÃO E SILVA

RECIFE

2018

AVALIAÇÃO DO DIAGNÓSTICO DO MORMO

CECILIA MARIA DE SOUZA LEÃO E SILVA

TESE DEFENDIDA E APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

ORIENTADOR:

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

EXAMINADORES:

Dr. FERNANDO LEANDRO DOS SANTOS

Dr. JONH ALDSON BEZERRA TENÓRIO

Dr. NEURISVAN RAMOS GUERRA

Dra. VANIA LUCIA DE ASSIS SANTANA

RECIFE - PERNAMBUCO

2018

AGRADECIMENTOS

À Deus por colocar pessoas tão importantes na minha vida como os meus pais Jorge e Fátima, minha base, meus maiores incentivadores e o maior apoio que eu poderia ter. Sem família não crescemos e não amadurecemos. Meu noivo, Robson, por estar sempre ao meu lado, orgulhoso, amigo e conselheiro. A minha irmã e cunhado que durante o período do doutorado me deram o meu maior presente, Antônio. Aos meus sogros Maria do Carmo e Albérico pelo apoio de sempre, minha cunhada Andrea e sobriha Maria Fernanda.

A minha segunda família, BAC raíz, Jonh (Xunio), Fabiola, Luis, Tiara, Dra Mabel, Dete, Marcelo (Xuin), André, Clebson e Luciana, pelas risadas, encontros, almoços, pelo apoio que toda família de verdade dá. A Dra Marta, Diego, Rômulo pelos cafés e compartilhamento do dia a dia. Ao meu irmão Diogo, sempre apoiando, nunca me deixando só. A todos os meus amigos que acompanharam minha jornada e também aos que compartilharam dela comigo aqui representados por André e Pedro Paulo, desde 2006.

Não poderia deixar de lado minha chefinha, Dra Marcilia, o anjo da guarda, a mãezinha de todos, a pessoa mais doce e carinhosa que alguém pode conhecer. Meu muito obrigado por todos esses anos que cuidou de mim. Nunca vou esquecer, a senhora vai ter sempre um lugar no meu coração.

A Dra Vânia, minha co-orientadora e orientadora, que me ensinou tudo sobre laboratório. Por acreditar sempre em mim, incentivando a estudar e buscar sempre meu melhor, ajudando a correr atrás dos desafios e não me deixando desistir nunca. Muito obrigada.

E o agradecimento especial vai ao meu orientador, Prof. Manoel, me aceitando como sua orientada, mesmo não tendo vivência no trabalho que iria realizar. Mesmo assim me deu a mão e caminhou junto comigo desde o mestrado. Não vou esquecer jamais o apoio, a liberdade de criar e a credibilidade em mim. Dedico esse doutorado a ele. Muito, muito obrigada. Vou ser grata sempre. O sr estará sempre em minhas orações.

“A gente pode morar numa casa mais ou menos, numa rua mais ou menos, numa cidade mais ou menos, e até ter um governo mais ou menos.

A gente pode dormir numa cama mais ou menos, comer um feijão mais ou menos, ter um transporte mais ou menos, e até ser obrigado a acreditar mais ou menos no futuro.

A gente pode olhar em volta e sentir que tudo está mais ou menos...

Tudo bem!

O que a gente não pode mesmo, nunca, de jeito nenhum...

é amar mais ou menos, sonhar mais ou menos, ser amigo mais ou menos, namorar mais ou

*menos, ter fé mais ou menos, e acreditar mais ou menos.
Senão a gente corre o risco de se tornar uma pessoa mais ou menos.”*

Chico Xavier

RESUMO

O Mormo constitui-se em uma doença altamente contagiosa dos solípedes causada pela *Burkholderia mallei*, uma bactéria Gram-negativa, não móvel e cocobacilo aeróbio, infectando primariamente equínos, asininos e muares, entretanto humanos são considerados hospedeiros acidentais. *Burkholderia mallei* está relacionada na lista de doenças da Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) como doença de importância de saúde pública, e devido ao seu alto potencial de infecção é referenciada como agente de bioterrorismo. De acordo com a OIE o diagnóstico compreende o teste sorológico, alérgico, isolamento bacteriano e testes de biologia molecular, sendo a fixação do complemento, o teste oficial a ser realizado para trânsito de animais. O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, através da Portaria N° 22, de 16 de março de 2018 do Ministério, utiliza o teste da Fixação do Complemento e Elisa para triagem dos animais, sendo aqueles reagentes, testados posteriormente com o Western Blotting para confirmação. Neste trabalho, temos como objetivo identificar filogeneticamente as cepas circulantes em território nacional para os animais suspeitos de Mormo. A partir do isolamento bacteriano foram identificados 08 resultados compatíveis com a *Burkholderia* em amostras oriundas de vigilância epidemiológica em áreas focos da doença. O sequenciamento demonstrou a circulação das cepas *Burkholderia pseudomallei* e *Burkholderia mallei*, em território brasileiro onde há presença do Mormo. Os resultados mostram a diferenciação das estirpes circulantes em território nacional e proporciona o conhecimento de sua epidemiologia e virulência, auxiliando posteriormente em formulações de medidas para controle e erradicação da enfermidade.

Palavras-chave: imunologia, estirpe, biologia molecular, virulência.

ABSTRACT

Glanders is a highly contagious disease caused by *Burkholderia mallei* solipeds, a Gram - negative bacterium, not motility and aerobic coccobacillus, primarily infecting horses, donkeys and mules, though humans are considered accidental hosts . The *Burkholderia mallei* is listed in the list of the World Organisation for Animal Health (OIE) as an important public health disease, and due to its high potential for infection is referred to as a bioterrorism agent. According to the OIE comprises the serological diagnosis, allergy testing and bacterial isolation, and complement fixation, the official test to be performed for trade of animals. This method of diagnosis is recommended in Brazil by Instruction N° 22, 16 of march of 2018, Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply by its high sensitivity and specificity. According to the OIE comprises the serological diagnosis, allergy testing and bacterial isolation, and complement fixation, the official test to be performed for trade of animals and bacterial isolation is considered gold test for identification of the agent. From the bacterial isolation the presence of *Burkholderia* was identified in 11 samples from epidemiological surveillance in the disease outbreaks. Sequencing demonstrated the circulation of the strains *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* in Brazilian territory where Mormo is present. The results show the differentiation of the circulating strains in the national territory and provides the knowledge of their epidemiology and virulence, later assisting in formulations of disease control and eradication measures

Keyword: imunology, strain, molecular biological, virulence

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Pag

Figura 1: árvore filogenética construída no programa MEGA 6.06.....38

Tabelas do artigo I – Estudo Filogenético da *Burkholderia mallei* em isolados do Brasil

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos usados para a amplificação da região E2 na RT-PCR.....30

Tabelas do artigo II – Avaliação da Fixação do Complemento com a utilização de duas metodologias e dois antígenos comercialmente disponíveis e Western Blotting para o diagnóstico do Mormo.

Tabela 1 - Resultados dos testes de Fixação do Complemento e western blotting, com frequências relativa e absoluta.....56

Tabela 2 - Avaliação da sensibilidade do TFC USDA quente, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting.....57

Tabela 3 - Avaliação da sensibilidade do C.CPRO, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting.....57

Tabela 4 - Avaliação da sensibilidade do USDA frio, Valor Preditivo Positivo, Valor Preditivo Negativo e acurácia dos exames em relação ao western blotting.....58

Tabela 5 - Avaliação da concordância entre o exame fixação do complemento USDA quente com fixação do complemento CC PRO Western Blotting e USDA frio.....58

Tabela 6 - Avaliação da concordância entre a TFC C.C. PRO com o western blotting.....59

Tabela 7 – Avaliação da concordância entre o TFC USDA frio e o Western Blotting.....59

LISTA DE ABREVIATURA

ARA⁺ - Arabinose positiva

ARA⁻ - Arabinose negativa

CCPRO – antígeno alemão

CIEF – Contraimunoeletroforese

DDA – Departamento de Defesa Animal

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FC – Fixação do Complemento

HAI – Hemaglutinação Indireta

IB - Immunoblot

IFAT – Teste de Anticorpos Fluorescentes Indiretos

LPS - Lipopolissacarídeo

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MLVA – Multiple Locus Variable Number of Tandem Repeat Analysis (MLVA)

NCBI - Centro Nacional para Informação Biotecnológica

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

qPCR – Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real

RB – Rosa bengala

SNP – Single-Nucleotide Polymorphism

TFC – Teste da Fixação do Complemento

USDA – United States Department of Agriculture

VPP – Valor Preditivo Positivo

VPN – Valor Preditivo Negativo

WB – Western Blotting.

SUMÁRIO

Resumo	06
Abstract.....	07
Lista de Ilustrações	08
Lista de Tabelas 42 / 50	
Lista de Abreviaturas.....	10
Sumário.....	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	
2.1 ETIOLOGIA.....	12
2.2 EPIDEMIOLOGIA.....	14
2.3 TRANSMISSÃO.....	15
2.4 PATOGENIA E PATOLOGIA.....	16
2.5 SINTOMATOLOGIA.....	17
2.6 DIAGNÓSTICO.....	22
2.7 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE.....	25
2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	26
2.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
3. ARTIGO I – Estudo Filogenetico da Burkholderia spp em isolados de animais suspeitos de Mormo.....	38
4. ARTIGO II – Avaliação da Fixação do Complemento com a utilização de duas metodologias e dois antígenos comercialmente disponíveis e Western Blotting para o diagnóstico do Mormo.....	51

1. INTRODUÇÃO

O mormo é uma doença zoonótica altamente contagiosa e frequentemente fatal, conhecida desde a antiguidade, que acomete principalmente os equídeos, podendo também infectar diversas outras espécies animais. É causado por um bacilo gram-negativo, aeróbio, não esporulado e imóvel, atualmente classificado como *Burkholderia mallei*, transmitida entre os solípedes, principalmente, pela água e alimentos contaminados. Em equídeos podem determinar quadros agudos, mais comuns em asininos e muares, ou crônicos, mais frequente em equinos, apresentando-se de forma cutânea, pulmonar ou mista, presença de abscessos nodulares cutâneos, vasos linfáticos espessados e endurecidos, com nodulações (CDC 2000; SRINIVASAN et al., 2001; ACHA et al., 2003; WAAG et al., 2004; GILAD et al., 2007; OIE, 2015).

Devido ao uso em potencial da *B. mallei* como agente de bioterrorismo, bem como seu impacto sobre a saúde pública em regiões endêmicas, tem ressurgido o interesse no desenvolvimento de testes diagnósticos eficazes. O diagnóstico do mormo pode ser realizado através de investigação sorológica, utilizando diversas metodologias, como o teste de fixação do complemento (FC), hemaglutinação indireta (HAI), contraímuno eletroforese (CIEF), imunoabsorção ligada à enzima (ELISA), western blot (WB), imunoblotting (IB), aglutinação, reação de aglutinação com antígeno corado por rosa bengala (RB) e outras técnicas ou modificações das técnicas conhecidas (NAUREEN et al., 2007; SPRAGUE et al., 2009; ELSCHNER et al., 2011). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Através da Portaria Nº 22, de 16 de março de 2018 do Ministério (BRASIL, 2018), 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).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ETIOLOGIA

Foi descrita inicialmente por Aristóteles e Hipócrates nos séculos III e IV (BLANCOU, 1994), em 1882, através do isolamento do patógeno oriundo de amostras de fígado e baço contaminados com a *B. mallei* (SCHADEWALDT, 1975) e no final do século XVIII por Viborg (WILKINSON, 1981). Classificado pela numeração ID 13373 pelo Centro Nacional para Informação Biotecnológica (NCBI), desde a sua descoberta, o patógeno tem recebido diversas denominações: *Loefflerella mallei* e *Pfeifferellamallei* (HENNING, 1956), *Bacillus mallei*

(LANGENEGGER et al,1960) *Malleomyces mallei* (MERCHANT et al., 1967), *Actinobacillus mallei*, *Corynebacterium mallei*, *Mycobacterium mallei* e *Pseudomonas mallei* e levando como base nas características nutricionais e bioquímicas foi classificada no gênero *Pseudomonas* (REDFEARN et al.,1966) e, posteriormente, foi reagrupada no gênero *Burkholderia*, mantida a espécie. Ainda, neste gênero e fazendo parte de um subgrupo de patógenos *per se*, inclui-se a *Burkholderia pseudomallei*, o agente causador da Melioidose.

A *Burkholderia mallei* é uma bactéria gram-negativa, não móvel, não esporulada cocobacilo aeróbio (LOEFFLER, 1886; YABUUCHI et al., 1992), com as extremidades arredondadas, 2,5nm de comprimento e 0,3-0,8nm de largura, (AL-ANI et al., 1987; OIE, 2015) é um microrganismo intracelular obrigatório de mamíferos (KHAN, 2011).

A bactéria é isolada a partir de amostras de sangue e secreções de animais contaminados (NIERMAN, 2004). Em esfregaços de lesões novas as bactérias são bastante numerosas em relação aos esfregaços de lesões mais antigas. Podem variar de aparência dependendo da idade da cultura e do tipo do meio utilizado para seu isolamento (OIE, 2015). Em culturas antigas, formam ramificações na superfície de culturas de caldo (NEUBAUER, et al., 2005).

No isolamento, obtém coloração com os derivados da anilina e com corantes que contenham hidróxido de potássio ou o ácido fênico como o azul de metileno e a fucsina (MOTA et al., 2005). O enriquecimento em glicerol aumenta o crescimento da *B. mallei* podendo ser seletivamente diferenciada pela sua capacidade de fermentar um subconjunto característico dos hidratos de carbono e sua morfologia de colônias (STEELE, 1980). Cultivada em ágar sangue, onde produz colônias não hemolíticas e acinzentadas, em agar batata glicerinada produz colônias de coloração amarela e em agar PC produz colônias com coloração branca ou translúcidas (MOTA et al., 2000; ROMERO et al., 2006; SILVA et al., 2009). Também pode ser cultivada em meios de cultura de rotina incluindo ágar sangue e MacConkey, apresentando colônias após 48h a 37°C de aspecto viscoso e cremoso. Apresenta oxidase e catalase positiva, redução de nitrato, hidrolisa a uréia, descarboxila a lisina e fermenta a glicose, sendo negativa para a produção de H₂S, indol, não fermenta maltose, lactose, manose e manitol e não utiliza o citrato (HIRSH et al, 2003; AL-ANI et al., 1998; SILVA et al., 2009).

O cocobacilo do mormo é sensível a ação da luz solar, irradiação ultravioleta, calor e desinfetantes comuns como o pergamato de potássio e hipoclorito de sódio na concentração de 500ppm e etanol a 70%, dificilmente sobrevive em ambientes contaminados por mais de seis semanas e é destruído em 10 minutos a 55°C (RADOSTITS, 2002; HIRSH et al, 2003; OIE, 2015).

A microscopia eletrônica mostrou que *B. mallei* possui um núcleo e é composta de uma cápsula de lipopolissacarídeo, sendo esta estrutura responsável pela sua virulência e o gene *wcbF* é essencial para a produção do polissacarídeo capsular (POPOV et al., 1995, 2000; FRITZ et al., 2000; DESHAZER et al., 2001; WHITLOCK et al., 2007). Esta cápsula é constituída por hidratos de carbono neutros e auxilia na proteção a fatores ambientais desfavoráveis, sendo visualizada apenas na microscopia eletrônica (OIE, 2015).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

O mormo é uma doença enzoótica do oriente médio, norte da África e Ásia (ARUN et al., 1999). Foi erradicado com sucesso nos Estados Unidos, Inglaterra e Austrália, sendo endêmico em regiões da África, Ásia, Oriente Médio e América Central e do Sul (WHITLOCK, 2007). Com a utilização da quarentena em animais importados e o controle veterinário massivo, o mormo foi erradicado em várias regiões do oeste europeu em 1939, mas reemergência da doença foi reportada em 1998 no Brasil. Nas últimas décadas, surtos de mormo foram relatados em inúmeros países como o Brasil, Turquia, Índia, Paquistão, Irã, Iraque, Barein, Mongólia, Emirados Árabes Unidos e Kwait (NAUREEN et al., 2007; ELSCHNER et al., 2009; MOTA et al., 2000; BAZARGANI et al., 1996; HORNSTRA et al., 2009; SCHOLZ et al., 2006).

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

Desde que foi descrita há 2000 anos, não houve epidemias documentadas da enfermidade em humanos. Os casos esporádicos têm sido documentados ocorrendo principalmente em veterinários, cuidadores de cavalos e funcionários de matadouros. (FRITZ et al., 2000). Contudo achados de autópsia de nódulos associados ao mormo em um grande número de pessoas em contato com cavalos, sugerem que a prevalência de formas inaparente da doença pode ser maior (HOWE et al., 1971). Esta tese é apoiada por estudos de infecções de mormo em laboratoristas (REDFEARN, 1965). A *Burkholderia mallei* oferece um grande potencial de contaminação quando utilizada sob forma de aerossol, podendo ser utilizada como um agente de arma biológica (OIE, 2015).

Devido à endemia da doença em cavalos europeus no século XX, relatam-se casos de mormo em humanos que ocorreram na Rússia durante a 1ª Guerra Mundial (BRUNERD, 1973),

sendo descrita como crônica por um médico veterinário britânico que contraiu a doença na Índia (GAIGER, 1916 & 1913), sendo o caso mais recente relatado em 2000 pela contaminação de laboratorista (SRINIVASAN, 2001).

2.3 TRANSMISSÃO

Os animais assintomáticos são a principal via de transmissão (MOTA, 2006) sendo o trato aéreo superior, o principal meio de eliminação de secreções contaminadas oriundas de lesões pulmonares causadas pela *B. mallei* (RADOSTITS, 2002) sendo possível também a transmissão através da via aerógena e por infecção de feridas (ACHA et al, 2003). Os carnívoros podem infectar-se através da ingestão de carne de animal infectado e os pequenos ruminantes, através de contato estreito com cavalos infectados (OIE, 2015). O homem pode infectar-se através do contato (com tecidos ou fluidos corporais de animais infectados, inalação de aerossol ou poeira contaminada, sendo considerados como grupos de risco veterinários, tratadores, pessoal de abatedouros e de comercialização de carne equina (ACHA et al, 2003, CDC, 2000, WHITLOCK et al., 2007)

A transmissão do mormo ocorre através da ingestão de água e alimentos contaminados pelas secreções nasais de animais infectados com a forma clínica ou subclínica da doença, através da invasão bacteriana via oral, nasal, membrana das mucosas das conjutivas e por soluções de descontinuidade do tecido cutâneo, podendo também ocorrer pela via genital (RADOSTITS et al., 2002). O envolvimento dos pulmões e do trato respiratório superior é comum, sendo manifestada por uma pneumonia ou pleurite regional ou difusa e um exsudato nasal, onde é carregada a bactéria (WAAG et al, 2004). A infecção por inalação de aerossóis é rara (LANGENEGER et al., 1960; HIRSH E ZEE et al., 2003). Utensílios, alimentos e água contaminados são de grande importância na cadeia de transmissão do mormo por veicular o agente (HUTYRA & MAREK, 1926). A capacidade de sobrevivência do bacilo do mormo indicou que as fontes de água podem permanecer contaminadas por longo tempo, tornando-se uma das principais fontes de contaminação (GANGULEE, 1966). As secreções nasais e exsudatos de pele de animais com mormo contêm um número considerável de bactérias ativas que podem facilmente contaminar ferramentas utilizadas no manejo dos animais (GREGORY et al, 2007). O risco de transmissão é maior enquanto permanecer as condições insalubres de manejo, aglomeração de equídeos, partilha de fômites, equipamentos de contenção e equitação nas áreas onde ocorra a doença (WITHLOCK et al., 2007).

O mormo é transmitido aos humanos através de contato com material contaminado e animais doentes por secreções oriundas do trato respiratório e infecções cutâneas (OIE, 2015), ocorrendo mortalidade dentro de três semanas se não iniciado tratamento (NEUBAUER, 1997), com múltiplas terapias com antibióticos de ação sistêmica (KHAN, 2001 E SRINIVASAN, 2001).

2.4 PATOGENIA E PATOLOGIA

A *B. mallei* geralmente penetra no organismo por meio das mucosas do trato digestivo, por soluções de continuidade na pele ou por mucosas dos olhos e nariz. Ao penetrar no organismo a *B. mallei* produz lesões na porta de entrada, especialmente na faringe e septos nasais, a mucosa geralmente apresenta congestão e lesão primária granulomatosa ou formações nodulares que podem ulcerar, apresentando exsudato muco purulento com estrias de sangue (MOTA et al, 2000; HIRSH et al, 2003; SHARRER, 1995).

No septo nasal ocorre lesões de origem hematogena ou secundária a um foco pulmonar (PRITCHARD et al., 1995; SHARRER, 1995; HIRSH et al, 2003). Nestes locais, causam intenso processo inflamatório, sendo fagocitadas por macrófagos, caindo na corrente linfática e atingindo os linfonodos, provocando inflamação. São então drenadas até o ducto torácico, caem na circulação, provocando nos pulmões pneumonia. Deste modo, ocorre bacteremia cíclica (MANDELL et al., 1995).

Nos pulmões e em outros órgãos como fígado e baço, há presença de nódulos de consistência firme (piogranulatomatosos) que são formados a partir da infiltração de neutrófilos, hemácias e fibrina, formando uma área necrótica formada por leucócitos infiltrados no tecido de granulação (HIRSH et al., 2003). Podem haver áreas de inflamação proliferativa, localizadas no fígado e baço com o aparecimento de hemorragias petequiais e múltiplos abscessos, pleurite fibrosa com aderência e espessamento da pleura (SANTOS et al., 2001; MOTA et al., 2000).

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

O aspecto chave da patogênese da *B. mallei* e *B. pseudomallei* é a sua capacidade de invadir e se multiplicar dentro de uma variedade de células eucariotas, onde as bactérias são blindadas da resposta imune humoral do hospedeiro e da ação de antibióticos (BALDER et al., 2010). Uma vez internalizada nas células, a bactérias produz vacúolos e adentram no citoplasma onde se multiplicam, atingindo células vizinhas através de ligações da sua membrana promovendo uma ponte que interligam uma célula a outra. O mecanismo intracelular é crucial

para a virulência e têm sido o foco de pesquisas para compreensão da patogênese e mecanismos terapêuticos (WIERSINGA et al., 2006; GALYOV et al., 2010; WHITLOCK et al., 2007; RIBOT et al, 2006).

2.5 SINTOMATOLOGIA

Clinicamente o mormo afeta o sistema respiratório e linfático, causando mortalidade e morbidade elevadas (MOTA et al., 2000), podendo assumir três formas distintas: nasal, pulmonar e cutânea, a depender da localização da lesão primária (HUNTING 1887; FERNANDEZ et al, 2015). A bactéria geralmente penetra no organismo através de feridas cutâneas, olhos, boca e nariz, ocasionando o aparecimento inicial de febre, mal-estar, indícios de sinais de pneumonia, pústulas e abscessos (MANDELL et al., 1995). Pode-se resumir que é primariamente uma doença da pele, vasos linfáticos e trato respiratório dos equídeos (RAF, 1984; JULINI, 1990), sendo o aspecto mais comum da infecção em animais é o aparecimento e descarga nasal de cor amarelada, nódulos nasais e cutâneos e aumento dos gânglios linfáticos (MOTA et al., 2010).

O Mormo se desenvolve com dois cursos clínicos: um agudo, que acomete os asininos e muares, causando morte dentro de um prazo de quatro a sete dias, e outro, crônico, acometendo, sobretudo, os equinos que demonstram uma maior resistência ao aparecimento dos sinais clínicos da doença (FRITZ et al., 2000; DeSHAZER; WAAG, 2001), sendo também relatado uma forma subaguda da doença (GILAD, 2007). Os animais podem apresentar uma ou as três formas da doença simultaneamente (JUBB, 1993).

Geralmente os asininos e muares apresentam a forma aguda da infecção caracterizada com o aparecimento de febre alta, diminuição do apetite e emagrecimento e ulceração do septo nasal acompanhando inicialmente a descarga muco-purulenta (Foto 1) podendo evoluir para uma descarga hemorrágica e nódulos nas cavidades nasais (AL-ANI et al., 1998; WHITLOCK et al., 2007). Os equinos também podem ser acometidos pela forma aguda da doença (LARSEN et al, 2009), sendo observados presença de nódulos nasais (Foto 2), descarga nasal inicialmente serosa, evoluindo para mucopurulenta, aumento dos linfonodos submaxilares na região do pescoço (Foto 3) e na região do mediastino e dispneia (SANTOS et al., 2001; LARSEN et al, 2009). Os sinais clínicos mais comumente observados são o corrimento nasal, febre, aparecimento de lesões cutâneas (Foto 4) que posteriormente evoluem para úlceras que se disseminam pela mucosa nasal e nódulos na pele (Foto 5) e nas extremidades dos membros (Foto 6) e abdômen. Tosse e febre alta refletem a broncopneumonia que caracteriza a forma

aguda, onde as lesões pulmonares são mais discretas com presença de nódulos granulomatosos com centro caseoso e neutrófilos degenerados (ZUBAIDY et al, 1978).

Animais cronicamente infectados apresentam uma grande variedade de sinais clínicos que dependem da via de infecção, incluindo secreção nasal que evolui de mucosa a purulenta, lesões pulmonares e nódulos envolvendo o fígado e baço (WITHLOCK, 2007). Os animais podem apresentar descarga nasal purulenta, podendo conter estrias de sangue, congestão, erosões e úlceras no septo nasal (MOTA et al., 2000), nódulos de consistência firme na pele (Foto 7), que drenam secreção purulenta amarelada (SHARRER, 1995; AL-ANI et al., 1998; MOTA et al., 2000; MOTA, 2006). A forma pulmonar pode aparecer inaparente por longos períodos, quando há o aparecimento dos sinais clínicos, estes consistem em hipertermia, tosse, depressão, e perda de peso. Em estágios mais avançados há dispneia com a presença de estertores pulmonares. Lesões pulmonares usualmente são oriundas de focos de pneumonia com aspecto branco acinzentado, bordos avermelhados, centro caseoso ou calcificado circundado por tecido fibroso (PAN AMERICAN HEALTH, 2001). A forma pulmonar é a manifestação clínica mais importante em equinos com mormo, sendo caracterizada pela formação de nódulos encapsulados e firmes ao longo do tecido pulmonar (ZUBAIDY et al, 1978).

A forma nasal é caracterizada pelo aparecimento inicial de secreção serosa unilateral, podendo evoluir para uma descarga mucopurulenta ou hemorrágica bilateral, há o aparecimento de ulcerações dos nódulos e posteriormente necrose na mucosa (SANTOS et al., 2001). As úlceras possuem centro acinzentado com bordas grossas e irregulares. Pode também ocorrer perfuração nasal. As lesões no septo nasal, se iniciam com nódulos e evoluem para úlceras, que após a cicatrização iniciarão cicatrizes em forma de estrelas (Foto 8) (MOTA et al., 1999), considerado lesão patognomônica do Mormo.

A forma cutânea inicia-se com aparecimento superficial de pequenos nódulos que drenam um líquido oleoso, alguns autores consideram que a forma nasal e cutânea é secundária a forma pulmonar (PAN AMERICANO HEALTH, 2001). São observados no sistema linfático, grandes nódulos de consistência firme que drenam uma secreção purulenta de cor amarelada e edemas ventrais e prepuciais (JUBB, 1993; MOTA et al., 2000; AL-ANI et al., 1998; BAZARGANI et al., 1996; KRISHNA et al., 1992).

Em alguns animais há o aparecimento de pneumonia e podendo ocorrer uma grande variedade de outras síndromes como abscessos prostáticos, encefalomielite paralítica e formação de abscessos intra-abdominal (BERGER, 2001, CURRIE, 2003, VORACHIT, 2000).

A infecção pela *B. mallei*, também causa anemia grave devido à depressão da atividade eritropoiética na medula óssea (AL-KAFAWI et al., 1977).

Em humanos o mormo se apresenta com aumento dos gânglios linfáticos, nódulos no trato respiratório que ulceram emagrecimento, perda da capacidade respiratória e inúmeros abscessos subcutâneos (WAAG et al., 2004; NEUBAUER et al., 1997). Aparecimento de pneumonia, broncopneumonia com ou sem bacteremia. Abscessos pulmonares, efusão pleural, e empiema podem ocorrer. Na forma aguda há descarga nasal e lesões granulomatosas no pulmão na forma crônica, podendo haver ulcerações na mucosa nasal e faringe (PAN AMERICANO HEALTH, 2001). A forma crônica é associada a múltiplos abscessos subcutâneos e intramusculares, linfadenopatia e linfangite e a ocorrência de infecções secundárias (GILAD, 2007). Na lesão cutânea, provocada pela entrada do microrganismo no hospedeiro, é possível verificar celulite com vesiculação, ulceração, linfangite e linfadenopatia (PAN AMERICAN HEALTH, 2001), também observada por MOTA, (2008) através da inoculação da *B. mallei* em camundongos.



Foto 1: descarga nasal mucopurulenta - fonte: ULSAV Palmares/ ADAGRO/PE



Foto 2: abscessos nasais - fonte: ULSAV Palmares/ ADAGRO/PE



Foto 3: aumento dos linfonodos submaxilares na região do pescoço- Fonte: Arquivo Pessoal



Foto 4: lesões cutâneas - fonte: ULSAV Palmares/ ADAGRO/PE



Foto 5: Nódulos cutâneos - Fonte: ULSAV
Palmares/ ADAGRO/PE



Foto 6: Nódulos nas extremidades - Fonte:
ULSAV Palmares/ ADAGRO/PE



Foto 7: Nódulos cutâneos - Fonte: ULSAV
Palmares/ ADAGRO/PE

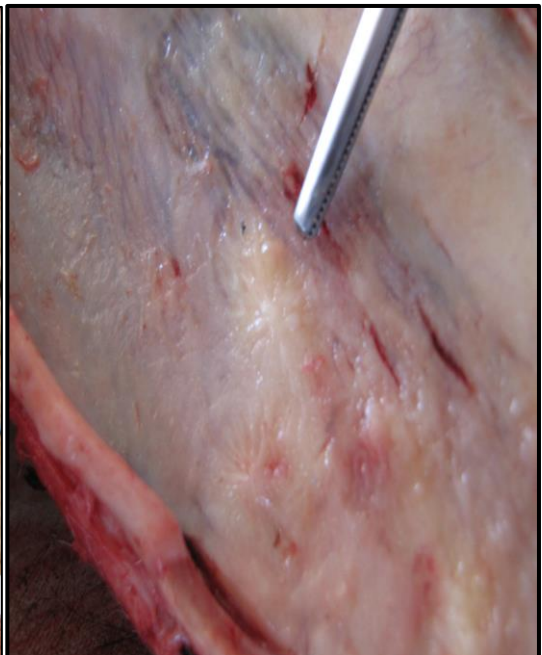


Foto 8: Lesão em forma de estrela - Fonte:
SDA/DF

2.6 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico e bacteriológico do mormo é bastante difícil em estágios iniciais da doença, pois em quase 90% dos casos são inaparentes (NEUBAUER, 1997). A confirmação do diagnóstico da *Burkholderia mallei*, deve ser feita através do isolamento e identificação do agente em amostras clínicas, sendo este considerado o teste ouro para a detecção do mormo é (BLUE et al, 1998; OIE, 2015). A presença de lesões nodulares, úlceras, cicatrizes na mucosa nasal, abscessos, presença de nódulos firmes na pele e cicatrizes cutâneas, contribuem para aumentar a suspeita do mormo (PRITCHARD, 1995; SHARRER, 1995; MOTA et al., 2000; SANTOS et al., 2001).

O gênero *Burkholderia*, contém mais de 20 espécies válidas dos quais 3 são patógenos significativos (*B. mallei*, *B. pseudomallei* e *B. cepacea*). Os métodos para isolar e identificá-las podem incluir culturas de base, complexo antígeno-anticorpo e técnicas moleculares, sendo o isolamento de *B. mallei* exigindo crescimento em meios especializados (INGLIS, 1998). Devido ao baixo número de bactérias no tecido infectado, nos abscessos e em pus excretado, o cultivo em meios líquidos ou sólidos é frequentemente negativo, além de demandar tempo para um resultado conclusivo. Se o material é originário de animais com doença sem sinais clínicos ou em casos crônicos o isolamento bacteriológico fica ainda mais difícil (ARUN et al., 1999; BONGERT, 1927; MILER et al., 1948). O processamento deve ser realizado em laboratórios que possuem nível de biossegurança 2. O nível de biossegurança 2 é aplicado para laboratórios clínicos, de diagnóstico, de ensino e pesquisa ou de produção onde o trabalho com microrganismos possa causar doenças sérias ou potencialmente fatais como resultado de exposição (BRASIL, 2006), o que não está disponível na maioria dos laboratórios.

O diagnóstico do mormo ainda depende de provas sorológicas, que consiste no teste da fixação do complemento (FC) e aglutinação ou para identificação de uma reação de hipersensibilidade tardia baseada na aplicação da Maleína (NEUBAUER, 2005 E OIE 2015). O teste é realizado através da inoculação da PPD (Proteína Pura Purificada) na dose de 0,1 ml por via intradérmica na pálpebra inferior de um dos olhos do animal (BRASIL, 2018). Uma resposta positiva é caracterizada por inchaço ocular, fotossensibilidade, lacrimejamento e inflamação supurativa, dentro de 48 horas após a inoculação (BRASIL, 2018).

A maleína é um teste comumente utilizado para o diagnóstico do mormo, porém sua limitação em termos de sensibilidade e especificidade em animais que possuem sinais clínicos avançados da doença são baixos. Além disso a eficiência do teste está associada as estirpes de *B. mallei* utilizadas na preparação do composto, podendo acarretar em reações inespecíficas

(VERMA, 1990). Reações cruzadas também foram notificadas após maleinização entre *B. mallei* e *Streptococcus equi*, resultando em reações falso-positivas (HUTYRA, 1949; MINETT, 1959; AL-ANI et al., 1993; NEUBAUER et al., 2005).

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). Em estudo recente avaliando o desempenho de quatro técnicas sorológicas, mostrou que nenhuma melhora significativa da sensibilidade é alcançada quando utilizado antígenos preparados com células inteiras brutas (NAUREEN, 2007).

A OIE (2015) também prescreve métodos alternativos de ensaios, porém a sensibilidade como a Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR), PCR-RFLP, ELISA, Immunoblotting e teste Rosa Bengala. Um ensaio imunoblotting foi desenvolvido para o diagnóstico do mormo, mas uma validação foi dificultada devido à falta de um painel de controle de soros positivos (KATZ et al., 1999).

O desenvolvimento de uma imuno transferência, utilizando antígeno da membrana de lipopolissacarídeo de *B. mallei*, foi iniciado com o objetivo de obter um teste mais sensível que a FC a fim de testar soros falsos positivos pela técnica em áreas endêmicas (ELSCHNER et al., 2011). No entanto, alguns procedimentos biológicos são complexos e dependentes de mão de obra especializada e equipamentos caros tornando inviável sua aplicação como meio de diagnóstico a campo (NAUREEN et al, 2007).

A membrana de lipopolissacarídeo é conhecida por desempenhar um papel chave nas interações de bactérias com o sistema imune do hospedeiro. Entretanto, porções de oligopolissacarídeos, são considerados os componentes mais imunodominantes das moléculas de bactérias que possuem LPS (REEVES, 1995). Recentemente, as regiões SNPs (single-nucleotide polymorphism) demonstraram serem importantes marcadores para a identificação de agentes de bioterrorismo (U'REN et al, 2005). Isto é devido ao fato de que essas regiões são consideradas marcadores estáveis sendo menos propensos a mutação do que outros marcadores, portanto são poderosos identificadores filogenéticos para a tipagem molecular de bactérias. Utilizando uma TaqMan criada a partir das regiões SNP e sinônimo a ela, Uren et al (2005), conseguiu identificar 37 cepas da *B. mallei* e diferenciá-las da *B. pseudomallei*, *B. thailandensis* e *B. cepacea*.

Ensaio antígeno-específico como a imunofluorescência direta (WUTHIEKANUN et al., 2002) e aglutinação em látex (WUTHIEKANUN et al., 2005), provaram ser rápidos e

sensíveis, mas ainda não estão disponíveis comercialmente. O PCR em tempo real (THIBAUT, 2004 & NOVAK, 2006), PCR multiplex (LEE et al., 2005), sequenciamento (GEE, 2003) e amplificação do DNA isotérmica (CHANTRATITA, 2008) mostraram-se como alternativas rápidas de diagnóstico, porém poucos foram validados para robustez e especificidade. Ensaios que detectam regiões específicas para marcadores filogenéticos da *B. mallei* e sua diferenciação da *B. pseudomallei* também foram investigados a fim de permitir ensaios altamente específicos (BOWERS, 2010).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), através da Portaria nº 16 da Secretaria de Defesa Agropecuária (BRASIL, 2018, de 16 de março de 2018, determina que o diagnóstico sorológico do mormo deverá ser realizado pela prova de fixação de complemento (FC) ou ELISA como testes de triagem e os animais reagentes deverão ser confirmados através do Western Blotting. Os animais poderão ser submetidos ao teste da maleína quando for reagente ficando a critério da Secretária de Defesa Animal. Animais que forem reagentes a FC ou ELISA e confirmados no Western Blotting e apresentarem sinais clínicos da doença ou procedentes de áreas reincidentes, serão imediatamente sacrificados e a propriedade submetida a regime de saneamento, sendo liberada após a realização de dois testes consecutivos de todo o plantel, com intervalos de 45 a 90 dias, com resultados negativos na FC (BRASIL, 2018).

O teste de FC também é recomendado para o diagnóstico do mormo pela OIE para trânsito internacional de animais (OIE, 2015). A FC é o único teste sorológico oficialmente reconhecido para trânsito internacional de eqüídeos, com uma sensibilidade de 97% comparado ao isolamento bacteriano (CRAVITZ, 1950), mas com uma possibilidade de ocorrerem resultados inespecíficos, como falso-negativos e falso-positivos (MANNINGER, 1945 e TURNBULL, 2002). A reação cruzada com *B. pseudomallei*, agente causador da melioidose, também pode ser observada, devido à semelhança dos microrganismos (USAHA, 2011). O diagnóstico da FC baseia-se na detecção de anticorpos específicos do tipo IgG contra a *B. mallei* que são detectados já com uma semana após a infecção, situando-se o intervalo temporal de 4 a 12 semanas, após a infecção, sendo o melhor período para a realização do exame (SCHLATER, 1992).

2.7 TRATAMENTO, PREVENÇÃO E CONTROLE

Não há tratamento específico que elimine a bactéria do organismo animal e não há vacina eficiente que produza uma resposta imunológica satisfatória contra o Mormo. Estudos recentes demonstram a susceptibilidade da *B. mallei* a antibióticos testados in vitro, porém não

havendo sucesso na erradicação do agente do organismo dos animais quando desafiado em laboratório (JUDY et al., 2009 & MANZENIUK et al., 1994). SAQIB et al (2002), demonstrou que o tratamento a longo prazo com combinações de diversos antibióticos, parecem confirmar o desaparecimento do agente do organismo.

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), sulfametazol-trimetopina (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).

Em estudos recentes para elaboração de uma vacina eficaz com a utilização da bactéria atenuada, foi identificado que as células T são as estruturas críticas para uma produção de uma resposta imune para infecção pela *Burkholderia mallei*. Os desafios enfrentados pelo desenvolvimento da vacina *B.mallei* e *B. pseudomallei* incluem a identificação de antígenos amplamente protetores, a concepção de sistemas eficientes de administração de vacinas e sistemas adjuvantes e uma melhor compreensão dos correlatos de proteção contra a infecção aguda e crônica. A capacidade de direcionar fatores de virulência bacteriana com vacinas tem potencial para atenuar consideravelmente a patogenicidade *Burkholderia* e assim suprimir a replicação, permitindo que o sistema imunológico do hospedeiro elimine a bactéria antes da infecção ser estabelecida (SILVA et al., 2013). Um fator complicador para elaboração de vacina eficaz é a capacidade da *B. mallei* ter a capacidade de 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 et al, 2008).

Não havendo nenhuma vacina eficaz contra a infecção pela *B. mallei*, a prevenção do Mormo consiste no teste de rotina e sorologia periódica de todos os equídeos e a eliminação dos animais reagentes a fixação do complemento e aos demais testes que podem ser utilizados concomitantemente. Deve haver a incineração ou enterro dos cadáveres no próprio local, à desinfecção das instalações e fômites, sob supervisão do serviço veterinário oficial, interdição e sorologia da propriedade com foco comprovado da doença (BRASIL, 2018).

2.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O mormo é uma zoonose e a importância da *B. mallei*, apesar do baixo número de casos de ocorrência de mormo em humanos, 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) e não havendo nenhuma vacina eficaz contra a infecção pela *B. mallei*, a prevenção do Mormo consiste no teste de rotina e sorologia periódica de todos os equídeos e a eliminação dos animais reagentes a fixação do complemento e aos demais testes que podem ser utilizados concomitantemente.

2.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

BONGERT, J. R. In *Bakteriologische diagnostik der tierseuchen*. Ed. R Choltz, *Bakteriologische diagnostik der tierseuchen*. (7th Ed.) Berlin: Verlag sbuchhandlung, PP 406-455. 1927.

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

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

BRASIL. 2017. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Ciência e Tecnologia. Portaria Nº 2.349, de 14 de setembro de 2017.

BRASIL. 2018. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Portaria nº 22, de 16 de março de 2018, da Secretaria de Defesa Agropecuária, publicada no Diário Oficial da União em 20 de março de 2018, seção 1, página 5.

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.

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

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

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

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

- CURRIE, B. J., JACUPS, S. P. Intensity of rainfall and severity of melioidosis, Australia. *Emerg Infect Dis.* 9: 1538–42. 2003.
- DESHAZER, D., WAAG, D. M., FRITZ, D. L., WOODS, D.E. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. *MicrobPathog.*,30: 253–269. 2001.
- EASTERDAY, W. R., VAN ERT, M. N., SIMONSON, T. S., WAGNER, D. M., KENEFIC, L. J., ALLENDER, C. J., KEIM, P. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. *J. Clin. Microbiol.* 43:1995–1997. 2005.
- ELSCHNER, M. C., KLAUS, C. U., LIEBLER-TENORIO, E., SCHMOOCK, G., WOHLSEIN, P., TINSCHMANN, O., LANGE, E., KADEN, V., KLOPFLEISCH, R., MELZER, F., RASSBACH, A. & NEUBAUER, H. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. *Equine Veterinary Education* 21, 147-150. 2009.
- ELSCHNER, M. et al. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Veterinary Research*, v.7, p.4. 2011.
- FERNANDEZ, P. J., WHITE, W. R.. Glanders. In: *Atlas of Transboundary Animal Diseases*. OIE, World Organisation for Animal Health (ed.), Paris, France. NB: version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2015. http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/GLANDERS__FINAL.pdf - 2015.
- FRITZ, D.L.; VOGEL, P.; BROWN, D.R.; DESHAZER, D.; WAAG, D.M. Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*). *Vet Pathol*, 37: 626–636. 2000.
- GAIGER, S.H. Glanders in man. *J Comp Pathol* 26:233-236. 1913.
- GAIGERS, .H. Glanders in man. *J Comp Pathol* 29:26-46. 1916.
- GALYOV, E. E., BRETT, P. J., DESHAZER, D. Molecular Insights *into Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei* Pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 64:495-517. 2010
- GANGULEE, P. C., G. P. SEN, G. L. SHARMA. Serological diagnosis of glanders by haemagglutination test. *Indian Vet. J.* 43, 386-391. 1966.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

HUTYRA, F., J. MAREK. Special Pathology and Therapeutics of Domestic Animals, 1ª ed. 1926.

INGLIS, T. J., CHIANG, D., LEE, G. S., CHOR-KIANG, L. Potential misidentification of *Burkholderia pseudomallei* by API 20NE. Pathology.30:62–4. 1998.

- JUBB, K.V.F; KENNEDY, P. C.; PLAMER, N. Pathology of domestic animals. 4. Ed. New York: Academic Press. V.2.cap.6,p.552-555. 1993.
- JUDY, B. M., WHITLOCK, G. C., TORRES, A. G, ESTES, D. M. Comparison of the in vitro and in vivo susceptibilities of *Burkholderia mallei* to Ceftazidime and Levofloxacin. BMC Microbiol. 9:88. 2009
- JULINI, M. The Turin Vandelicglanders commission of 1847-1848. Obiettivi. Documenti.Vet. 11, 44-45. 1990.
- KATZ, J. B., CHIEVES, L. P., HENNAGER, S. G., NICHOLSON, J. M., FISHER, T. A., BYERS, P. E. Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine, and glanders using an arrayed immunoblotting method. J Vet Diagn Invest 11:292–294. 1999.
- KHAN A.S. & ASHFORD D.A. Ready or not – Preparedness for bioterrorism. New Engl. J. Med., 345, 287–289. 2001.
- KHAN, I.; WIELER, L.H.; MELZER, F. et al. Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. Veterinary Record. London, v.169, n.19, p.495-499, 2011.
- KRISHNA, L.; GUPTA, V.K.; MASAND, M.R. pathomorfological study of possible glanders in solipedes in himachalpreadesh. IndianVeterinaryJournal, n. 69, p.211-214,1992.
- LANGENEGGER, J., DOBEREINER, J., LIMA, A. C. Foco de Mormo (*Malleus*) na região de Campos, estado do Rio de Janeiro 1960. Arq. Inst. Biol. Anim v.3,p.91-108,1960.
- LARSEN, J. C.; JOHNSON, N. S. Pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. Military Medicine, v.174, n.6, p.647-651, 2009.
- LEE, M. A., WANG, D., YAP, E. H. Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. FEMS Immunol Med Microbiol 43: 413–417. 2005.
- LOEFFLER, F. Die Ätiologie der Rotzkrankheit. Arb Kaiserl Gesundh Amt Berlin 1: 141-198, 1886.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

NCBI - Centro Nacional para Informação Biotecnológica – em ncbi.nlm.nih.gov. Acesso em 25/10/2017.

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

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

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

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

OIE – World Animal Health Organization. Disponível em: http://www.oie.int/wahis/public.php?page=disease_timelines&disease_type=Terrestrial&disease_id=63. In: Atlas of Transboundary Animal Diseases. OIE, World Organisation for Animal Health (ed.), Paris, France. NB: version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2015.

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

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

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

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

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

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

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

RAF, P. O. Rehnquistand glanders in Stockholm in 1780. Svensk Vet. 36, 299-304. 1984.

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

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

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

- ROMERO, C.M., D. DESHAZER, T. FELDBLYUM, J. RAVEL AND D. WOODS *ET AL.*, 2006. Genome sequence alterations detected upon passage of *Burkholderia mallei* ATCC 23344 in culture and in mammalian hosts. *BMC Genomics*, Vol. 7. 10.1186/1471-2164-7-228
- 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
- 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.
- SCHLATER, L. K. Glanders, in *Current Therapy in Equine Medicine*. 1992.
- SCHOLZ, H. C., JOSEPH, M., TOMASO, H., AL DAHOUK, S., WITTE, A., KINNE, J., HAGEN, R. M., WERNERY, R., WERNERY, U. & NEUBAUER, H. Detection of the re-emerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based PCR assay. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 54, 241-247. 2006
- SHARRER, G.T. The great glanders epizootic. *Agric. Hist.* 69:79-97. 1995.
- 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.
- SILVA, E.B., DOW, S. W. Development of *Burkholderia mallei* and *pseudomallei* vaccines. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 3 – article 10, 2013.
- SPRAGUE, L. D. et al. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. *BMC Veterinary Research*, v.5, n.32, p1-6, 2009.
- SRINIVASAN, A., KRAUS, C.N., DESHAZER, D., BECKER, P.M., DICK, J.D., SPACEK, L., BARTLETT, J.G., BYRNE, W.R., THOMAS, D.L. Glanders in a military research microbiologist. *New Engl. J. Med.*, 345, 256–258. 2001.
- STEELE, J. H. Bacterial, rickettsial and mycotic diseases. In: Steele, J.H. (ed.), *CRC Handbook Series in Zoonoses, Section A*, pp. 339–351. CRC Press, Boca Raton, USA. 1980.

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. *J Clin Microbiol* 42: 5871–5874. 2004.

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

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

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

VERMA, R. D. A micro-complement fixation test for identification of *Pseudomonas mallei*. *J Rem Vet Corps* 29:1–5. : 1990.

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

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

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

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

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

WUTHIEKANUN, V., ANUNTAGOOL, N., WHITE, N. J., SIRISINHA, S. Short report: A rapid method for the differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia thailandensis*. Am J Trop Med Hyg 66: 759–761. 2002.

WUTHIEKANUN, V., DESAKORN, V., WONGSUVAN, G., AMORNCHAI, P., CHENG A. C. Rapid immunofluorescence microscopy for diagnosis of melioidosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12: 555–556. 2005.

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

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

ESTUDO FILOGENÉTICO DE *Burkholderia spp* PRESENTE EM ISOLADOS
BACTERIANOS DE ANIMAIS SUSPEITOS DE MORMO NO BRASIL

Cecilia Maria de Souza Leão e Silva¹, Vânia Lucia de Assis Santana², Antônio Augusto
Fonseca Júnior², Érica Bravo Sales², Manoel Adrião Gomes Filho⁴

1 Universidade Federal Rural de Pernambuco, doutoranda

2 Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/PE

3 Laboratório Nacional Agropecuário/MG

4 Universidade Federal Rural de Pernambuco

Resumo

O Mormo é em uma enfermidade zoonótica, infecto-contagiosa e fatal, causada pela *Burkholderia mallei*. Desde a confirmação de um caso na região nordeste em 1999, a doença vem sendo diagnosticada no país inteiro e tem gerado diversos impactos econômicos e sociais no setor de equideocultura. Os mecanismos de virulência e patogênese desta enfermidade ainda não são plenamente conhecidos até hoje. O diagnóstico desta enfermidade ainda é um desafio. De acordo com a OIE o diagnóstico compreende o teste sorológico, alérgico e o isolamento bacteriano, sendo a fixação do complemento o teste oficial a ser realizado para trânsito de animal e o isolamento bacteriano considerado teste ouro para a identificação do agente. A partir do isolamento bacteriano foram identificadas a presença da *Burkholderia* em onze amostras oriundas de vigilância epidemiológica em áreas focos da doença. O sequenciamento demonstrou a similaridade entre as cepas de *Burkholderia mallei* e *B. pseudomallei*. Os resultados proporcionam o conhecimento da epidemiologia e virulência da doença, auxiliando posteriormente nas de medidas de controle e erradicação da enfermidade.

Palavras-chave: estirpe, *Burkholderia spp*, biologia molecular, virulência.

Abstract1

Mormo is a zoonotic, infectious-contagious and fatal disease caused by *Burkholderia mallei*. Since the confirmation of a case in the northeast region in 1999, the disease has been diagnosed throughout the country and has generated several economic and social impacts in the equideoculture sector. The mechanisms of virulence and pathogenesis of this disease are not yet fully known until today. The diagnosis of this disease is still a challenge. According to the OIE, the diagnosis includes the serological test, allergy and bacterial isolation, complement fixation being the official test to be performed for animal transit and bacterial isolation considered as a gold test for the identification of the agent. From the bacterial isolation, the presence of *Burkholderia* was identified in eleven samples from epidemiological surveillance in the foci of the disease. Sequencing demonstrated the similarity between the strains of *Burkholderia mallei* and *B. pseudomallei*. The results provide the knowledge of the epidemiology and virulence of the disease, later helping in the control measures and eradication of the disease.

Keyword: strain, *Burkholderia spp*, molecular biological, virulence.

INTRODUÇÃO

As espécies *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei* pertencem ao grupo bactérias gram negativas relacionadas na lista de doenças da Organização Mundial para a Saúde Animal (OIE) com importância de saúde pública (DERBYSHIRE, 2002; ULRICH et al., 2006; WHITLOCK et al, 2007; LOSADA et.al, 2010). São espécies que possuem similaridade tanto em seu genoma e microbiologia, quanto nos problemas oriundos de seu diagnóstico preciso e sendo um fator de disseminação de zoonose. *B. pseudomallei* é um patógeno facultativo, saprófito do solo e de áreas quentes provocando Melioidose em humanos e equídeos, enquanto a *B. mallei* é um agente intracelular obrigatório que causa o Mormo em equídeos (BOWERS et al., 2010). Ambas são transmitidas através da inalação de aerossóis de bactérias provenientes de animais infectados e por soluções de continuidade da pele (RADOSTITS et al., 2002), além de produzir semelhante sintomatologia como febre, pneumonia, septicemia e formação de abscessos (CHON et al., 2013). O padrão de diagnóstico atual para a melioidose é cultura microbiana. No entanto, a melioidose é de difícil diagnóstico devido às suas diversas

manifestações clínicas, inadequação dos métodos convencionais de identificação bacteriana e a falta de laboratórios microbiológicos em países em desenvolvimento.

No Brasil, a doença reapareceu em 1999, com casos localizados no Estado de Pernambuco, Nordeste do Brasil (MOTA *et al.*, 1999), sendo implementado um programa de controle e erradicação da doença. Nos últimos anos, a doença que era restrita a estados do Nordeste brasileiro, teve casos diagnosticados em outros estados do Brasil, como São Paulo, Distrito Federal, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Santa Catarina (OIE, 2016).

Os mecanismos de virulência e patogênese do mormo e da melioidose ainda não são plenamente conhecidos até hoje e os estudos do mormo se restringem ao método a ser empregado para diagnóstico, desenho da população a ser estudada, além do método de amostragem. Por essa questão, não há um estudo epidemiológico para se determinar a caracterização da bactéria no território brasileiro

Objetivou-se com este trabalho realizar a análise filogenética de amostras isoladas em propriedades foco do Mormo submetidas ao regime de vigilância sanitária para saneamento, melhor compreensão da doença e investigar se a análise filogenética está associada com a resposta sorológica.

MATERIAL E MÉTODOS

Isolamento Bacteriano

O isolamento bacteriano considerado como o teste Gold para o diagnóstico e identificação da *Burkholderia mallei* foi realizado de acordo com o “Terrestrial Manual Health Code” (OIE, 2016).

Extração do DNA e Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR)

A extração do DNA foi realizada através de kits conforme recomendação do fabricante (Kit High Pure PCR Template, ROCHE®), tanto para amostras de soro e tecidos, como para colônias de bactérias.

Para o qPCR foi utilizado o sistema LightCycler Real-Time, ROCHE® sonda BmafliP probe 5’6FAM-CAG-GTC-AAC-GAG-CTT-CAC-GCG-GAT-C-3’-BHQ1. Foram utilizados os primers BmafliP-F 5’-CCC-ATT-GGC-CCT-ATC-GAA-G-3’, BmafliP-R 3’-GCC-CGA-CGA-GCA-CCT-GAT-T-5’ (SCHOLZ *et al.*, 2006) com os seguintes ciclos: 95°C 10 minutos,

95°C por 2 segundos, 63°C por 20 segundos e 40°C por 30 segundos, totalizando 50 ciclos. Nas reações utilizaram controle positivo padrões positivo e negativo do laboratório de referência para o mormo da OIE.

Reação em Cadeia de Polimerase convencional (PCR)

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

Foram utilizados os primers BmafliP-F CCCATTGGCCCTATCGAAG, BmafliP-R GCCCGACGAGCACCTGATT (SCHOLZ et al., 2006), com seguintes ciclos em termociclador de 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 segundos, seguido de 50 ciclos de 95°C por 2 segundos e 73°C por 1 minuto. As reações utilizaram como controle positivo amostras de referência do Friedrich-Loeffler Institute, Alemanha.

Sequenciamento

O sequenciamento genético foi realizado utilizando-se o Big Dye Terminator Cycle Sequence (Applied Biosystems) seguindo as recomendações do fabricante, tanto as amostras de soro, tecidos e isolados bacterianos. A edição das sequências foi realizada no programa Bioedit v.7.0.9 e o contig montado submetido ao BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para comparação da sequência obtida com outras disponíveis no banco de dados genético mundial (GenBank), incluindo a cepa padrão ATCC 15310 além da comparação com amostras de bactérias semelhantes às do gênero daquela causadora do Mormo (tabela 1).

Tabela 1 – Sequência dos oligonucleotídeos usados para a amplificação da região E2 na RT-PCR.

Primer	Sequências
Nark	F: CTA ₂ CTCGTGC ₂ GCTGGGAT R: GACGATGACGGCACCCAC
Burk.LyrsR .475	F: AATTGGTCGCCGTGATAGAC R: TCGGCTCGATGGAAAGTAAC
Burk.hypp ort.457	F: TGTTGACGACGCCTACCATA R: TGCTGCACCTTTGACCTGTA
Burk.Bm8	F: TGGCTCTCAAGATCAAGCTG R: GTGTTGAGCTTCATGGTGGT
Burk. Bm12	F: TCTGAACCTGAAGGAGAAAATGA R: ACGTTACGCAGCGAGTCTTTAC
Burk. Bm17	F: TATACGCGAGGTTATAACGGATG R: CTTTCTGCTTTTCTAACGTTTCC
Burk. Bm2445k	F: AGGGGTGTCGGACGTAGTAT R: ATGACTCTTACGGATCATGC
Burk. Bm29	F: CCTACGCGAACCTGAAGCTC R: GTCGAACCGGTCCTCGTGATAC

Análise Estatística

A árvore filogenética foi construída no programa MEGA 6.06 a partir do modelo de substituição de nucleotídeos T92 com distribuição gamma em análise de Máxima Verossimilhança com 500 réplicas de bootstrap. A filogenia de sequenciamentos a partir dos primers Nark, 475, e BM17 foi feita a partir do alinhamento das sequências obtidas no sequenciamento juntamente com outras disponíveis no banco de dados público.

Aspectos éticos foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Processo 23082021578/2013 – Licença N° 007/2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com as análises, pode-se observar o agrupamento genético dos isolados brasileiros e nota-se que foi possível observar similaridade genética entre *B. mallei* e *B.*

pseudomallei (Figura 1), como afirmado por Losada et al. (2010), citando que *B. mallei* é um agente não encontrado fora de uma célula de mamíferos, e seu genoma é altamente similar ao da *B. pseudomallei*, sendo, então, uma evolução da *B. pseudomallei*. As sequências de nucleotídeos amplificadas comparando as sequências genéticas do GenBank, demonstrou estudo similar ao de Su Yen et al. (2009), onde foi possível a comparação com amostras obtidas da China, Malásia, Vietnã, Singapura e França. O par de primers 457 não amplificou para demonstrar uma similaridade significativa com regiões de genomas *B. pseudomallei* disponíveis no GenBank.

Essas análises permitem observar o alto grau de similaridade genética entre as burkholderias, principalmente entre a *B. mallei* e *B. pseudomallei*. Isto pode demonstrar uma diversidade na circulação das cepas do gênero *mallei* em surtos de Mormo, levando a uma grande preocupação para elucidações de epidemiologia e virulência do mormo. Também se verificou a presença de uma pequena similaridade ao sequenciamento com a *B. thailandensis* o que, também não se pode afirmar a circulação da cepa no ambiente, pois não houve a completa designação do seu código genético ao sequenciamento ou isolamento bacteriano.

Hantraku et al., (2018), foi verificaram que genes da *B. thailandensis* codificavam um grupamento de polissacarídeo capsular semelhante a *B. pseudomallei*, podendo resultar em títulos antigênicos expressados pelo polissacarídeo capsular similar entre as *Burkholderias*. *Burkholderia thailandensis* foi descrita inicialmente por Wuthiekanun et al. (1996), demonstrando que o organismo está geneticamente relacionado com *B. pseudomallei*, podendo ser isolado do solo e água, e relacionado como um organismo não patogênico, sendo a *B. thailandensis* diferenciando da *B. pseudomallei* pela assimilação do carboidrato L-arabinose.

Silva et al. (2009), relatam que as cepas de *B. pseudomallei* podem sofrer progressivas variações em seu genótipo, demonstrando diferenças em sua virulência. Essas variações podem ocorrer também em amostras de diferentes procedências do mesmo modo, outras espécies do gênero *Burkholderia* podem sofrer pequenas alterações em seu genótipo. Losada et al. (2010), em seu estudo, concluíram que a *Burkholderia pseudomallei* é um ancestral do genótipo moderno da *Burkholderia mallei*, e esta diferenciação se deu por perdas de genes e recombinação genética, nos quais beneficiaram a *B. pseudomallei* para sobreviverem no ambiente, enquanto a *B. mallei* se tornando altamente adaptado ao seu hospedeiro mamífero, sendo patogênico intracelular, além de definir sua virulência.

As amostras sorológicas demonstraram reagentes na Fixação do Complemento e qPCR com o antígeno e sequência genética relacionada a *B. mallei*. Ao sequenciamento verificou-se uma similaridade da maioria das amostras com a *B. pseudomallei*, o que pode estar relacionado

à similaridade genética das cepas encontradas. Cravitz et al, (1949), demonstraram através de comparações sorológicas que cepas de *B. mallei* e *B. pseudomallei* apresentavam-se inter-relacionadas não podendo ser especificadas através da sorologia já que um grupo da *B. mallei* mostrava relação antigênica com um grupo da *B. pseudomallei* do que com outras cepas espécies homólogas. Cravitz et al. (1949), também demonstrou que cepas de *Burkholderia mallei* podem ser detectadas primeiramente aos testes sorológicos, enquanto a *Burkholderia pseudomallei* apresentava-se reagentes após algumas semanas da infecção, o que pode demonstrar a supressão do flagelo, fator de virulência relacionado a *B. pseudomallei* nas primeiras semanas da infecção, predominando a produção de antígenos somáticos relacionados a membrana de lipopolissacarídeo.

As cepas de *B. pseudomallei* podem sofrer progressivas variações em seu genótipo, demonstrando diferenças em sua virulência (WUTHIEKANUM et al. 1996). Essas variações podem ocorrer também em amostras de diferentes procedências e que do mesmo modo outras espécies do gênero *Burkholderia* podem sofrer pequenas alterações em seu genótipo (MOTA et al., 2010). Godoy et al., (2003) e Nierman, et al, (2004) também demonstraram através da Análise Sequencial de multi-locus que *B. mallei* é um derivado clonal de *B. pseudomallei*, que foi submetido a redução e rearranjo genômico significativa durante a adaptação no hospedeiro. Os resultados da comparação da análise genômica da *B. mallei* e *B. pseudomallei* revelaria um conjunto básico de genes essenciais para a sobrevivência e a virulência em um hospedeiro de mamífero, e elucidar genes envolvidos na sobrevivência ambiental. Além disso, a análise também esclareceria o processo evolutivo de um antepassado *B. pseudomallei* para um genoma *B. mallei* moderno.

Wuthiekanun et al., (1996) observaram os perfis de cepas de *Burkholderia pseudomallei* originadas de pacientes com melioidose com cepas encontradas em solo de cultivo de arroz (principal fator de risco para a doença) em diversas regiões da Tailândia. Em comparação com isolados clínicos, as amostras encontradas demonstraram ser morfologicamente similares e indistinguíveis antigenicamente. As cepas também foram reconhecidas por um anticorpo policlonal específico da *B. pseudomallei* o que demonstra a presença do antígeno específico presente na parede celular da bactéria. As cepas que apresentaram diferenças, relacionadas ao perfil bioquímico, demonstraram uma capacidade de assimilar a L-arabinose (ara^+). Esse biótipo também foi encontrado em conjunto com o biótipo L-arabinose negativo (ara^-). Os biótipos ara^+ , foram encontrados em regiões em que a prevalência da melioidose é baixa, mesmo com a utilização das práticas do cultivo de arroz, o que sugere que o biótipo ara^+ pode

ser consideravelmente menos virulento. A mesma conclusão foi verificada por Gillis et al (1995), os quais observaram que no nordeste da Tailândia, onde a melioidose é comum, 75% dos isolados encontrados não utilizam a L-arabinose, enquanto que na região central onde possui baixa prevalência, quase todos os isolados encontrados possuem o fenótipo ara⁺. A diferença na capacidade de assimilação de carboidratos, parece diferenciar cepas avirulentas de cepas patogênicas (GILLIS et al., 1995; YABUUCHI et al., 1992; URAKAMI et al., 1994).

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

Dinâmicas de surtos, aparecimento de diversos sinais clínicos e variabilidade genética natural de *B.mallei* ainda não são bem esclarecidos.

Outras metodologias estão sendo desenvolvidas e testadas para possibilitar uma maior precisão na identificação dos animais infectados, entretanto somente são apropriados para uso em laboratório especializados, como a RFLP (Polimorfismo de Comprimento com Fragmentos de Restrição) (TANPIBOONSAK et al., 2004), Eletroforese em gel de campo pulsado (CHANTRATITA et al., 2006), Ribotipagem (HARVEY & MINTER, 2005), Sequência Multilocus (MLST) (GODOY et al., 2003), Western Blotting (ELSCHNER et al, 2011), Maldi Tof (KARGER et al., 2012) e Microarray (PARTHASARATHY et al., 2006). . Em contrapartida metodologias que analisam molecularmente de ácidos nucléicos são agora os métodos de eleição para caracterização dos microrganismos. Esses métodos são amplamente aceitos, devido ao desenvolvimento de técnicas de separação molecular altamente discriminatórios, a disponibilidade de programas analíticos computadorizados e a exploração virtual da tecnologia dos ácidos nucléicos com o desenvolvimento de técnicas de sondas e amplificação (SELENDER et al. 1986).

CONCLUSÃO

A necessidade de identificação das estirpes circulantes no Brasil, possibilita a adição de outras metodologias de diagnóstico, elucidação de questionamentos relacionados aos aspectos

clínicos dos animais infectados, medidas de profilaxia eficientes e identificação de pontos de entrada do agente e transmissão da bactéria em plantéis de equídeos.

A identificação da doença em animais assintomáticos é um grande desafio. O manejo diferenciado dos animais retarda o aparecimento dos sinais clínicos que levam a suspeição do mormo e também suas respostas imunológicas aos testes laboratoriais convencionais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOWERS, J. R., ENGELTHALER, D. M., GINTHER, J. L., PEARSON, T., PEACOCK, S. J., TUANYOK, A., WAGNER, D. M., CURRIE, B. J., KEIM, P. S. Burk Diff: A Real-Time PCR Allelic Discrimination Assay for *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. Plos One. 2010

CHANTRATITA N., VESARATCHAVEST M., WUTHIEKANUN V., TIYAWISUTSRI R., ULZIITOGTOKH T., AKCAY E., DAY N.P. & PEACOCK S.J. Pulsed-field gel electrophoresis as a discriminatory typing technique for the biothreat agent *Burkholderia mallei*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2006.

CHOH, L. C., ONG, G. H., VELLASAMY, K. M., KALAISELVAM, K., KANG, W. T., AL-MALEKI, A. R., MARIAPPAN, V., VADIVELU, J. *Burkholderia* vaccines: are we moving forward? Frontiers in Cellular and Infection Microbiolog. 2013.

CRAVITZ L, MILLER WR: Immunologic studies with *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei*: I Serological relationships between *M. mallei* and *M. pseudomallei*. J Infect Dis 1949, 86:46–51.

DERBYSHIRE, J.B. The eradication of glanders in Canada. Histoire Vétérinaire. Can Vet J. 2002.

ELSCHNER, M. C.; SCHOLZ, H. C.; MARTEN, P.; RASSBACH, A.; DIETZSCH, M.; MELZER, F.; SCHMOOCK, G.; SANTANA, V. L. A.; SOUZA, M. M. A.; WERNERY, R.; WERNERY, U.; NEUBAUER, H.. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. Bio Med Central Veterinary. Res. 5, 7. 2011.

GILLIS M, VAN TV, BARDIN R *et al.* Polyphasic taxonomy in the genus *Burkholderia* leading to an emended description of the genus and proposition of *Burkholderia vietnamensis* sp. nov. for Nz-fixing isolates from rice in Vietnam. *Int J Syst Bacteriol.* 45: 274-289. 1995.

GODOY, D., RANDLE, G., SIMPSON, A. J., AANENSES, D. M., PITT, T. L., KINOSHITA, R. Multilocus Sequence Typing and Evolutionary Relationships among the Causative Agents of Melioidosis and Glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* J Clin Microbiol 2003.

HARVEY S.P. & MINTER J.M. Ribotyping of *Burkholderia mallei* isolates. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 2005.

HANTRAKUN, V., THAIPADUNGPANI, T., RONGKARD, P., SRILOHASIN, P., AMORNCHAI, P., LANGLA, S., MUKAKA, M., CHANTRATITA, N., WUTHIEKANUN, V., DANCE, D. A. B., DAY, N. P. J., PEACOCK, S. N., LIMMATHUROTSAKUL, D. Presence of *B. thailandensis* and *B. thailandensis* expressing *B. pseudomallei*-like capsular polysaccharide in Thailand, and their associations with serological response to *B. Pseudomallei*. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2018.

KARGER, A., STOCK, R. ZILLER, M., ELSCHNER, M. C., BETTIN, B., MELZER, F., MAIER, T., KOSTRZEWA, M., SCHOLZ, H. C., NEUBAUER, H., TOMASO, H. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. BMC Microbiology 12:229. 2012.

LOSADA L, RONNING CM, DESHAZER D, WOODS D, FEDOROVA N, KIM HS, SHABALINA SA, PEARSON TR, BRINKAC L, TAN P, NANDI T, CRABTREE J, BADGER J, BECKSTROM-STERNBERG S, SAQIB M, SCHUTZER SE, KEIM P, NIERMAN WC. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements. Genome Biol Evol. 2010.

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

MOTA, R. A., OLIVEIRA, A. A. F., PINHEIRO JUNIOR, J. W., SILVA, L. B. G., BRITO, M. F., RABELO, S. S. A. Glanders In Donkeys (*Equus Asinus*) In The State Of Pernambuco, Brazil: A Case Report. Brazilian Journal of Microbiology. 2010.

NIERMAN, W. C., DESHAZER, D., KIM, H. S., TETTELIN, H., NELSON, K.E., FELDBLYUM, T. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. Proc Natl Acad Sci EUA. 2004.

OIE – World Animal Health Organization. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>. 2016. Acesso em 24/10/2016.

PARTHASARATHY, N., DESHAZER, D., ENGLAND, M., WAAG, D.M. Polysaccharide microarray technology for the detection of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* antibodies. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 56 - 329–332. 2006.

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

SCHOLZ, H. C., JOSEPH, M., TOMASO, H., AL DAHOUK, S., WITTE, A., KINNE, J., HAGEN, R. M., WERNERY, R., WERNERY, U. & NEUBAUER, H. Detection of the re-emerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based PCR assay. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Apr;54(4):241-7 2006.

SELENDER R.K., CAUGANT D.A. & OCHMAN H. Methods for multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol. May. 51(5):873-84. 1986.

SILVA, K. P. C., MOTA, R. A., CUNHA, A.P., SILVA, L. B. G., LEAL, N. C., CAVALCANTE, Y. V. N., TELES, J. A. A., PEREIRA, M. C.C., FREITAS, N. S. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. Pesq. Vet. Bras. 29(5):439-444, maio 2009.

SU YEN, M. W., LISANTI, O., THIBAUT, F., SAN SU, T., KEE, L. G., HILAIRE, V., JIALI, L., NEUBAUER, H., VERGNAUD, G., RAMISSE, V. Validation of ten new polymorphic tandem repeat loci and application to the MLVA typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates collected in Singapore from 1988 to 2004. J Microbiol Methods. 77(3):297-301.2009.

TANPIBOONSAK S., PAEMANEE A., BUNYARATAPHAN S. & TUNGPRADABKUL S. PCR-RFLP based differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. Mol. Cell. Probes. Apr;18(2):97-101. 2004.

ULRICH, M. P.; NORWOOD, D. A.; CHRISTENSEN, D. R. ULRICH, R. L. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. Journal of Medical Microbiology. May;55 (Pt 5):551-9. 2006.

URAKAMI T, ITO-YOSHIDA C, ARAKI H, KIJIMA T, SUZUKI K, KOMAGATA K. Transfer of *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol.* 44: 235-245. 1994.

WHITLOCK, G. C., ESTES, D. M., TORRES, A. G. Glanders: off to the race with *Burkholderia mallei*. FEMS Microbiol Lett. Dec;277(2):115-22. 2007.

WUTHIEKANUM, V., SMITH, M. D., DANCE, D. A. B., WALSH, A. L., PITT, T. L., WHITE, N. J. Biochemical characteristics of clinical and environmental isolates of *Burkholderia pseudomallei*. J. Med. Microbiol. Dec;45(6):408-12. 1996.

YABUUCHI E, KOSAKO Y, OYAIZU H. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group I1 to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. *Microbiol Immunol.* 36: 1251-1275. 1992.

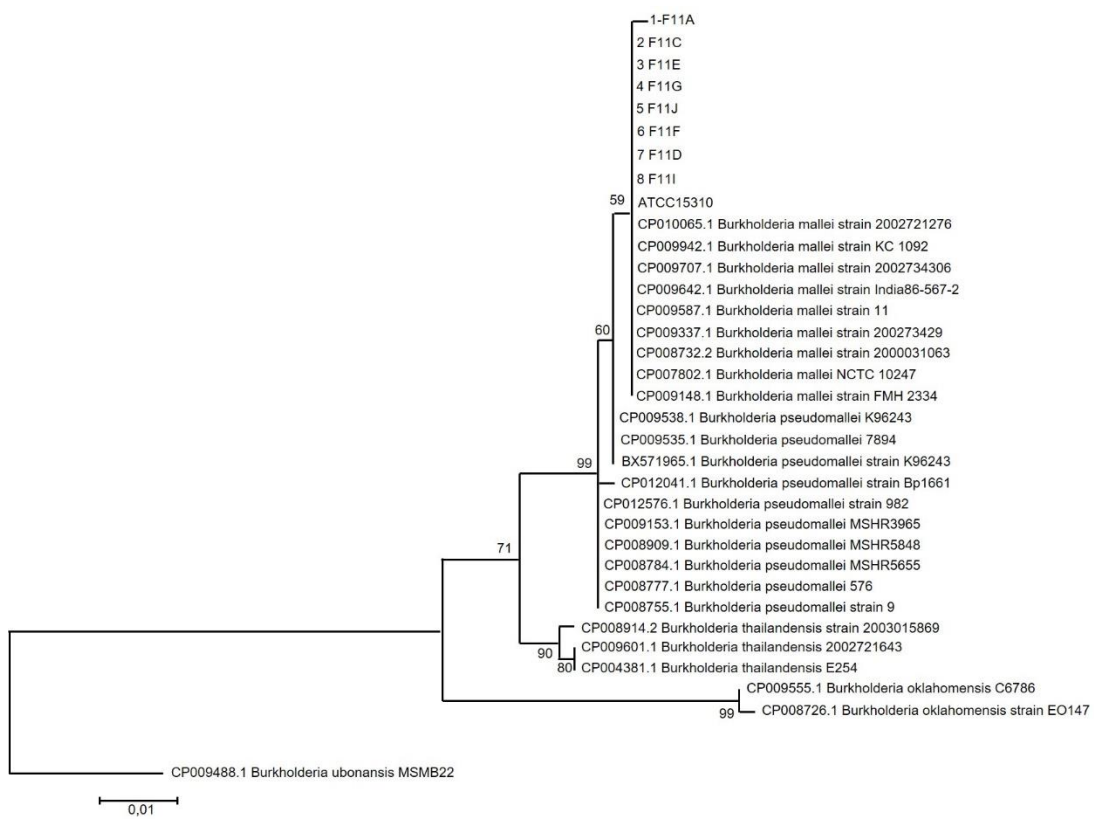


Figura 1: árvore filogenética construída no programa MEGA 6.06.

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DA FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO COM A UTILIZAÇÃO DE DUAS
METODOLOGIAS E DOIS ANTÍGENOS COMERCIALMENTE DISPONÍVEIS PARA O
DIAGNÓSTICO DO MORMO

Cecilia Maria de Souza Leão e Silva^{1*}, Vânia Lúcia de Assis Santana², Marcília Maria Alves de Souza⁴, Jorge Caetano da Silva⁴, Manoel Adrião Gomes Filho³

1 Rural Federal University of Pernambuco, 2 Brazilian National Laboratory for Agriculture, Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply

3 Rural Federal University of Pernambuco

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

* Corresponding author

Cecilia Maria de Souza Leão e Silva

Rua Mário Bhering, 61/301

Recife – Pernambuco – Brasil

CEP: 52110-090.

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

E-mail address:

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

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

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

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

RESUMO

O Mormo constitui-se em uma doença altamente contagiosa dos solípedes causada pela *Burkholderia mallei*, uma bactéria Gram-negativa, não móvel e cocobacilo aeróbio, composta de uma cápsula de polissacarídeo, sendo esta estrutura responsável pela sua virulência. A *B. mallei* primariamente infecta cavalos, muares e asininos, entretanto humanos são considerados hospedeiros acidentais. A doença é de notificação obrigatória e o sacrifício dos equídeos positivos é exigido. É preconizado pela OIE o teste da fixação do complemento para trânsito de animais. No presente estudo foram avaliados resultados da sorologia da Fixação do Complemento em comparação ao western blotting. Objetivou-se com este estudo avaliar a resposta sorológica, frente aos testes, de 160 amostras séricas de equídeos de diversas regiões do território nacional. A fixação do complemento apresentou 34 (21,25 %) de amostras positivas com antígeno USDA quente enquanto o antígeno USDA frio apresentou positividade com 35 amostras (21,87%). O Antígeno C.Cpro apresentou positividade em 39 (24,37%) das amostras e o western blotting com 55 amostras positivas (34,3%). Os resultados estatísticos mostraram que o a FC utilizando a metodologia a frio apresentou a maior especificidade (97,1%) e a maior sensibilidade (66,6%) utilizando o FC USDA quente quando comparado ao Western Blotting. Os resultados mostram a necessidade da preparação e utilização de antígenos que sejam produzidos com cepas locais, determinando maior sensibilidade e especificidade ao teste.

Palavras-chave: FC, western blotting, incubação, anticorpo, mormo.

ABSTRACT

Glanders is in a highly contagious disease caused by *Burkholderia mallei* solipeds, a Gram - negative bacterium, not motility and aerobic coccobacillus, consisting of a polysaccharide capsule, and this structure responsible for its virulence. Primarily infects horses, donkeys and mules, though humans are considered incidental hosts. The disease is notifiable, and the sacrifice of the positive horses is required by which recognizes the complement fixation test for movement of animals. In the present study, serology results of complement fixation and ELISAi compared to western blotting to evaluate the response, versus testing of 160 serum samples equids from different regions of the country. The complement fixation showed 34 (21.25%) positive samples with warm USDA antigen while cold USDA antigen presented positivity with

35 samples (21.87%). The antigen C.c pro presented positivity in 39 (24.37%) of the samples and the western blotting with 55 positive samples (34.3%). Statistical results showed that HR using the cold methodology showed the highest specificity (97.1%) and the highest sensitivity (66.6%) using the hot USDA FC when compared to Western Blotting. The results show the need for the preparation and use of antigens that are produced with local strains, determining greater sensitivity and specificity to the test.

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

INTRODUÇÃO

O mormo é uma doença zoonótica altamente contagiosa e frequentemente fatal que acomete principalmente equídeos, podendo também infectar diversas outras espécies animais, como os felídeos através da ingestão de carne contaminada pela bactéria. É causada por um bacilo Gram negativo, aeróbio, não esporulado e imóvel, atualmente classificado como *Burkholderia mallei*, composta de uma cápsula de polissacarídeo, sendo esta estrutura responsável pela sua virulência (POPOV et al., 2000; FRITZ et al., 1999, 2000; DESHAZER et al., 2001), transmitida entre os solípedes, principalmente, pela água e alimentos contaminados. Em equídeos pode determinar quadros agudos, mais comuns em asininos e muares, ou crônicos, mais frequente em equínos, com formas cutânea, pulmonar, nasal ou mista, com presença de abscessos nodulares cutâneos, vasos linfáticos espessados e endurecidos (CDC, 2000; SRINIVASAN et al., 2001; ACHA & SYFRES, 2003; WAGG & DESHAZER, 2004; GILAD et al., 2007; OIE, 2015). O diagnóstico do mormo pode ser realizado através de investigação sorológica, moleculares e microbiológicas, 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 utilizadas (NAUREEN et al., 2007; SPRAGUE et al., 2009; ELSCHNER et al., 2011).

Objetivou-se com esse trabalho avaliar as reações sorológicas de equinos frente ao teste da fixação do complemento utilizando metodologia quente e frio e antígenos americano e alemão comercialmente disponíveis.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram utilizadas 160 amostras séricas de animais provenientes de propriedades dos Estados de Pernambuco, Ceará, Distrito Federal, São Paulo, Espírito Santo e Paraná com histórico de mormo e/ou submetidas à vigilância através da abertura de foco pelas Secretárias de Defesa Animal (SDA) de cada estado e 40 amostras sanguíneas de animais positivos na Fixação do Complemento e submetidos ao sacrifício, necropsia e isolamento, sendo classificadas como controle de animais verdadeiros positivos, através do isolamento bacteriano das vísceras (Teste Ouro), conforme OIE (2015). As amostras sorológicas foram obtidas pela venopunção asséptica da jugular utilizando tubos tipo a vácuo, sem anticoagulante, para retração dos coágulos. As amostras sanguíneas foram obtidas através da venopunção da jugular em tubos tipo a vácuo com anticoagulante EDTA. Posteriormente o soro obtido foi transferido para tubos tipo eppendorf, acondicionados em caixas isotérmicas e enviados para o Laboratório para realização das técnicas sorológicas a fim de diagnosticar o Mormo.

As amostras foram separadas por grupo e tipo de teste realizado: animais verdadeiros positivos, animais verdadeiros negativos, animais maleína positivos, animais maleína negativos e suspeitos. As amostras verdadeiras positivas foram assim declaradas de acordo com o resultado do teste padrão-ouro de isolamento bacteriano (OIE, 2015). As amostras declaradas como verdadeiras negativas, foram oriundas de áreas livres da enfermidade e com todos os testes de diagnósticos negativos para detecção da *Burkholderia mallei*.

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

Teste da Fixação do Complemento (FC)

O Teste da Fixação do Complemento foi executado de acordo com a técnica descrita no “Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Code” (OIE, 2015), utilizando como antígenos o alemão C.C. PRO (c. c. pro GmbH, Oberdorla, Germany) na diluição de 1:80 e o americano, produzido pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América (USDA) na diluição de 1:125. O C.C. pro é produzido com um “pool” de três cepas de *B. mallei*, de origem animal (Bogor, Zagreb e Mukteswar) enquanto o USDA constituído por uma única cepa (China) de origem humana. O complemento de cobaio (*Cavia porcellus*) foi produzido e titulado, utilizando-se cinco unidades de complemento hemolítico 50% (CH₅₀). Suspensão de células sanguíneas vermelhas de carneiro a 2% foi utilizada na execução do teste. Soros de

equinos foram diluídos 1:5 em solução diluente de trietanolamina e inativados a 58°C, por 35 minutos com intuito de remover a atividade anticomplementar do soro. Soro, antígeno e complemento, foram adicionados em placas de poliestireno (25uL cada), nas diluições de 1:5 a 1:320 e linha do soro anticomplementar, e incubados a 37°C por uma hora (USDA quente) ou alternativamente incubados a 4°C por 18 horas (USDA frio e CCpro). Após a 1ª fase de incubação, foi adicionada aos poços da placa, uma solução de hemácias sensibilizadas (sistema hemolítico) composta de solução diluente, hemácia de carneiro a 2% e hemolisina, onde sofreram nova incubação por 45 minutos. Após a incubação foram mantidas em refrigeração por no mínimo 2 horas, tempo suficiente para identificação da resposta no teste. As amostras foram consideradas negativas quando apresentaram 100% de hemólise, positivas de 0 a 75% de hemólise em qualquer das diluições e inconclusiva quando apresentaram resquícios de sedimentação de hemácias nos poços de diluição (BRASIL, 2004).

Western blotting (WB)

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

Análise Estatística

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

O aspecto ético foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Processo 23082021578/2013 – Licença N° 007/2014).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 160 amostras analisada, o teste que apresentou maior positividade foi a fixação do complemento utilizando o antígeno C.C.pro com 39 (24,37%), com 35 (21,87%) utilizando o

antígeno USDA incubação a frio e por último a fixação do complemento utilizando o antígeno USDA quente com 34 amostras positivas (21,25%). A Tabela 1 apresenta os totais de positivos e negativos por teste diagnóstico.

Tabela 1: Resultados dos testes de Fixação do Complemento e Western Blotting, com frequências relativa e absoluta.

Variável	n	%
Total	160	100%
FC USDA quente		
Positivo	34	21,25
Negativo	126	78,75
FC USDA frio		
Positivo	35	21,87
Negativo	125	78,12
FC CC PRO		
Positivo	39	24,37
Negativo	121	75,62
Western Blotting		
Positivo	55	34,37
Negativo	105	65,62

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

A maior sensibilidade observada foi com a fixação do complemento utilizando o antígeno USDA quente com 66,6%, seguido pela fixação do complemento utilizando o antígeno USDA frio e CCpro com 65,4% ambos. Os testes mais específicos foram a fixação do complemento utilizado antígeno USDA frio e CCpro com 97,1%, seguido do USDA quente com 93,3%. O valor preditivo positivo foi 93,3% utilizando o antígeno USDA frio e CCPRO, seguido pelo USDA quente com 82,3%. O valor preditivo negativo foi 84,2% no FC USDA frio e CCpro, seguido pelo USDA quente com 10,3%. A acurácia observada foi de 86,2% com o USDA frio e CCpro, seguido por 86,8 % no FC USDA quente.

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

Teste	Western Blotting		
	Positivo	Negativo	Total
FC USDA quente			
Positivo	26	08	34
Negativo	13	113	126
Total	39	121	160

Sensibilidade: 66,6%; Especificidade: 93,3%; Valor Preditivo Positivo: 82,3%; Valor Preditivo Negativo: 10,3%; Acurácia: 86,8%.

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

Teste	Western Blotting		
	Positivo	Negativo	Total
FC C.C.PRO			
Positivo	36	03	39
Negativo	19	102	121
Total	55	105	160

Sensibilidade: 65,4%; Especificidade: 97,1%; Valor Preditivo Positivo: 92,3%; Valor Preditivo Negativo: 84,2%; Acurácia: 86,2%.

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

Teste	Western Blotting		
	Positivo	Negativo	Total
FC USDA frio			
Positivo	32	03	35
Negativo	23	102	125
Total	55	105	160

Sensibilidade: 65,4%; Especificidade: 97,1%; Valor Preditivo Positivo: 92,3 %; Valor Preditivo Negativo: 84,2%; Acurácia: 86,2%.

Na Tabela 5 apresentam-se os resultados de concordância entre a fixação do complemento utilizando o antígeno USDA quente com os outros exames. Desta tabela é possível verificar que os valores da concordância observada variaram de 85,62% a 86,8%. O valor do Kappa foi mais elevado com a fixação do complemento com o WB (0,680) indicando concordância substancial variando de 0,575 a 0,628 com o FC USDA frio e CCPRO respectivamente (Concordância substancial).

Tabela 5 – Avaliação da concordância entre o exame fixação do complemento USDA quente com fixação do complemento CC PRO, Western Blotting e USDA frio.

Exame	Coincidência observada		Kappa	Intervalo com 95% de confiança
	N	%		
• FC C.C. PRO	139	86,8	0,628	0,473 a 0,782
• Western Blotting	139	86,8	0,680	0,533 a 0,827
• FC USDA frio	137	85,62	0,575	0,420 a 0,730
BASE	160			

A concordância entre a fixação do complemento C.C.PRO com o western blotting e mostra na Tabela 6 uma concordância observada de 86,25%. O valor de Kappa mostrou-se de baixa concordância com o WB.

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

Exame	Coincidência observada		Kappa	Intervalo com 95% confiança
	n	%		
• Western Blotting	138	86,25	0,673	0,522 a 0,823
BASE	160			

Foi registrada concordância de 83,75% entre o FC USDA frio e WB sendo o valor de Kappa apresentado baixo (Tabela 7).

Tabela 7 – Avaliação da concordância entre o FC USDA frio e o Western Blotting.

Exame	Coincidência observada		Kappa	Intervalo com 95% confiança
	n	%		
• FC USDA frio	134	83,75	0,606	0,458 a 0,753
BASE	160			

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

A fixação do complemento é o teste sorológico específico a ser realizado em animais cronicamente infectados de áreas endêmicas, sendo, portanto as IgG's a classe de imunoglobulinas detectáveis no teste (ELSCHNER et al, 2011, NEUBAUER et al., 2005). No

presente estudo, a maioria dos animais cronicamente infectados não foi reagente ao teste da Fixação do Complemento, levando a hipótese de que as IgG's não são as imunoglobulinas de eleição detectáveis na prova, podendo haver, então, a participação da classe IgM, que são imunoglobulinas de fase aguda. Entretanto, Nilsen & Duncan (1990) afirmam que a classe IgM é inativada a temperaturas elevadas por um tempo determinado, procedimento que ocorre na primeira fase do teste da Fixação do Complemento, onde esta inativação tem como o objetivo retirar o complemento do soro e eliminar resíduos contaminantes oriundos da coleta da amostra. Por ser imunoglobulina de fase aguda, as IgM's desaparecem em um período de 7 a 15 dias, surgindo as IgG's. Contudo, Abbas, (2012) afirma que a IgM é a imunoglobulina que melhor fixa o complemento devido a sua estrutura pentamérica e a quantidade de receptores na região Fc, responsável pela ligação aos epítomos dos agentes infecciosos, enquanto que as IgG's não possuem uma quantidade de regiões Fc suficiente para a ligação aos antígenos, não ativando o complemento e não contribuindo para a opsonização dos agentes.

ELSCHNER et al., (2009) corroboraram esta hipótese ao descrever um cavalo que exportado do Brasil para Alemanha com atestados negativos na FC, apresentou sinais clínicos da doença ao chegar ao destino, positivando em todos os testes, principalmente no Western Blotting, confirmando a hipótese que a imunoglobulina de fase aguda, IgM, também é detectada na FC. Uma maior sensibilidade e especificidade do teste também irá depender do tipo do antígeno que é empregado e se sua composição contém exclusivamente o microrganismo a ser detectado. É o que provavelmente aconteceu nesse estudo, onde observa-se uma concordância de moderada à fraca com os diversos testes sorológicos realizados devido aos diversos tipos de antígenos empregados.

Um número maior de animais positivos foi evidenciado pela FC empregando-se o antígeno C.C. PRO. Com a utilização deste antígeno, houve um crescimento do número de animais positivos de 34 para 39. Esse fato pode ser referenciado pelo tipo de antígeno empregado na técnica, visto que as cepas utilizadas no preparo do antígeno USDA são cepas de origem humana, cepa China (ULRICH et al., 2006), uma vez que a virulência da cepa da bactéria está relacionada com a cápsula de polissacarídeo, levando a uma diferença de determinante antigênico pela destruição ou perda dos epítomos durante subcultivos e consequentemente falhando na detecção de anticorpos (WHITLOCK et al., 2007 & NEUBAUER et al., 2005). Contudo esta cepa China, mantém a antigenicidade após passagens sucessivas em cobaios. Segundo Khan, (2013), comparando três antígenos comercialmente disponíveis, a maior especificidade foi encontrada com o antígeno americano (USDA) com 100%, seguido pelo antígeno CIDC (Holandês) com 97,5% e pelo antígeno c.c.pro com 96,5%

enquanto a melhor sensibilidade foi observada com a utilização do antígeno CIDC (100%), seguida pelo c.c.pro com 99,39% e por último o americano USDA com 62,19% com $p < 0.05$. Em outro estudo, realizado no Paquistão, também comparando os antígenos c.c.pro e CIDC, mostram que o C.C.pro mostrou especificidade inferior ao CIDC com 75,71% e 77,45%, respectivamente, quando testados em animais aparentemente saudáveis, mas expostos à infecção pela *B. mallei* e quando testado em animais de diferentes áreas livres de mormo na Alemanha, o C.C.PRO mostrou uma especificidade superior ao CIDC de 94,79% e 93,75% respectivamente (KHAN et al., 2011).

Alguns animais do estudo são oriundos de propriedades com histórico de mormo, por esta razão que o Western Blotting apresentou um número maior de resultados positivo. Sprague et al, 2009, afirmam que a FC é ainda o melhor método de estudo para avaliar equídeos em área de baixa prevalência do mormo, devido ao baixo custo e robustez do teste.

A utilização de antígenos preparados com cepas de *B. mallei* locais ou com parte dos epítomos pode melhorar a sensibilidade. Naurren, 2007, observou que o preparo do antígeno utilizando três diferentes cepas, pode influenciar na virulência e na sensibilidade de antígenos. A FC é considerada altamente sensível para a detecção do Mormo (VERMA, 1990), no entanto pode falhar na detecção de muitos casos confirmados (SHUMILOV, 1974). Essa limitação também pode ser atribuída a anticomplementariedade dos soros de asininos e muares, contaminação das amostras ou reação cruzada com outros microrganismos (RADOSTISTS, 2002).

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

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

Elschner et al., (2011) utilizaram a membrana de lipopolissacarídeo da *B. mallei* como antígeno e obteve 100% de sensibilidade e especificidade na identificação de antígeno específico para o mormo. A utilização de antígenos baseados em proteínas recombinantes ou

em membranas de LPS deverá ser uma alternativa para eliminar resultados falsos positivos e negativos promovendo uma maior confiabilidade aos testes sorológicos

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

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

Outro ponto de discussão a respeito da Fixação do Complemento é o uso de diferentes antígenos empregados. Utilizando o antígeno USDA, em comparação ao mesmo teste, com o método de incubação a frio, observou-se um aumento do número de animais reagentes para 35 amostras (21,87%) identificados na tabela 1.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados da concordância entre a FC USDA quente com a FC USDA na incubação a frio. Daquela tabela é possível verificar que o valor observado é 0,575 e o valor do Kappa variando entre 0,420 a 0,730, indicando concordância substancial.

A maior concordância de animais reagentes empregando o método a frio, pode estar relacionado com o tempo de incubação das placas em geladeira, tempo este que varia entre 16 e 18 horas, em temperatura que variam de 2°C a 10° C. Pode haver influência tanto da temperatura quanto da incubação sobre a atividade hemolítica do complemento, provocando reações mais fortes de fixação do complemento. Foi observado que o complexo antígeno/anticorpo é mais evidente na incubação prolongada, a frio, do que a incubação por 1 hora, a 37° C (KOLMER, 1920). A incubação a frio aumentou o número de animais reagentes ao teste da FC, independente dos antígenos utilizados (C.C PRO ou USDA), embora, tentou se encontrar um número maior de positivos usando o antígeno alemão. Em estudo realizado para detecção da Brucelose em ovinos, é evidenciado que o teste da FC a frio apresenta resultados

de até uma semana de antecedência de animais infectados em relação ao teste da FC a quente (BURGESS et al., 1982).

Pelo presente estudo, viu-se que o antígeno utilizado para o diagnóstico do mormo é o ponto crítico a ser avaliado no incremento de novas técnicas diagnósticas. O desenvolvimento e utilização de antígenos preparados com cepas locais de *Burkholderia mallei*, a fim de aumentar a confiabilidade, especificidade e sensibilidade é o melhor método para diagnóstico do mormo a ser empregado para controle e erradicação da enfermidade em áreas endêmicas.

CONCLUSÃO

A fixação do complemento é um teste sorológico que pode ser empregado tendo como aliado o Western Blotting como teste confirmatório, devendo seu uso ser implementado para o trânsito de animais como diagnóstico, pois apresenta resultados confiáveis e satisfatórios na detecção da enfermidade.

O desenvolvimento e utilização de antígenos preparados com cepas locais de *Burkholderia mallei*, a fim de aumentar a confiabilidade, especificidade e sensibilidade é o melhor meio para diagnóstico do mormo a ser empregado para controle e erradicação da enfermidade em áreas endêmicas

Agradecimentos

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

Agradecimentos

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

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, K. A., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. Imunologia Celular e Molecular. 7ª edição. Elsevier. 2012.

ACHA, P. N., SZYFRES, B. Zoonoses. Bacterioses listed G (Glanders). Zoonoses and Communicable Diseases Common to Man and Animals. Pan American Health Organization. 398p. 2003.

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

BURGESS, [G.W.](#), [NORRIS, M.J.](#) Evaluation of the cold complement fixation test for diagnosis of ovine brucellosis. [Australian Veterinary Journal](#), 59:23-25. 1982.

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

DESHAZER, D., WAAG, D. M., FRITZ, D. L., WOODS, D.E. Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. *MicrobPathog.*,30: 253–269. 2001.

ELSCHNER, M. C.; KLAUS, C. U.; LIEBLER-TENORIO, E.; SCHMOOCK, G.; WOHLSEIN, P.; TINSCHMANN, O.; LANGE, E.; KADEN, V.; KLOPFLEISCH, R.; MELZER, F.; RASSBACK, A.; NEUBAUER, H. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. *Equine Veterinary Education*. Volume 21, Issue 3, pages 147–150, 2009.

ELSCHNER, M. C.; SCHOLZ, H. C.; MARTEN, P.; RASSBACH, A.; DIETZSCH, M.; MELZER, F.; SCHMOOCK, G.; SANTANA, V. L. A.; SOUZA, M. M. A.; WERNERY, R.; WERNERY, U.; NEUBAUER, H.. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *Bio Med Central Veterinary Res.* 5, 7. 2011.

FOMSGAARD, A.; FREUDENBERG, A. M.; GALANOS, C. Modification of the Silver Staining Technique To Detect Lipopolysaccharide in Polyacrylamide Gels. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2627-2631. 1990.

FRITZ, D.L.; VOGEL, P.; BROWN, D.R.; DESHAZER, D.; WAAG, D.M. Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*). *Vet Pathol*, 37: 626–636. 2000.

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.

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

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

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

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

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

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

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

NILSEN, K.; DUNCAN, J. R. Animal Brucellosis. *Internacional Standard Book*. P-153-160 1990.

OIE – World Animal Health Organization. Terrestrial Animal Health Code. 2015. Chapter 12.10. Glanders. Disponível em <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>. Acesso em 19/12/2017.

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

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

SCHADEWALDT, H. Die Entdeckung des Tuberkulins. *Dtsch Med Wochenschr.* 1975 Sep 26;100(39):1925–1932.

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

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

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

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

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

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

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

