

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RUBENS CHAGURI DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE TESTE PARA DIAGNÓSTICO  
DE MORMO POR SOROAGLUTINAÇÃO EM PLACA

CURITIBA

2016

RUBENS CHAGURI DE OLIVEIRA

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE TESTE PARA DIAGNÓSTICO  
DE MORMO POR SOROAGLUTINAÇÃO EM PLACA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

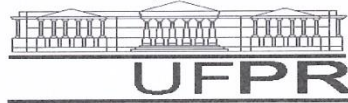
Orientador: Prof. Dr. Peterson Triches Dornbusch

Co-Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup> Cybelle de Souza

CURITIBA

2016

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



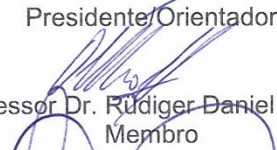
PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **“DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE TESTE PARA DIAGNÓSTICO DE MORMO POR SOROAGLUTINAÇÃO EM PLACA”** apresentada pelo Mestrando **RUBENS CHAGURI DE OLIVEIRA** declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09–CEPE/UFPR, que considerou o candidato aprovado para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 29 de março de 2016



Professor Dr. Peterson Triches Dornbusch  
Presidente/Orientador



Professor Dr. Rüdiger Daniel Ollhoff  
Membro



Professor Dr. José Francisco G. Warth  
Membro



*À minha esposa Emmanuela e meus filhos*

*Nícolas, Iago e João Emmanuel.*

*Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Prof. Dr. Peterson Triches Dornbusch e Prof. Dr<sup>a</sup>. Cybelle de Souza. Aos membros do comitê de orientação Prof. Dr. Alexander W. Biondo e Prof. Dr. Ivan Roque de Barros Filho. Aos membros da banca de dissertação.

Ao Prof. Dr. Jose Francisco G. Warth pela participação ativa durante a execução do trabalho e seu auxílio na busca por soluções frente às dificuldades encontradas.

Ao Dr. Edegar Kruger pelo auxílio junto às solicitações realizadas ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

À Dr<sup>a</sup> Vania Lucia de Assis Santana, pela disponibilização de soros equinos positivos e ao Dr. Enio Augusto Granatto de Oliveira, pelos soros equinos negativos para a realização da pesquisa.

Ao Dr. Marco A. Krieger, Msc. Luciana Requião e Dr. Luis Augusto Morello, pela orientação e viabilização da realização dos testes moleculares.

Às instituições que me auxiliaram direta ou indiretamente na realização da pesquisa: Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR, Universidade Federal do Paraná – UFPR, Instituto Carlos Chagas – ICC - FIOCRUZ Paraná, Polícia Militar do Paraná - Regimento Coronel Dulcídio, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA SFA Paraná, Laboratório Nacional Agropecuário de Pernambuco – LANAGRO - PE e de Pedro Leopoldo – LANAGRO – MG, Agência de Defesa Agropecuária do Paraná - ADAPAR.

Aos colegas do Laboratório de Kits Diagnósticos da Diretoria de Biotecnologia Industrial do Instituto de Tecnologia do Paraná pelo apoio.

Aos colegas da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná - ADAPAR da Unidade Regional de Sanidade de Ponta Grossa e do Centro de Diagnóstico Marcos Enrietti pelo acolhimento e compreensão.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Thais Rocha Coutinho-Dittrich pelo incentivo na busca pelo conhecimento.

Aos meus pais, pela minha criação e formação, sem os quais este momento não seria possível.

À minha esposa Emmanuela e meus filhos Nicolás, Iago e João Emmanuel, fontes de energia e inspiração para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O mormo é uma zoonose, causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, que afeta principalmente equídeos. No Brasil, a doença é endêmica e traz prejuízos sanitários e conseqüentemente econômicos. Há necessidade de ampliar as discussões, o fomento à pesquisa e aprimoramento das normas atuais acerca do tema, em ordem de se estabelecer e alcançar definitivamente um objetivo final, qual seja a erradicação da enfermidade do país. Os objetivos do presente trabalho incluem a realização de uma discussão acerca dos principais métodos e técnicas utilizados no diagnóstico de mormo, bem como demonstrar o desenvolvimento de um teste para diagnóstico de mormo pelo método de soroaglutinação em placas, em que foram testados 52 soros positivos para mormo no teste FC e 24 negativos. Os resultados mostraram que o teste desenvolvido é promissor, obtendo 87% de sensibilidade, 83% de especificidade e 86% de acurácia em relação ao FC, além de ser um ensaio rápido, de simples execução e baixo custo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Zoonose, Diagnóstico, Mormo, Equídeos

## ABSTRACT

Glanders is a zoonosis caused by *Burkholderia mallei*, affecting mainly equids. The disease is endemic in Brazil and is responsible for sanitary and consequently economic losses. There is the need to amplify the discussions, the research promotion and improvement of current regulation on the subject, in order to establish and definitely reach a final goal, which is the eradication of the disease in Brazil. The objectives of this work include conducting a discussion of the main methods and techniques used in the diagnosis of glanders, as well as demonstrate the development of a test for the diagnosis of glanders by plate seroagglutination method, where 52 FC positive sera and 24 FC negative sera were tested. Results shows that the developed test is promising, obtaining 87% sensitivity, 83% specificity and 86% accuracy when compared to FC, besides being a fast, simple to implement and low cost assay.

**KEY-WORDS:** Zoonosis, Diagnosis, Glanders, Equids.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Distribuição de Mormo .....	23
Figura 2: Incidência de Mormo no Brasil. Período 2013 a 2015 .....	26
Figura 3: Cultivo de <i>B.mallei</i> em agar sangue .....	36
Figura 4: Antígeno para diagnóstico de mormo por soroaglutinação em placas..	41
Figura 5: Resultados Positivo (esquerda) e Negativo (direita) de teste de soroaglutinação em placas para o diagnóstico de mormo .....	42
Figura 6: Execução do teste de soroaglutinação em placas para diagnóstico de mormo .....	46

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1: Principais Métodos de Diagnóstico de Mormo .....	19
Tabela 1: Incidência de Mormo no Brasil. Período 2013 a 2015 .....	25

## LISTA DE ABREVIATURAS

° C – Graus Celcius

*B. mallei* – *Burkholderia mallei*

*B. pseudomallei* – *Burkholderia pseudomallei*

BHI – Caldo “*Brain Heart Infusion*”

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio Imunoenzimático

FC – Teste de Fixação de Complemento

g - Gramas

h - Hora

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IN – Instrução Normativa

LANAGRO – Laboratório Nacional Agropecuário

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

mL - Mililitro

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial Hidrogeniônico – Escala de medida de grau de acidez

PMPR – Polícia Militar do Paraná

RB – Teste de Soroaglutinação em placa com corante Rosa Bengala

rDNA – ácido desoxirribonucleico ribossômico

UV – Ultra - Violeta

VPN – Valor Preditivo Negativo

VPP – Valor Preditivo Positivo

WAHID – “*World Animal Health Information Database*”

WAHIS – “*World Animal Health Information System*”

X g – Força Gravitacional (utilizada em centrifugações)

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE MORMO .....	15
RESUMO .....	15
ABSTRACT .....	16
2.1 INTRODUÇÃO .....	17
2.2 DIAGNÓSTICO DE MORMO .....	19
2.3 REFERÊNCIAS .....	27
3 DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE TESTE PARA DIAGNÓSTICO DE MORMO POR SOROAGLUTINAÇÃO EM PLACA .....	29
RESUMO .....	29
ABSTRACT .....	30
3.1 INTRODUÇÃO .....	31
3.2 MATERIAL E MÉTODOS .....	35
3.2.1 ORIGEM DA CEPA DE <i>B. mallei</i> .....	35
3.2.2 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA CEPA DE <i>B. mallei</i> .....	35
3.2.2.1 CULTIVO .....	36
3.2.2.2 TESTES BIOQUÍMICOS .....	36
3.2.2.3 TESTES MOLECULARES .....	37
3.2.2.3.1 OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO DE <i>B.mallei</i> .....	37
3.2.2.3.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA .....	37

3.2.2.3.4 SEQUENCIAMENTO .....	38
3.2.3 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO .....	39
3.2.3.1 CULTIVO .....	39
3.2.3.2 INATIVAÇÃO .....	39
3.2.3.3 FORMULAÇÃO DO ANTÍGENO .....	40
3.2.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PRELIMINAR DO TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO DESENVOLVIDO .....	41
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
3.3.1 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA CEPA DE <i>B. mallei</i> .....	43
3.3.1.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA .....	44
3.3.2 CULTIVO E OBTENÇÃO DO ANTÍGENO .....	45
3.3.3 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PRELIMINAR DO TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO DESENVOLVIDO .....	47
3.4 CONCLUSÕES .....	48
3.5 REFERÊNCIAS .....	49
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	52
REFERÊNCIAS .....	53
ANEXO 1: APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA DO SCA DA UFPR....	54
VITA .....	55

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro mundial, com cerca de 8 milhões de cabeças, movimentando R\$ 7,3 bilhões, somente com a produção de cavalos. O chamado Complexo do Agronegócio Cavalo é responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos, sendo que a maior concentração de equinos encontra-se na região Sudeste, seguida das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Norte. Destaque para o Nordeste, que além de equinos, concentra maior registro de asininos e muares (MAPA, 2016).

Sendo considerada uma das doenças de grande importância sanitária, o mormo é uma zoonose, causada pela bactéria *Burkholderia mallei* (previamente conhecida por *Pseudomonas mallei*) que afeta perissodáctilos ou ungulados. Foi classificada no passado como *Pfeifferella*, *Loefflerella*, *Malleomyces* ou *Actinobacillus*. Sua ocorrência é considerada de notificação compulsória segundo a Organização Mundial de Saúde Animal. (OIE, 2015).

No início do século 20, o mormo estava disseminado na Europa, EUA e Canadá, e atualmente é endêmico em partes do Oriente Médio, Ásia, África e América do Sul. Entre 1998 e 2007, foram relatados surtos no Brasil, Turquia, Rússia, Iraque e Emirados Árabes Unidos. A distribuição geográfica da *B. mallei* é difícil de ser determinada precisamente, uma vez que reações cruzadas com *B. pseudomallei* interferem nas vigilâncias sorológicas (IOWA, 2007).

No Brasil, o mormo foi descrito pela primeira vez em 1811, e provavelmente foi introduzido no país através da importação de cavalos da Europa (Baltazar *et. al.*, 2012). O mormo é uma das doenças de interesse sanitário abrangidas pelo Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), devendo ser notificado em caso de suspeita ou de resultado positivo em teste diagnóstico (Brasil, 1934; Brasil, 2008).

A legislação regulatória para o controle e erradicação do mormo no Brasil adota o teste de fixação de complemento (FC) e o teste da maleína para a identificação de animais infectados (Brasil, 2004), sendo que ambos os testes apresentam dificuldades relacionados à sua execução, incluindo a morosidade e complexidade para a realização do teste (FC), demora na obtenção de resultados (FC- até 5 dias e teste da maleína – 48h) e questões relacionadas ao bem-estar animal (teste da maleína), motivos pelos quais se faz necessário aprofundar os estudos acerca do diagnóstico desta enfermidade.

Os objetivos do presente trabalho incluem a realização de uma discussão acerca dos principais métodos e técnicas utilizados no diagnóstico de mormo, bem como demonstrar o desenvolvimento de um teste de triagem para diagnóstico de mormo pelo método de soroaglutinação em placas, de simples execução, baixo custo e obtenção do resultado em apenas alguns minutos.

## 2 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS DE MORMO

### RESUMO

As zoonoses estão cada vez mais em foco na saúde pública e animal devido às dificuldades na prevenção da transmissão e controle destas enfermidades. O mormo, uma zoonose altamente contagiosa e fatal de equídeos, é atualmente endêmica no Brasil e, portanto, uma das principais causas de barreiras sanitárias impostas à exportação desses animais, seus produtos e sub-produtos. Muitos métodos para diagnóstico de mormo têm sido estudados, incluindo diretos e indiretos. Este trabalho aborda as principais técnicas utilizadas no diagnóstico de mormo, e as relaciona às realidades sanitárias Brasileiras.

**PALAVRAS-CHAVE:** Zoonoses, Diagnóstico de Mormo, Técnicas Diagnósticas.

## ABSTRACT

Zoonosis are the main focus of public and animal health due to difficulties in it's prevention and control. Glanders, a highly contagious and fatal zoonotic disease of horses, is currently endemic in Brazil and, therefore, a major cause of sanitary barriers to the export of these animals, their products and by-products. Many methods for the diagnosis of glanders have been studied, including direct and indirect methods. This work demonstrate the main techniques used in the diagnosis of glanders and relate them to Brazilian health realities.

**KEY WORDS:** Zoonosis, Glanders Diagnosis, Diagnostic Techniques.

## 2.1 INTRODUÇÃO

As zoonoses são cada vez mais o foco em Saúde Pública e defesa sanitária devido às dificuldades na prevenção da transmissão e controle. Devido à vários fatores como: aumento da população, mudanças climáticas e aquecimento global, doenças emergentes e re-emergentes. Essas doenças, como: a tuberculose, a brucelose, a salmonelose, o mormo, a *influenza* aviária e suína, entre outras, afetam severamente a saúde humana e animal, além de causarem sérios prejuízos sócio-econômicos (Verma, *Et. al.*, 2013; Cascio *et. al.*, 2011) .

Dentro desse contexto, o mormo é considerado uma zoonose altamente contagiosa e fatal de equídeos, erradicada em países desenvolvidos entre os anos 1940 a 1960, devido à rigorosas políticas de teste e abate. Atualmente é considerada endêmica no Brasil e, portanto, uma das principais causas de barreiras sanitárias impostas à exportação desses animais, seus produtos e subprodutos (Neubauer, *Et. al.*, 2005; Estes, *Et. al.*, 2010)

Devido à erradicação da doença alcançada nos países desenvolvidos, além de outros fatores como a diminuição da importância do cavalo como meio de transporte após a segunda guerra mundial, as pesquisas veterinárias sobre *B. mallei* foram reduzidas. Apenas alguns esforços foram realizados para melhorar a qualidade do diagnóstico de mormo. Recentemente a pesquisa básica sobre a *B. mallei* está ressurgindo, devido ao seu potencial uso em terrorismo biológico, como um agente biológico. (Neubauer *et. al.*, 2005)

No Brasil, evidenciou-se nos últimos anos aumento no número de casos de mormo em equinos. A doença, antes restrita mais à região norte e nordeste, atualmente é identificada também nas regiões sul, sudeste e centro-oeste, abrangendo grande parte do país (WAHID, 2016).

Atualmente, muitos métodos para diagnóstico de mormo têm sido estudados, incluindo métodos diretos: cultura e métodos moleculares como reação em cadeia da polimerase – PCR, *western blot*, etc.; bem como métodos indiretos: pesquisa de anticorpos em soro com métodos de aglutinação, fixação de complemento, Ensaio Imunoenzimático – ELISA, entre outros (OIE, 2015; Sprague, *Et. al.*, 2009; Khan, *Et. al.*, 2012; Neubauer, *et. al.*, 2005).

O objetivo deste capítulo é relacionar as principais técnicas utilizadas no diagnóstico de mormo, bem como contextualizá-las às realidades sanitárias no Brasil.

## 2.2 DIAGNÓSTICO DE MORMO

*Burkholderia mallei*, agente causador de mormo, é uma bactéria Gram-negativa, imóvel, não esporulada e de parasitismo intracelular facultativo (Blancou, *et.al.*, 2003; Quinn, *et. al.*, 2011). O mormo pode se manifestar clinicamente de 3 formas: pulmonar, nasal e cutânea e o curso da doença pode ser agudo, sub-agudo ou crônico (Blancou, *et.al.*, 2003; Quinn, *et. al.*, 2011).

A forma aguda, mais comum em asininos e muares, é fatal em alguns dias (Mota, *et. al.*, 2010; Khan, *et. al.*, 2012). Entretanto, a susceptibilidade de mulas ao mormo parece ser menor e a doença pode ocorrer de forma sub-aguda ou crônica. Nestes animais, a forma crônica é mais comum em cavalos e o animal pode se tornar portador inaparente por meses a anos, e apresentar sinais clínicos a qualquer tempo (Blancou, *et al.*, 2003; Khan, *et. al.*, 2012).

Há diferentes métodos possíveis para o diagnóstico de mormo, entre os quais podem ser identificados no quadro 1:

Métodos Diretos	<ul style="list-style-type: none"><li>- Identificação do agente</li><li>- Cultivo de <i>B. mallei</i></li><li>- Testes moleculares</li><li>- Inoculação em animais</li></ul>
Métodos Indiretos	<ul style="list-style-type: none"><li>- Fixação de Complemento</li><li>- Ensaio Imunoenzimático - ELISA</li><li>- <i>Imunoblot</i></li><li>- Testes de Soroaglutinação</li></ul>
Teste de Imunidade Celular	<ul style="list-style-type: none"><li>- Teste da Maleína Intradérmico</li></ul>

Quadro 1: Principais Métodos de Diagnóstico de Mormo. Fonte: OIE, 2015.

O mormo pode ser diagnosticado por meio do cultivo da *B. mallei* de lesões ou exudatos respiratórios. As amostras devem ser de lesões frescas, e pode ser difícil de encontrar o microorganismo em lesões mais antigas ou em cortes teciduais. A identificação por sistemas automatizados, apesar de moderna, não é recomendada, pois pode não identificar corretamente o organismo. Em alguns kits comerciais, reações cruzadas podem ocorrer com bactérias não virulentas (IOWA, 2007).

Nos últimos anos, vários ensaios de PCR e PCR em tempo real para a identificação de *B. mallei* foram desenvolvidos, mas apenas um ensaio de PCR convencional e um de PCR em tempo real foram avaliados utilizando amostras de surtos recentes de mormo em cavalos. Esses dois ensaios, para serem adotados, precisam de mais estudos para confirmar sua robustez (OIE, 2015). A sensibilidade de ensaios de PCR para amostras clínicas ainda é desconhecida. Um resultado negativo, portanto, não é prova da ausência de *B. mallei* na amostra e então outros métodos diagnósticos devem ser aplicados para confirmação (OIE, 2015).

A inoculação em animais (*Cavia cobaya*) de culturas contendo isolados de *B.mallei* provoca a chamada “*reação de Strauss*”, causando orquite e peritonite nos animais inoculados. A sensibilidade deste método é de apenas 20%, e ao menos 5 animais devem ser inoculados. Por questões relacionadas a bem-estar animal, este método atualmente não é considerado adequado (Khan, *et. al.*, 2012; OIE, 2015).

A FC foi o método diagnóstico mais utilizado em programas de erradicação, devido à sua capacidade de detectar portadores clinicamente inaparentes ou cavalos cronicamente infectados, que são os principais

responsáveis por disseminar a doença e por novos surtos. A FC possui excelente sensibilidade de aproximadamente 97%. Apenas poucos soros de animais velhos, prenhes ou debilitados reagem como falso-negativos (Neubauer *et. al.*, 2005).

A FC fornece resultados positivos em uma semana pós infecção inicial e também reconhece soros de casos crônicos exacerbados, porém são necessários rigorosos controles de qualidade na formulação dos antígenos, dosificação do complemento e sistema hemolítico utilizados no teste. Além disso, exige-se laboratórios bem equipados para sua realização, uma vez que a sua sensibilidade e especificidade são dependentes da qualidade do antígeno e dos insumos utilizados. Portanto, uma correta execução da técnica empregada é imprescindível na realização do ensaio (Elschner *et al.*, 2011, Khan, *et. al.*, 2012). Isto, como consequência eleva o custo e o tempo empregado para a sua realização, uma vez que necessita ser realizado em laboratórios especializados e credenciados junto ao Ministério da Agricultura (MAPA).

Além das desvantagens citadas acima, nesta técnica os resultados falso-positivos podem ocorrer, e animais com estes resultados podem permanecer reagentes por meses. Devido às semelhanças antigênicas, *B. pseudomallei* e *B. mallei* apresentam reações cruzadas e não podem ser diferenciadas por testes como estes. (Cravitz, 1950; Timoney, 1988; Stone, *Et. al*, 2012).

Mesmo testes como ELISA, utilizando diferentes estratégias antigênicas específicas, foram utilizados para o sorodiagnóstico de mormo, porém nenhum deles foi capaz de diferenciar soros de animais infectados com *B. mallei* de *B. pseudomallei* (Sprague *et. al.*, 2009; Khan, *et. al.*, 2012). No entanto, foram desenvolvidos testes do tipo ELISA promissores, obtendo performance

(sensibilidade e especificidade) similar ao teste de FC (Katz *et al.*, 2000), mas eles ainda carecem de reconhecimento pela OIE devido ao pequeno número de amostras avaliados (Khan, *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de um teste de *imunoblot* (*Western Blot*) utilizando antígeno de lipopolissacarídeos de *B. mallei* foi realizado com o objetivo foi obter um teste mais específico para retestar soros falso-positivos na FC (Elschner *et al.*, 2011). Neste estudo, foram encontradas excelentes taxas de sensibilidade e especificidade de 100%, mas este teste não pode diferenciar mormo (*B. mallei*) de melioidose (*B. pseudomallei*) e seu uso não foi avaliado em soros de asininos devido ao baixo número de amostras (OIE, 2015).

Testes de soroaglutinação já foram utilizados no passado em programas de erradicação. Um teste de soroaglutinação em placas com o corante rosa bengala (RB) foi descrito para o diagnóstico de mormo em cavalos e outros animais susceptíveis do Paquistão e demonstrou sensibilidade de 90% e especificidade de 100% (Naureen *et al.*, 2007). Estes testes possuem como vantagem, a rapidez de obtenção de resultado e baixo custo para sua realização, porém dependendo da purificação antigênica, podem apresentar muitos resultados falso-positivos, e há estudos em que cavalos debilitados podem ter resultado negativo, o que dificultaria sua utilização em programas de erradicação.

O teste da maleína, uma reação de hipersensibilidade à *B. mallei*, também é utilizado para identificar equídeos infectados. Nos reagentes, ocorre inchaço na pálpebra inferior entre 1 e 2 dias pós injeção intra-palpebral de uma fração proteica de *B. mallei* (IOWA, 2007). Apesar deste teste enfrentar questões relacionadas a preocupações com o bem-estar animal, ele é um dos testes de

eleição no diagnóstico de mormo segundo o MAPA além de ser útil em áreas endêmicas remotas onde o transporte ou resfriamento adequado de amostras não é possível. Como a reação depende do animal infectado estar hipersensível à maleína, casos clínicos avançados e casos agudos em asininos e muares podem ter resultados inconclusivos ou falso-negativos, requerendo métodos diagnósticos complementares (OIE, 2015).

O uso combinado das técnicas de FC, soroaglutinação e teste da maleína, juntamente com políticas sanitárias de isolamento e desinfecção de áreas e teste e abate de animais são consideradas suficientes para utilização em áreas endêmicas. Estes testes já foram amplamente utilizadas durante o processo de erradicação de mormo em países desenvolvidos. Entretanto, em períodos de baixa prevalência, ou em locais onde a doença já está erradicada, deve ser dado mais ênfase nos testes com alta especificidade, para evitar que resultados falso-positivos causem restrições desnecessárias ao transporte internacional de animais (Moore, 1907; Neubauer *et al.*, 2005; Naureen *et al.*, 2007; Elschner, *et al.*, 2009).

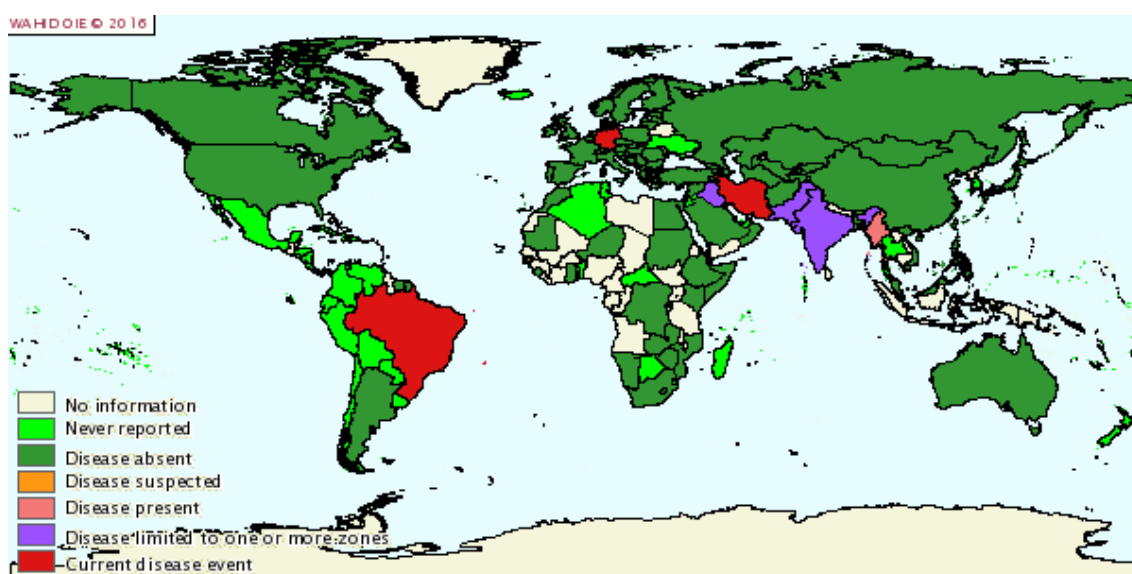


Figura 1: Distribuição de Mormo. Fonte: WAHIS, 2016.

Segundo as recomendações sanitárias internacionais, animais testados positivos para mormo devem ser eutanasiados na propriedade ou sofrerem abate sanitário. Em um surto, as instalações e fômites devem ser isolados, rigorosamente limpos e desinfetados, e as carcaças devem ser queimadas ou enterradas. Sempre que possível, animais susceptíveis devem ser mantidos afastados de instalações contaminadas por diversos meses. Considera-se que a realização de testes rotineiros e eutanásia de animais positivos podem erradicar a doença.

No Brasil, casos suspeitos de animais afetados por mormo são de notificação obrigatória ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A Instrução normativa número 24 de 2004 do MAPA aprova as normas para o controle e a erradicação do mormo.

Os testes preconizados pela IN 24/2004 são o da Fixação de Complemento, que somente pode ser realizada em laboratório oficial ou credenciado, e o teste da maleína, utilizado como teste complementar para animais reagentes à FC e que não apresentam sinais clínicos ou em animais não reagentes à FC que apresentam sinais clínicos da doença. Animais considerados positivos são sacrificados e a propriedade é considerada foco, devendo ser tomadas as providências sanitárias para a contenção da disseminação da doença.

O mormo está tomando cada vez maior importância no cenário nacional, no que concerne à sanidade de equídeos. Novos focos estão constantemente surgindo em diferentes regiões do país, onde, há poucos anos atrás, não se observava. A tabela 1 mostra os focos de Mormo no Brasil, nos últimos três anos.

Apesar da legislação vigente determinar os métodos a serem utilizados, e da fixação de complemento ainda ser considerado a principal técnica diagnóstica, embora apresente alguns pontos negativos, conforme mencionado anteriormente, é necessário ampliar a discussão acerca do modo de controle e diagnóstico da doença, de forma a se aprimorar a identificação e o controle da doença, para que se chegue no principal objetivo do programa sanitário, que é a erradicação do mormo no país.

ESTADO \ ANO	2013		2014		2015	TOTAL
	JAN-JUN	JUL-DEZ	JAN-JUN	JUL-DEZ	JAN-JUN	
Alagoas	0	5	1	0	0	6
Sergipe	4	3	0	1	0	8
Amazonas	1	0	0	0	0	1
Bahia	0	5	2	0	1	8
Ceará	19	3	8	1	6	37
Espírito Santo	4	10	2	1	6	23
Goiás	0	0	0	1	6	7
Maranhão	0	5	0	0	0	5
Mato Grosso	0	0	2	3	9	14
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	6	6
Minas Gerais	3	1	2	5	7	18
Paraíba	3	0	4	6	2	15
Paraná	0	2	2	0	0	4
Pernambuco	5	13	21	5	4	48
Piauí	0	0	0	0	1	1
Pará	0	0	4	2	3	9
Rio de Janeiro	0	0	0	0	1	1
Rio Grande do Norte	2	0	2	2	7	13
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	1	1
Rondônia	1	7	6	2	2	18
Roraima	0	0	0	1	0	1
Santa Catarina	0	0	0	0	6	6
São Paulo	4	9	1	3	7	24
TOTAL	46	63	57	33	75	

Tabela 1: Incidência de Mormo no Brasil. Período 2013 a 2015. Fonte: WAHIS, 2016.



## 2.3 REFERÊNCIAS

BRASIL. MAPA: *Instrução Normativa n. 24 de 5 abr. 2004. Normas para o Controle e a Erradicação do Mormo.*

BLANCOU J.: *History of The surveillance and Control of Transmissible Animal Disease.* Office International des Epizooties, Paris (France), 2003. ISBN 92-9044-507-6.

CASCIO, A M; BOSILKOVSKI, A J; RODRIGUES-MORALES; PAPPAS, G *The socio-ecology of zoonotic infections. Clin. Microbiol. Infect., 17: 336-342, 2011.*

CRAVITZ, L.; MILLER, W.R.: *Immunologic studies with Malleomyces mallei and Malleomyces pseudomallei. I. Serological relationships between M. mallei and M. pseudomallei. J Infect Dis 86:46–51, 1950.*

ELSCHNER, M.C., *et. Al.: Burkholderia mallei infection in a horse imported from Brazil. Equine Veterinary Education, 21, 147-150, 2009.*

ELSCHNER M.C. *et. al. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. BMC Vet. Res., 7, 4. 2011.*

ESTES *et. al. Present and future therapeutic strategies for melioidosis and glanders. Expert Review Anti Infect. Ther., 8 325-338.*

IOWA State University – Animal Disease Information – Technical Factsheets. 2007. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/glanders.pdf>. Acesso em Abril/ 2015.

KATZ J. B.; DEWALD R.; NICHOLSON J. *Procedurally Similar Competitive Immunoassay Systems for the Serodiagnosis of Babesia equi, Babesia caballi, Trypanosoma equiperdum and Burkholderia mallei infections in horses. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 46-50. 2000.*

KHAN L. *et. al. Glanders in Animals: A Review on Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Countermeasures. Blackwell Verlag GmbH – Transboundary and Emerging Diseases, 2012.*

OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals - Chapter 2.5.11. — Glanders. 2015. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> - Acesso em Março/ 2016.

OIE-WAHIS. In World Animal Health Information System of OIE 2015. <http://www.oie.int>.

MOORE V.A.; TAYLOR W. J. *The agglutination Method of Diagnosis in the Control of Glanders. JSTOR The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 4. 1907.

MOTA R. A. *et. al. Glanders in Donkeys (Equus asinus) in the State of Pernambuco, Brazil: A Case Report. Brazilian Journal of Microbiology* 41: 146-149. 2010.

NAUREEN, A., *et. al. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. J.Vet. Diagn. Invest.*, **19**, 362–367. 2007.

NEUBAUER *et. al. Serodiagnosis of Burkholderia mallei Infections in Horses: State-of-the-art and Perspectives. J. Vet. Med. B* 52, 201–205. 2005.

QUINN, P.J.; *et.al: Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Wiley-Blackwell, 2<sup>a</sup> ed., 2011.*

SPRAGUE *et. al. Prevalence-dependent use of sorological tests for diagnosing glanders in horses. BMC Veterinary Research* 5:32. 2009.

STONE J. K. *et. al. Detection of Burkholderia pseudomallei O-antigen serotypes in near neighbor species. BMC Microbiology*, 12:250, 2012.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H., SCOTT, F.W., BARLOUGH, J.G.: *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals. Comstock Publishing Associates, 1988.*

VERMA *et. al. Glanders A Re-emerging Zoonotic Disease: A Review. Journal of Biological Sciences*, 2013.

### 3 DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE TESTE PARA DIAGNÓSTICO DE MORMO POR SOROAGLUTINAÇÃO EM PLACA

#### RESUMO

Mormo é uma zoonose que afeta equídeos causada pela *Burkholderia mallei*. A doença é endêmica em alguns países do Oriente Médio, Ásia, África e América do Sul. Entre 1998 e 2013, foram relatados casos no Brasil, Turquia, Rússia, Iraque, Emirados Árabes Unidos. A legislação regulatória para o controle e erradicação do mormo no Brasil adota o teste de fixação de complemento (FC) e o teste da maleína como os testes oficiais para a identificação de animais infectados. O presente estudo tem como objetivo desenvolver um teste pela técnica de soroaglutinação em placas, que possa servir como complemento ao diagnóstico desta doença. Foram testados 52 soros positivos para mormo no teste FC e 24 negativos. Os resultados mostraram que o teste desenvolvido é promissor, obtendo 87% de sensibilidade, 83% de especificidade e 86% de acurácia em relação ao FC.

**PALAVRAS-CHAVE:** Mormo, Teste Rosa Bengala, Teste de Soroaglutinação Rápida, Diagnóstico Animal.

## ABSTRACT

Glanders is a zoonotic disease that affects equids caused by *Burkholderia mallei*. The disease is endemic in some countries in the Middle East, Asia, Africa and South America. Between 1998 and 2013, glanders was reported in Brazil, Turkey, Russia, Iraq and United Arab Emirates. Regulatory issues for control and eradication of glanders in Brazil adopts the complement fixation test (FC) and the mallein test as the official tests for identification of infected animals. The present study has as main objectives the development of a plate agglutination test which can be used as an alternative to the diagnostic of glanders. 52 FC positive sera and 24 FC negative sera were tested. Results shows that the developed test is promising, obtaining 87% sensitivity, 83% specificity and 86% accuracy when compared to FC.

**KEYWORDS:** Glanders, Rose Bengal Test, Rapid SeroAgglutination Test, Animal Diagnosis.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Mormo é uma zoonose, causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, que afeta primariamente equídeos, provocando a morte em algumas semanas. Outros, os que sobrevivem, se tornam cronicamente infectados, transmitindo a doença por anos (IOWA, 2007).

O mormo foi um problema mundial em equídeos por diversos séculos, sendo suposto que o primeiro a descrever a doença foi Aristóteles (384-322 A.C.) (Blancou, 2003), mas a doença foi erradicada da maioria dos países nos anos de 1940 a 1960. Surtos são incomuns e limitados a certas áreas. Nenhum caso de ocorrência natural de mormo foi relatado nos EUA desde os anos 1940 (CDC, 2014). A doença é endêmica em regiões do Oriente Médio, Ásia, África e América do Sul. Entre 1998 e 2013, foram relatados casos no Brasil, Turquia, Rússia, Iraque, Emirados Árabes Unidos (WAHID, 2015). A distribuição geográfica da *B. mallei* é difícil de ser determinada, uma vez que reações cruzadas com *B. pseudomallei* interferem nas vigilâncias sorológicas (IOWA, 2007). Em 2009, ocorreu um caso alóctone na Alemanha, a partir de um cavalo importado do Brasil (Elschner et al., 2009). É importante ressaltar o potencial de uso da *B. mallei* em bioterrorismo, uma vez que o microrganismo consta da lista do Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC) na categoria B, de segunda maior prioridade (Christian, 2013; Gee, 2003).

A doença é de notificação compulsória e deve ser relatada à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2015). No início do século 20, o mormo estava disseminado na Europa, EUA e Canadá. Campanhas do tipo teste e abate tiveram sucesso na erradicação da doença nesses países (Naureen, *et al.*, 2007).

No Brasil, o mormo foi descrito pela primeira vez em 1811, e provavelmente foi introduzido no país através da importação de cavalos da Europa (Baltazar, *et al.*, 2012). A legislação regulatória para o controle e erradicação do mormo no Brasil adota o teste de fixação de complemento (FC) e o teste da maleína para a identificação de animais infectados (Brasil, 2004). A FC é usada como triagem e pode ser considerada definitiva quando o animal apresenta sinais clínicos da doença. O teste da maleína é usado para a confirmação de casos sub-clínicos que foram positivos na FC (Brasil, 2004; Baltazar, *et al.*, 2012). Ambos os testes têm uma excelente taxa de especificidade (próxima de 100%), e a taxa de sensibilidade chega a 97% na FC e 75,7% no teste da maleína (Naureen, *et al.*, 2007; Elschner, *et al.*, 2011). Apesar da alta especificidade, resultados falso-positivos ocorrem em ambos os testes. (Neubauer *et al.*, 2005).

O FC é o teste prescrito internacionalmente para o controle da doença desde o início do século passado e foi desenvolvido como ferramenta para programas de erradicação para populações animais com alta prevalência, devido à sua capacidade de detectar carreadores clinicamente inaparentes e cavalos cronicamente infectados, responsáveis por disseminar a doença e por novos surtos. Atualmente, a demanda se alterou, por isso é necessário desenvolver uma técnica que reduza resultados falso-positivos e falso-negativos,

frequentemente associados à fixação de complemento, além de levar a um nível maior de automação para que os custos sejam reduzidos (Neubauer et al., 2005).

O FC possui uma excelente sensibilidade de ao menos 97% quando comparada ao teste padrão ouro (Cultura Bacteriana). Apenas poucos soros de animais velhos, prenhes ou debilitados reagem como falso-negativos. Para uso em programas de erradicação, a especificidade da FC foi adequada, embora um considerável número de soros foi relatado como falso-positivos (Neubauer et al., 2005). A aplicação de rigorosos controles de qualidade na formulação dos antígenos, complemento e sistema hemolítico utilizados no teste são cruciais para a sua performance, uma vez que a sua sensibilidade e especificidade são dependentes do antígeno utilizado (Elschner et al., 2011). Além disso, o antígeno utilizado no Brasil é importado, enfrentando grande burocracia para sua obtenção e um custo elevado do produto. Os fatores acima descritos dificultam a execução e a acessibilidade do teste, que só pode ser realizado em laboratórios com estrutura e equipamentos específicos para esta finalidade, aumentando também o custo final para a realização do ensaio.

O teste da maleína, uma reação de hipersensibilidade do tipo IV (retardado) à *B. mallei*, também é utilizado para identificar equídeos infectados. Nos reagentes, ocorre inchaço na pálpebra entre 1 e 2 dias pós injeção intra-palpebral de uma fração proteica de *B. mallei*. O teste da maleína intra-palpebral pode interferir com futuros testes sorológicos (IOWA, 2007).

O teste da maleína não é geralmente recomendado devido a preocupações com o bem-estar animal, devido ao edema palpebral causado, além de reações inflamatórias agudas em caso de animais positivos, entretanto, pode ser útil em áreas endêmicas remotas onde o transporte ou resfriamento

adequado de amostras não é possível. Seu resultado depende da hipersensibilidade dos animais infectados à maleína, por isso, casos clínicos avançados e casos agudos em asininos e muares podem ter resultados inconclusivos, requerendo métodos diagnósticos complementares (OIE, 2015).

O teste de soroaglutinação em placas com o corante rosa bengala (RB) foi descrito para o diagnóstico de mormo em cavalos e outros animais susceptíveis. Em um estudo no Paquistão, o RB demonstrou sensibilidade de 90% e especificidade de 100% (Naureen, *et al.*, 2007).

Durante o último século, *B. mallei* foi erradicada da Europa ocidental, Austrália e América do Norte por uma rigorosa política de abate de animais testados positivo por FC, soroaglutinação em placas e teste da maleína baseado em hipersensibilidade. Essas técnicas são suficientes durante um processo de erradicação no que concerne à especificidade e sensibilidade (Neubauer, *et al.*, 2005).

No Brasil, casos suspeitos de mormo são de notificação obrigatória ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A normativa 24/2004 do MAPA preconiza que a FC somente pode ser realizada em laboratório oficial ou credenciado, e o teste da maleína, utilizado como teste complementar para animais reagentes à FC e que não apresentam sinais clínicos ou em animais não reagentes à FC que apresentam sinais clínicos da doença. Animais considerados positivos sofrem abate sanitário e a propriedade é considerada foco, devendo ser tomadas as providências sanitárias para a contenção da doença (Brasil, 2004). Alguns dos entraves existentes no controle da doença são a aglomeração de animais em eventos equestres, que por vezes são realizadas informalmente e o transporte de animais sem o cumprimento da

legislação quanto à realização de exame antes do transporte de animais de locais onde a doença está presente.

Segundo o MAPA (2016), atualmente no Brasil há 29 laboratórios credenciados para a realização de teste de FC para diagnóstico de mormo, número considerado pequeno para um país de dimensões continentais como o Brasil, além do que, nem todos efetivamente realizam o teste atualmente.

O presente estudo tem como objetivo desenvolver um teste de simples execução, que possa ser utilizado como triagem, pela técnica de soroaglutinação rápida, para servir como complemento ao diagnóstico desta doença.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 ORIGEM DA CEPA DE *B. mallei*

A cepa de *B. mallei* utilizada foi cedida pelo Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO), localizado na cidade de Pedro Leopoldo, Minas Gerais. Esta cepa estava na forma liofilizada e foi isolada a partir de um equídeo positivo para mormo.

### 3.2.2 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA CEPA DE *B. mallei*

Para que se pudesse utilizar a cepa na elaboração do antígeno para o teste de soro-aglutinação, foram realizados teste necessários para confirmar a viabilidade, identidade e pureza da cepa. Para isso, foram combinados métodos bioquímicos e moleculares, conforme segue:

### 3.2.2.1 CULTIVO

A cepa liofilizada, armazenada em frasco estéril, foi reconstituída adicionando-se 1 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI). Após a total dissolução do pó, foi realizado o repique com alça bacteriológica descartável para placas contendo Ágar Sangue, MacConkey bem como em tubos contendo 5 mL de caldo BHI, prontos para uso (Laborclin). Estas placas foram incubadas a 37°C e a 42°C por 48 h. O crescimento bacteriológico foi avaliado observando-se as características macroscópicas das colônias, bem como tintoriais através da coloração de Gram.



Figura 3: Cultivo de *B.mallei* em agar sangue. Fonte: O autor, 2014.

### 3.2.2.2 TESTES BIOQUÍMICOS

Por tratar-se de uma bactéria Gram-negativa não fermentadora da glicose, foram realizados os testes de padrão de metabolismo respiratório oxidativos da metabolização de açúcares e motilidade conforme protocolos previamente descritos (Koneman, 1997).

### 3.2.2.3 TESTES MOLECULARES

#### 3.2.2.3.1 OBTENÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *B.mallei*

A extração do DNA genômico de *B.mallei* foi realizada a partir do cultivo de uma colônia isolada de *B.mallei* inoculada em 100mL de caldo BHI e incubada a 37 °C sob agitação durante 48 horas. Após este tempo, o DNA foi purificado a partir de uma alíquota de 1,5 mL do cultivo, utilizando kit comercial HiPurA™ Bacterial Genomic DNA Purification kit (HIMEDIA), conforme metodologia descrita pelo fabricante.

A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliadas pela absorbância por espectrofotometria UV nos comprimentos de onda 260 e 280 nm (*Genova Nano, JENWAY*).

#### 3.2.2.3.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA

Para a amplificação do gene ribossomal bacteriano 16S (16S rDNA), a amostra de DNA genômico foi submetida a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), com o uso da enzima de alta fidelidade Phusion (Thermo Scientific) para evitar possíveis erros de amplificação. Os *primers* utilizados foram: *primer forward* (senso) – 5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC 3' – e *reverse* (anti-senso) – 5' CCC GGG AAC GTA TTC ACC G 3'. A amplificação foi realizada em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*), usando as seguintes condições de ciclagem: um ciclo de desnaturação inicial de 98°C por 1 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 98°C por 30 s, seguidos por anelamento a 60°C por 30

s e extensão a 72°C por 1 min. As amostras foram incubadas por um período adicional de 1 ciclo de extensão a 72°C por 5 min. e mantidas resfriadas a 4° C.

Para confirmação da amplificação das amostras, uma fração dos amplificados foi submetida a eletroforese em gel de Agarose 1% (Invitrogen). O gel foi corado com brometo de etídio (0,5 ug/mL) e visualizado em equipamento fotodocumentador (Vilber Lourmat) sob luz ultravioleta a 590 nm.

Os amplicons foram purificados utilizando o kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (GE Healthcare), conforme especificações do fabricante e o DNA foi quantificado em espectrofotômetro.

#### 3.2.2.3.4 SEQUENCIAMENTO

Os amplicons foram enviados ao Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz – Paraná), onde seguiram para o sequenciamento utilizando-se os *primers* descritos e as sequencias de DNA geradas foram comparadas às do banco de dados do *GenBank*.

### 3.2.3 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO

#### 3.2.3.1 CULTIVO

A cepa reconstituída foi repicada em placa contendo meio de cultura Agar Sangue e então incubada a 37°C por 48 h, quando ocorreu novo repique para 4 tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI, incubados a 37°C por 96 h. Após este período, o conteúdo de cada tubo de ensaio apresentando turbidez foi transferido para uma garrafa tipo *Roux*, contendo uma camada de ágar *Mueller Hinton* adicionado de glicerol a 3%, por 96 h.

Após esta etapa de concentração, observou-se a formação de uma película de crescimento bacteriano superficial, a qual foi coletada adicionando-se 10 mL de álcool etílico absoluto no interior de cada garrafa, conforme procedimento descrito por White (1950), citado por Edwards & Ewing (1972). Para promover o rápido desprendimento do induto bacteriano superficial em álcool, foi utilizado também o auxílio de uma alça de Drigalski. O conteúdo obtido de cada garrafa (solução de células diluídas em álcool absoluto) foi coletado em frascos de vidro borossilicato, que seguiram para a etapa de inativação.

#### 3.2.3.2 INATIVAÇÃO

A inativação foi realizada pelo calor em banho-maria com agitação, a 70°C por 1 h. Após este procedimento, testes de verificação da inativação bacteriana foram realizados, para assegurar a eficácia da mesma. Os frascos permaneceram em refrigeração até a leitura do cultivo pós inativação.

### 3.2.3.3 FORMULAÇÃO DO ANTÍGENO

Para a devida concentração antigênica, utilizou-se um protocolo semelhante e adaptado daquele para obtenção de antígeno para diagnóstico sorológico de Brucelose (OIE, 2009). A massa bacteriana inativada foi centrifugada a 5200 Xg por 20 minutos e o sobrenadante alcoólico foi descartado. Adicionou-se salina fenolada 0,5%, na proporção de 22,5 mL para 1 g de massa bacteriana e realizou-se agitação vigorosa para dissolver o *pellet*, até homogeneizar a solução de maneira a obter-se antígeno dissolvido inteiramente sem a formação de grumos.

A este concentrado celular, adicionou-se a solução de corante rosa bengala 1%, na proporção de 1 mL de corante para 35 mL da solução contendo salina fenolada e massa bacteriana. O frasco ficou sob agitação em temperatura ambiente (22°C) por 2 h e, após o período, a solução foi filtrada em malha algodão para a retirada de grumos, se presentes. Após esta etapa, foi realizada nova centrifugação a 5.200 Xg por 20 minutos e o sobrenadante foi descartado. Realizou-se nova pesagem da massa celular obtida e, a esta, adicionaram-se 7 mL de solução diluente (tampão salina fenolada 0,5% - Hidróxido de sódio – Ácido Láctico - pH final 3,65) para cada 1 g de massa bacteriana corada. A solução foi homogeneizada até a total dissolução dos grumos.

Após o cumprimento destas etapas, obteve-se o antígeno a ser testado em pH a 3,65 e a concentração celular de 8% (método Fitch-Hopkins).



Figura 4: Antígeno para diagnóstico de mormo por soroaglutinação em placas. Fonte: O autor, 2014.

### 3.2.4 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PRELIMINAR DO TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO

O antígeno formulado foi testado frente a 52 soros reagentes para FC com títulos variando entre 1:5 e 1:320, e frente a 24 soros não reagentes para FC.

A FC será a base de comparação para o antígeno teste, uma vez que este também é o teste reconhecido pela OIE para comércio internacional.

Os soros conhecidamente positivos foram obtidos junto ao Laboratório Nacional Agropecuário – LANAGRO/PE – que é o laboratório oficial para diagnóstico de mormo do MAPA. Dos 24 soros negativos utilizados, 18 foram obtidos junto ao Regimento de Polícia Montada Coronel Dulcídio, da Polícia Militar do Paraná (PMPR), situado em Curitiba-PR e 6 foram obtidos junto ao LANAGRO/PE.

Definiu-se o seguinte protocolo para a realização do ensaio: Adicionam-se, em uma placa de vidro, 30 uL de soro teste e 30 uL de antígeno, sendo posteriormente homogeneizados por até 4 minutos quando realiza-se a leitura (Brasil, 2006). Um soro reconhecidamente não reagente serviu como controle negativo da reação. Foram consideradas como reagentes as amostras que apresentaram aglutinação superior ao controle negativo em até 4 minutos, e negativas aquelas que apresentaram aglutinação igual ou inferior ao controle negativo.

A análise estatística dos dados foi realizada ao calcular a sensibilidade e especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP), Valor Preditivo Negativo (VPN) e acurácia do teste RB frente ao FC, conforme descrito por Forbes, *et. al.* (1998)

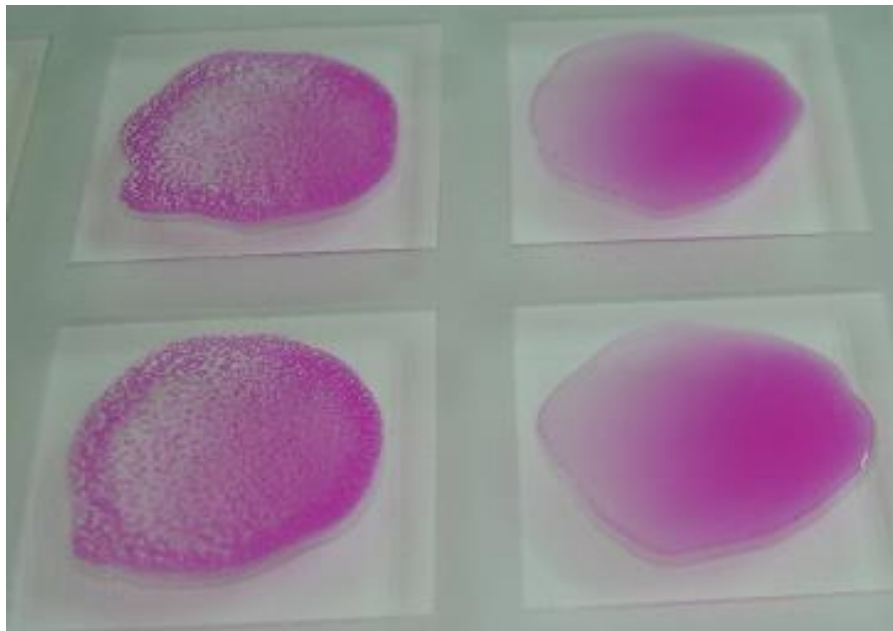


Figura 5: Resultados Positivo (esquerda) e Negativo (direita) de teste de soroaglutinação em placas para o diagnóstico de mormo. Fonte: O autor, 2015.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DA CEPA DE *B. mallei*

No experimento realizado, o crescimento bacteriano apresentou, macroscopicamente, colônias pequenas de coloração esbranquiçada, sendo que, ao realizar uma lâmina, obteve-se como resultado bacilos Gram negativos, além de apresentar nos testes complementares realizados os seguintes resultados:

- Crescimento em BHI e ágar sangue, sem a presença de hemólise, porém não houve crescimento em ágar MacConKey;
- Oxidação da glicose positiva, lactose negativa e sacarose negativa;
- Motilidade negativa;
- Crescimento a 42° C negativo.

Estes resultados estão de acordo com a literatura sobre a morfologia de colônia em ágar sangue da *B. mallei* se apresentar como branca-amarelada e lisa, se tornando granular em cultivos mais velhos (Quinn et al, 2011). A *B. mallei* é um cocobacilo reto ou levemente curvo, imóvel, Gram-negativo, sendo que cultivos mais velhos podem apresentar pleomorfismo (IOWA, 2007).

Segundo Quinn et al. (2011), *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia pseudomallei* apresentam crescimento em Agar MacConkey, enquanto 25% das cepas de *B.mallei* podem não apresentar. Ainda, *P. aeruginosa* e *B. pseudomallei* apresentam crescimento em 42° C e motilidade, enquanto *B. mallei* é negativa em ambos os parâmetros. Quanto ao padrão de oxidação de

açúcares, *P. aeruginosa* e *B. mallei* são glicose positivas e lactose e sacarose negativas, enquanto *B. pseudomallei* é positiva para todos.

#### 3.3.1.1 AMPLIFICAÇÃO DO GENE 16S rDNA

As reações de PCR para amplificação do gene rDNA 16S foram confirmadas pela análise dos fragmentos de aproximadamente 1000 pb.

Após a análise do amplificado por PCR, foi realizado o sequenciamento da amostra, onde foi observado a sequência de 1039 pares de bases, que foram analisados em programa *BLAST* e obteve-se como resultado, 99% de identidade tanto com *B. mallei* quanto *B. pseudomallei*, além de demonstrar alta semelhança (acima de 90%) com *Pseudomonas sp.* Optou-se pela realização da amplificação do gene 16 S por ser a região do DNA mais utilizada para propósitos taxonômicos em bactérias (Clarridge, 2004). Isso se deve a várias razões, entre elas a presença deste gene em quase todas as bactérias, sua preservação ao longo do tempo, o que sugere que mudanças na sua sequência se devem à evolução e seu tamanho (1500 pB), que é suficiente para análises (Janda, 2007). Os resultados corroboram ainda com GEE, 2003, no que concerne às sequências do gene 16S de *B. mallei* e *B. pseudomallei*, que podem variar de 0,5 a 1,5 pares de bases.

Os resultados de sequenciamento obtidos, analisados conjuntamente aos resultados de testes bioquímicos e de crescimento permitem confirmar que a cepa utilizada é *B. mallei*.

### 3.3.2 CULTIVO E OBTENÇÃO DO ANTÍGENO

A elaboração do antígeno exige cuidados com relação aos parâmetros finais atingidos no que se refere ao pH, volume celular e à individualização das células.

O cultivo de *B. mallei* e elaboração do antígeno exigiram cuidados quanto à preservação da camada de lipopolissacarídeo de membrana, uma vez que ao perder essa camada, a cepa se torna rugosa e pode apresentar diferentes resultados. Esta questão foi minimizada ao adotar o procedimento descrito por Edwards (1972), para o tratamento das células no momento da coleta. Isto parece importante para evitar problemas como auto-aglutinação ou aumento de reações cruzadas.

As reações cruzadas podem ser comuns devido à presença do Lipopolissacarídeo de membrana e à similaridade da *B. mallei* com outras bactérias, principalmente do gênero *Burkholderia*, em especial a *B. pseudomallei*, causadora da melioidose em animais e humanos, e *Pseudomonas* sp. (Neubauer, *Et. al*, 2005; Khan, *Et. al.*, 2012; Stone, *Et. al*, 2012)

Quanto à elaboração do antígeno, adaptou-se o protocolo descrito para obtenção do Antígeno Acidificado Tamponado corado com rosa bengala, utilizado no Brasil pelo MAPA, como técnica de triagem para o diagnóstico de Brucelose bovina, optando-se por incluir a utilização de um controle negativo na reação para evitar erros de leitura de soros falso-positivos com reações inespecíficas (*background*) encontradas.

O pH mantido em 3,65 +- 0,05 tem a função de inibir a aglutinação com imunoglobulinas pentâmeras da classe IgM, fazendo com que a reação ocorra

na presença de IgG. O volume celular também foi padronizado conforme a técnica preconizada para o antígeno de brucelose (Brasil, 2006; OIE, 2009). Ambos os parâmetros são críticos para a sensibilidade e especificidade do antígeno.

Há a expectativa de que as reações inespecíficas encontradas em soros negativos possam ser devido a diversos fatores, entre eles: a concentração do Antígeno; ineficácia do pH (3,65) em inibir totalmente IgM; possibilidade de reações cruzadas com outras bactérias, ou presença de aglutininas não específicas, sendo que animais positivos reagem em diluições maiores (Timoney, 1988, Cravitz, 1950).

Naureen *et. al* (2007) ao validar um teste de soroaglutinação para mormo resolveram esta situação considerando positivos apenas soros que apresentaram reação positiva a partir de duas cruces, em uma escala variando de zero a quatro cruces.



Figura 6: Execução do teste de soroaglutinação em placas para diagnóstico de mormo. Fonte: O autor, 2015.

### 3.3.3 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PRELIMINAR DO TESTE DE SOROAGLUTINAÇÃO DESENVOLVIDO

Dos 52 soros positivos para FC testados, 45 obtiveram resultados positivos e 7 obtiveram resultados negativos em RB. Dos 24 soros negativos, 20 obtiveram resultados negativos e 4 positivos em RB.

A partir disso, calculou-se a sensibilidade em 86,5% e a especificidade em 83,3%.

O resultado obtido para o VPP foi de 91,8% e para o VPN 74,1%.

A acurácia, calculada a partir da soma dos Verdadeiros Positivos e Verdadeiros Negativos encontrados no teste RB dividido pelo número total de amostras utilizadas foi de 85,5%.

### 3.4 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados com a cepa utilizada no presente trabalho nos testes de crescimento e bioquímicos condizem com o padrão de crescimento de *B.mallei* descrito em literatura. Os resultados encontrados nos testes moleculares, em análise conjunta aos resultados dos testes bioquímicos realizados, confirmaram a identificação da cepa utilizada na realização deste trabalho.

O protocolo utilizado para o cultivo e elaboração do antígeno se mostrou adequado para a obtenção do antígeno, e a metodologia de realização do ensaio se mostrou satisfatória para a obtenção de resultados confiáveis.

Os resultados estatísticos obtidos demonstram que o teste de aglutinação em placa desenvolvido apresenta boa performance, quando comparado a FC, demonstrando potencial para utilização no diagnóstico de mormo, necessitando aprofundamento dos estudos, principalmente acerca do método de obtenção e purificação, para o aprimoramento dos resultados, além de ampliar o número de amostras testadas para efetivar a validação do teste desenvolvido.

### 3.5 REFERÊNCIAS

BADAKHSH, F.F.; CARMICHAEL, L.E.; DOUGLASS, J.A.: *Improved Rapid Slide Agglutination Test for Presumptive Diagnosis of Canine Brucellosis*. J. Clin. Microbiol 15 (2): 286-289, 1982.

BALTAZAR *et al.* *Development and validation of a method for purification of mallein for the diagnosis of glanders in equines*. BMC Veterinary Research, 8:154. 2012.

BLANCOU J.: *History of The surveillance and Control of Transmissible Animal Disease*. Office International des Epizooties, Paris (France), 2003. ISBN 92-9044-507-6.

BRASIL. MAPA: *Decreto n. 24548 de 3 julho 1934. Aprova o regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal*.

BRASIL. MAPA: *Instrução Normativa n. 24 de 5 abr. 2004. Normas para o Controle e a Erradicação do Mormo*.

BRASIL. MAPA: *Instrução Normativa n. 15 de 25 fev. 2004. Regulamento Técnico para Produção e Controle de Qualidade da Vacina contra a Brucelose e Antígenos para Diagnóstico da Brucelose*.

BRASIL. MAPA. *Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal (PNCEBT)* / Vera Cecilia F. de Figueiredo, José Ricardo Lôbo, Vitor Salvador P. Gonçalves.,2006. 188 p. ISBN 85-99851-01-2.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). <http://www.cdc.gov/glanders/>. Acesso em Abril/2015.

CHRISTIAN, M.D. *Biowarfare and Bioterrorism*. Crit Care Clin 29, 717–756, 2013.

CLARRIDGE III, J.E.: *Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Clinical Microbiology Reviews, Oct. 2004, p. 840–862 Vol. 17, No. 4. DOI: 10.1128/CMR.17.4.840–862.2004

CRAVITZ, L.; MILLER, W.R.: *Immunologic studies with Malleomyces mallei and Malleomyces pseudomallei. I. Serological relationships between M. mallei and M. pseudomallei.* J Infect Dis 86:46–51, 1950.

EDWARDS, P.R.; EWING, W.H.: *Identification of Enterobacteriaceae. Cap. 8 The Genus Salmonella, 146-207.* Burgess Publishing co., 3ª ed., 1972.

ELSCHNER, M.C., et. Al.: *Burkholderia mallei infection in a horse imported from Brazil.* Equine Veterinary Education, 21 (#), 147-150, 2009.

ELSCHNER M.C. et. al. *Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders.* BMC Vet. Res., 7, 4. 2011.

FORBES, B.A., et. Al.: *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology.* Mosby Inc, 10ª ed., 1998.

GEE, J.E.; et. Al.: *Use of 16S rRNA Gene Sequencing for Rapid Identification and Differentiation of Burkholderia pseudomallei and B. mallei.* J. Clin. Microbiol. 2003, 41(10):4647. DOI: 10.1128/JCM.41.10.4647-4654.2003.

IOWA State University – Animal Disease Information – Technical Factsheets. 2007. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/glanders.pdf>. Acesso em Abril/ 2015.

JANDA, M.J.; ABBOTT, S.L.: *MINIREVIEW - 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls.* Journal of Clinical Microbiology, Sept. 2007, p. 2761–2764 Vol. 45, No. 9 DOI:10.1128/JCM.01228-07

KHAN L. et. al. *Glanders in Animals: A Review on Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Countermeasures.* Blackwell Verlag GmbH – Transboundary and Emerging Diseases, 2012.

KONEMAN E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHERECKENGERGER, P.C.; WINN, Jr, W.C.: *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Cap. 5: The NonFermentative Gram-Negative Bacilli 253-320.* Lippincott – Raven Publishers, 5ª ed., 1997.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em Fevereiro/2016.

NAUREEN, A., *et. al.* *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.

NEUBAUER *et. al.* *Serodiagnosis of Burkholderia mallei Infections in Horses: State-of-the-art and Perspectives.* *J. Vet. Med. B* 52, 201–205. 2005.

*OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals - Chapter 2.4.3. — Bovine Brucellosis.* 2009. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online> - Acesso em Abril/ 2015.

*OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals - Chapter 2.5.11. — Glanders.* 2015. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> - Acesso em Março/ 2016.

OIE-WAHIS. In World Animal Health Information System of OIE 2015. <http://www.oie.int>.

QUINN, P.J.; *et. Al.*: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease.* Wiley-Blackwell, 2<sup>a</sup> ed., 2011.

STONE J. K. *et. al.* *Detection of Burkholderia pseudomallei O-antigen serotypes in near neighbor species.* *BMC Microbiology*, 12:250, 2012.

TIMONEY, J.F.; GILLESPIE, J.H., SCOTT, F.W., BARLOUGH, J.G.: *Hagan and Bruner's Microbiology and Infectious Diseases of Domestic Animals.* Comstock Publishing Associates, 1988.

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil é um dos poucos países onde o mormo ainda é endêmico. Isto se deve a uma série de fatores desde a sua grande extensão territorial, a falta de informação adequada à população (produtores e criadores) e as dificuldades encontradas no controle sanitário.

Um programa sanitário eficaz deve passar por aspectos relacionados à educação sanitária, testes diagnósticos confiáveis para determinada enfermidade alvo e medidas claras de controle que especifiquem as necessidades de realização de testes em animais, quais técnicas serão utilizadas e quais medidas devem ser tomadas em casos positivos da doença, tanto para o mercado interno quanto para importações e exportações.

No caso específico de mormo, percebe-se um incremento gradual de sua importância no cenário nacional, com o surgimento constante de novos focos, antes limitados à região norte e nordeste do país, agora nas regiões sul, sudeste e centro-oeste.

É evidente atualmente a necessidade de ampliar as discussões, o fomento à pesquisa e aprimoramento das normas atuais acerca do tema, em ordem de se estabelecer e alcançar definitivamente um objetivo final, qual seja a erradicação da enfermidade do país, levando em conta três pilares fundamentais em um programa sanitário: Educação e minimização de prejuízos ao produtor, técnicas diagnósticas eficazes de triagem e confirmatória e políticas sanitárias eficazes no controle de focos. Desta forma, abrir-se-ão novas divisas e a equideocultura, já importante na agroindústria, será ainda mais valorizada.

## REFERÊNCIAS

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). <http://www.agricultura.gov.br>. Acesso em Fevereiro/2016.

*OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals - Chapter 2.5.11. — Glanders.* 2015. <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/> - Acesso em Março/ 2016.

NAUREEN, A., *et. al.* *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.

IOWA State University – Animal Disease Information – Technical Factsheets. 2007. <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/pdfs/glanders.pdf>. Acesso em Abril/ 2015.

BALTAZAR *et al.* *Development and validation of a method for purification of mallein for the diagnosis of glanders in equines.* *BMC Veterinary Research*, 8:154. 2012.

BRASIL. MAPA: *Instrução Normativa n. 24 de 5 abr. 2004. Normas para o Controle e a Erradicação do Mormo.*

BRASIL. MAPA: *Decreto n. 24548 de 3 julho 1934. Aprova o regulamento do Serviço de Defesa Sanitária Animal.*

BRASIL. MAPA: *Instrução Normativa n. 17 de 8 maio 2008. Institui o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos Normas para o Controle e a Erradicação do Mormo.*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 013/2015, referente ao projeto “Desenvolvimento de Antígeno para Diagnóstico de Mormo por Soroaglutinação em Placas”, sob a responsabilidade de Rubens C. de Oliveira, na forma em que foi apresentado (utilização de sangue previamente coletado e como grau A de invasividade), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná - Brasil, em reunião realizada dia 22 de Abril de 2015.

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 013/2015, regarding the project “Development of Antigen for Diagnostic of *Mormo* by serum agglutination tests on plates”, under Rubens C. de Oliveira supervision, in the terms it was presented (use of collected blood and was classified as grade A of invasiveness), was approved by the Animal Use Ethics Committee of the Agricultural Sciences Campus of the Universidade Federal do Paraná (Federal University of the State of Paraná, Brazil) during session on April 22, 2015.

Curitiba, 22 de Abril de 2015.

Ananda Portella Félix  
Presidente CEUA-SCA

Simone Tostes de Oliveira Stedile  
Vice-Presidente CEUA-SCA

## VITA

Rubens Chaguri de Oliveira é formado em Medicina Veterinária pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná em 2003 e especialista em administração pela Pontifícia Universidade Católica do Paraná em 2004.

Ainda em 2003, foi um dos sócios-fundadores do Bionostic Análises Laboratoriais, localizado em Curitiba-PR, onde trabalhou até 2005.

Em 2005 foi aprovado em primeiro lugar para o cargo de Médico Veterinário em concurso público do Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), onde trabalhou até 2015. No TECPAR, atuou na produção de antígenos para o diagnóstico da Brucelose Bovina (Antígeno Acidificado Tamponado, Prova Lenta em Tubo e Prova do Anel no Leite), Tuberculose Bovina (Tuberculina Bovina e Tuberculina Aviária) e Leucose Enzoótica Bovina, além de projetos de desenvolvimento de antígenos e kits para diagnóstico veterinários e na produção e desenvolvimento da vacina antirrábica para uso veterinário por cultivo celular, ocupando cargo de gerente dos laboratórios de Vacina Antirrábica e de Kits Diagnósticos Veterinários durante 7,5 anos. Durante o período, respondeu como responsável técnico do estabelecimento e dos produtos junto ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Paraná.

Em 2014, foi aprovado em concurso público para o cargo de Fiscal de Defesa Agropecuária – Médico Veterinário, da Agência de Defesa Agropecuária do Paraná (ADAPAR), onde trabalha desde agosto de 2015.