

PAULO CASTELO BRANCO DE GOUVEIA FILHO

**DESEMPENHO DA FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO PARA DIAGNÓSTICO
DO MORMO UTILIZANDO ANTÍGENO DE CEPAS BRASILEIRAS DE
*Burkholderia mallei***

RECIFE

2017

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

PAULO CASTELO BRANCO DE GOUVEIA FILHO

DESEMPENHO DA FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO PARA DIAGNÓSTICO
DO MORMO UTILIZANDO ANTÍGENO DE CEPAS BRASILEIRAS DE
Burkholderia mallei

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares Castro

RECIFE

2017

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

DESEMPENHO DA FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO PARA DIAGNÓSTICO
DO MORMO UTILIZANDO ANTÍGENO DE CEPAS BRASILEIRAS DE
Burkholderia mallei

Dissertação de Mestrado elaborada por

PAULO CASTELO BRANCO DE GOUVEIA FILHO

Apresentado em 24/02/2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Soares de Castro
Orientador - DMV/UFRPE

Dr^a. Adriana Soares Leite
Examinadora - LANAGRO-PE

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Examinador -DMV/UFRPE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

- G719d Gouveia Filho, Paulo Castelo Branco de.
Desempenho da fixação do comportamento para diagnóstico
do mormo utilizando antígeno de cepas brasileiras de *Burkholderia*
mallei / Paulo Castelo Branco de Gouveia Filho. – 2017.
41 f.: il.
- Orientador: Roberto Soares de Castro.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de
Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária,
Recife, BR-PE, 2017.
Inclui referências.
1. *Burkholderia mallei* 2. Equino 3. Diagnóstico
I. Castro, Roberto Soares de, orient. II. Título.

CDD 636.089

Aos meus pais Paulo e Irene (*In memoriam*)

Pelo amor, formação e apoio ao longo de minha vida profissional.

DEDICO...

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde coragem de levantar todos os dias buscando um futuro melhor, pelo dom que me foi dado para o exercício da profissão.

A minha família, minha esposa Alessandra meus filhos Felipe, Irene, por existirem em minha vida, sendo eles uma fonte inesgotável de amor carinho e compreensão.

A meus filhos Polyana e Paulo Neto pela confiança e respeito.

A meus irmãos, Ana Carolina, Antônio Fernando, Irene, Miquelina, Claudia, e Sandra pelo amor que sempre nos uniu e pelo o apoio durante toda a vida.

Ao Professor Roberto Soares de Castro pelo incentivo e apoio de retornar a Universidade após 29 anos para realização do mestrado, a Dr. Sergio Alves pela a ajuda e orientação ao longo do mestrado.

Aos professores Marcos Antônio Lemos de Oliveira, Marcelo Tigre, Paulo Fernandes de Lima, pelos ensinamentos e orientação.

Aos Colegas que ao longo de 29 anos colaboraram de alguma forma com minha carreira profissional.: Dr. Joaquim Correia, Dr. Oswaldo Gomes, Dra. Marcilia Alves de Souza, Dr. Fernando Pinto, Dr. Mércio Peixoto, Dr. José Carlos Ferreira da Silva, Dr. Luiz Cosme da Silva Júnior.

Aos clientes e amigos Mario Lins Borba, Paulo Correia de Oliveira Neto e Marcionilo Pedrosa Costa, pela ajuda e incentivo, sempre acreditando no meu trabalho.

Aos funcionários do Laboratório Sociedade Nordestina dos Criadores, Rafael Farias, Érica Teodoso, Gisele Ramos, pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

Obrigado a todos!

“O homem não é nada além daquilo que a educação faz dele”

Immanuel Kant

RESUMO

Título: Desempenho da fixação do complemento para diagnóstico do mormo utilizando antígeno de cepas brasileiras de *Burkholderia mallei*

Autor: Paulo Castelo Branco de Gouveia Filho

Orientador: Prof. Dr. Roberto Soares Castro

O mormo é uma zoonose frequentemente fatal que afeta equinos, asininos e muares, causada pela *Burkholderia mallei*. A Fixação do Complemento (FC) é o teste prescrito pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para seu diagnóstico. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o desempenho da FC empregando antígeno (Biovotech, Recife Brasil), produzido com cepas brasileiras de *B. mallei* para diagnóstico do mormo comparativamente ao antígeno c.c.pro (GmbH, Oberdorla, Alemanha), que emprega cepas da Iugoslávia, Índia e Indonésia. Os testes foram realizados em paralelo utilizando o protocolo de incubação a frio (4°C, 12 horas) da mistura soro, complemento e antígeno. Dos 259 soros avaliados, 102 e 133 apresentaram resultado positivo e negativo, respectivamente, em ambos os testes. Vinte e quatro soros negativos no teste com antígeno c.c.pro apresentaram resultado positivo no teste com antígeno Biovotech. O índice de concordância ajustada kappa calculado foi 0,81, considerado quase perfeito.

Palavras chave: *Burkholderia mallei*, equino, diagnóstico

ABSTRACT

Title: Complement Fixation Performance for the diagnosis of glanders using antigen from Brazilian strains of *Burkholderia mallei*.

Author: Paulo Castelo Branco de Gouveia Filho

Advisor: Prof. Dr. Roberto Soares Castro

Glanders is an often fatal zoonosis that affects horses, donkeys and mules, caused by *Burkholderia mallei*. Complement Fixation (CF) is the test prescribed by the World Organization for Animal Health (OIE) for its diagnosis. This work was conducted with the objective of evaluating the performance of CF using antigen produced with Brazilian strains of *B. mallei* (Biovotech, Recife Brazil) for the diagnosis of glanders compared to the antigen c.c.pro (GmbH, Oberdorla, Germany), which employs strains from Yugoslavia, India and Indonesia. The tests were performed in parallel using the protocol of cold incubation (4 ° C, 12 hours) of the serum, complement and antigen mixture. Of the 259 sera evaluated, 102 and 133 presented positive and negative results, respectively, in both tests. Twenty-four negative sera in the c.c.pro antigen test showed a positive result in the Biovotech antigen test. The calculated concordance index kappa was 0.81, considered almost perfect.

Keywords: *Burkholderia mallei*, horse, diagnostic

LISTA DE TABELAS

Páginas

Revisão de Literatura

Tabela 1	Incidência de Focos de Mormo no mundo entre 2004-2013 de acordo com OIE.....	a	4
Tabela 2	Sensibilidade e especificidade dos antígenos para diagnóstico de Mormo....		8
Tabela 3	Avaliação dos antígenos c.c.pro e CIDC para o diagnóstico do mormo em regiões livres.....	endêmicas e	9

Experimento

Tabela 1	Classificação qualitativa dos valores kappa como grau de concordância além chance.....	da	21
Tabela 2	Distribuição das 259 amostras séricas de equinos utilizadas para comparação do teste de fixação do complemento para diagnóstico do mormo empregando antígenos c.c.pro e Biovetech.....		22
Tabela 3	Distribuição dos resultados de soros equinos testados pela fixação do complemento com antígenos c.c.pro e Biovetech para diagnóstico do mormo.....		23
Tabela 4	Análise da concordância ajustada (Kappa) dos resultados de soros equinos testados pela fixação do complemento com antígenos c.c.pro e Biovetech para diagnóstico do mormo.....		23

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Descrição
AC	Anticomplementar
Ag AL	Antígeno Alemão
Ag BR	Antígeno Brasileiro
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FC	Fixação do Complemento
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
qPCR	Reação em cadeia de Polimerase em tempo Real
Scn	Soro Controle Negativo (Alemão)
Scp	Soro Controle Positivo (Alemão)
Scpe	Soro Controle Positivo do Experimento
USDA	United States Departamento of Agriculture
WB	Western Blotting.

SUMÁRIO

	Páginas
DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
EPÍGRAFE.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
SUMÁRIO.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Mormo.....	3
2.1.1 Etiologia.....	3
2.1.2 Epidemiologia.....	3
2.1.3 Patogenia e Transmissão.....	5
2.1.4 Prevenção.....	6
2.1.5 Controle e Legislação.....	6
2.1.6 Tratamento.....	7
2.1.7 Diagnóstico.....	7
3. REFERÊNCIAS.....	11
4. EXPERIMENTO.....	17
4.1 Desempenho da fixação do complemento para diagnóstico do mormo utilizando antígeno de cepas brasileiras de <i>Burkholderia mallei</i>	18

1 - INTRODUÇÃO

O mormo é uma bacteriose frequentemente fatal que afeta principalmente equinos, asininos e muares, causada pela *Burkholderia mallei*, bactéria gram-negativa, imóvel, parasita intracelular (KHAN et al., 2013). Os animais acometidos apresentam febre alta, sinais respiratórios e lesões cutâneas. A doença geralmente é de evolução aguda em asininos e muares, porém crônica em equinos, com evolução em dias a anos (KHAN et al., 2013). Os métodos de diagnóstico bacteriológicos clássicos, bem como as modernas técnicas moleculares, têm se mostrado insuficientes para detecção do organismo durante a infecção assintomática. Portanto, a identificação desses animais portadores é o maior desafio para o controle do mormo (MALIK, 2016; ELSCHNER et al., 2017).

O mormo é uma doença de notificação obrigatória, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal - OIE (SAID et al., 2016; OIE, 2017a). Apesar de ter a prevalência global consideravelmente reduzida, com erradicação na Europa, América do Norte e Austrália, o mormo é endêmico na África, Ásia, Oriente Médio e América do Sul, inclusive no Brasil, e vem reemergindo com relatos de focos em número crescente de países (OIE, 2017b), inclusive na Alemanha, após 60 anos de erradicação (ELSCHNER et al., 2017).

O Mormo foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1811, introduzido por animais infectados importados da Europa (PIMENTEL, 1938), e foi considerado erradicado em 1968, com o último foco registrado no estado do Rio de Janeiro (LANGENEGGER et al., 1960). Desde 1999, após os relatos nos estados de Pernambuco e Alagoas (MOTA et al., 2000), a doença vem sendo notificada de forma progressiva em quase todas unidades federativas brasileiras (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, 2015).

A prevenção e o controle do mormo dependem de programas sanitários específicos, com detecção precoce dos animais infectados, eliminação dos positivos, rigoroso controle de movimentação e de aglomerações de animais susceptíveis, interdição e higienização das instalações e utensílios, bem como monitoramento sorológico dos animais após saneamento dos focos (ELSCHNER et al., 2017). No Brasil as ações de vigilância e defesa sanitária dos equídeos são coordenadas pelo MAPA, por meio do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos - PNSE (MAPA, 2008), cujas principais medidas sanitárias são o controle de trânsito e de eventos de aglomeração de equídeos, bem como o saneamento dos focos detectados (MAPA, 2004).

A Fixação do Complemento (FC) é o teste prescrito pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico do mormo visando a certificação para trânsito

internacional (OIE, 2015). No Brasil, a FC é o teste de triagem realizado em laboratório oficial ou da rede de laboratórios privados credenciados pelo MAPA (BRASIL, 2004). Apesar do amplo emprego da FC para diagnóstico do mormo, são poucos os estudos sobre a avaliação do seu desempenho. Os resultados dos trabalhos demonstram que há variação do desempenho do teste dependendo do antígeno utilizado (KHAN et al., 2011; LAROUCAU et al., 2016) e da situação epidemiológica da população alvo endêmica versus livre (KHAN et al., 2012).

Considerando que, no Brasil, o teste de FC é realizado com antígenos importados (c.c.pro - Alemanha e USDA - USA) e que recentemente foi desenvolvido um antígeno nacional (Biovetech, Recife) este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o desempenho do antígeno brasileiro para diagnóstico do mormo.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Mormo

O mormo é uma zoonose altamente contagiosa geralmente fatal provocada pela *Burkholderia mallei* que afeta principalmente solípedes, particularmente cavalos, burros e asininos. É uma doença antiga que se acredita ter acompanhado a domesticação precoce de cavalos. Foi descrita pela primeira vez por Aristóteles na Grécia em meados do século III, mencionado em “A Megera Domada” (1623) no Ato II Cena II de Shakespeare para descrever o estado risível do cavalo de Petruccio. A doença também faz uma aparição no capítulo 28 de Alexandre Dumas “Os Três Mosqueteiros” (1844-1845), como uma enfermidade comum de cavalos.

2.1.1. Etiologia

O agente causador do mormo é a bactéria *Burkholderia mallei*, gram-negativa, sem motilidade, não esporulada e facultativamente intracelular. Inicialmente classificada como *Bacillus mallei* (FLUGGE, 1967), *Malleomyces mallei* (MERCHANT e PACKER, 1967) e *Pseudomonas mallei* (WETMORE e GOCHENOR, 1956; SMITH e CHERY, 1957; ROGUL et al., 1970), a *Burkholderia mallei* foi finalmente classificada no gênero *Burkholderia*, baseado nas sequências 16s de rRNA e na homologia DNA-DNA de *B. mallei* e *B. Pseudomallei* (YABUUCHI et al., 1992).

A *Burkholderia mallei* foi isolada pela primeira vez em 1882 a partir de amostras de fígado e baço. Seu isolamento pode ser realizado em Agar batata glicerinado a 1% e sob aerobiose a 37 °C. Após 48 horas de cultura, foram observadas colônias úmidas, viçosas, lisas e confluentes, que tomam aspecto achocolatado decorridos 72 horas (SCHADEWALDT, 1975; MEGID et al., 2016).

Sensível a desinfetantes comuns como iodo, cloreto de mercúrio em álcool, permanganato de potássio, cloreto de benzalcônio (1/2000), hipoclorito de sódio (500 ppm de cloro disponível), etanol a 70%, glutaraldeído a 2% e menos suscetíveis a desinfetantes fenólicos. Em áreas contaminadas, a *Burkholderia mallei* pode sobreviver por mais de seis semanas a vários meses (OIE, 2015).

2.1.2. Epidemiologia

O Mormo foi descrito pela primeira vez no Brasil em 1811, pela introdução de animais infectados na ilha de Marajó, importados da Europa região do Porto em Portugal

(PIMENTEL, 1938). Em 1896, um novo surto foi descoberto na Companhia Paulista de Viação, que utilizava equídeos de tração para os bondes. Entre 1908 e 1909, o mormo acometeu grande número de animais do Exército Brasileiro. Em virtude dessa epidemia, foi fundada a primeira escola de veterinária do país em 1910, pelo tenente coronel João Muniz Barreto de Aragão Patrono da Medicina Veterinária no Brasil.

O Mormo foi erradicado com êxito da Europa, América do Norte e Austrália durante a primeira metade do século 20, através de teste sorológico rigoroso e abate maciço de animais infectados (MAREK e MANNINGER, 1945; DERBYSHIRE, 2002).

Novos casos de mormo foram registrados no Brasil em 1960 e 1967 no Rio de Janeiro, e em seguida em 1968 em São Lourenço da Mata, Pernambuco (LANGENEGGER et al., 1960; MEGID et al., 2016). A doença foi considerada erradicada em 1968, reemergindo nos estados de Pernambuco e Alagoas em 1999 (MOTA et al., 2000). Desde então a doença vem sendo notificada de forma progressiva em quase todas unidades federativas (MAPA, 2015).

A prevalência atual do mormo em todo o mundo é considerada reduzida, embora a doença ainda seja endêmica na África, Ásia, Oriente Médio e América Latina, incluindo o Brasil (seria em áreas restritas). Um fato preocupante foi a doença ter recuperado o status de uma doença reemergente nas últimas duas décadas, como o ressurgimento de focos em um número crescente de países, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Incidência de Focos de Mormo no mundo entre 2004-2016 de acordo com a OIE

Ano	País
2004	Emirados Árabes Unidos
2005	Brasil; Mongólia
2006	Brasil; Índia; Filipinas
2007	Brasil; Filipinas; Índia; Irã; Mongólia; Rússia; Turquia
2008	Brasil; Índia; Irã; Mongólia; Turquia
2009	Afeganistão; Brasil; Índia; Irã; Kuwait; Mongólia; Myanmar; Síria; Turquia
2010	Brasil; Índia; Irã; Iraque; Kuwait; Mongólia; Myanmar; Paquistão; Síria; Turquia
2011	Afeganistão; Índia; Líbano
2012	Brasil
2013	Brasil
2016	Alemanha

(AL-ANI et al., 1998; ARUN et al., 1999; BAZARGANI et al., 1996; ODONTSETSEG et al., 2005; SCHOLZ et al., 2006; ELSCHNER et al., 2009; HORNSTRA et al., 2009; MALIK et al., 2009; NAUREEN et al., 2007; MOTA et al., 2010; WAHID, 2010; WERNERY et al., 2011).

2.1.3. Patogenia e Transmissão

Burkholderia mallei infecta o organismo animal por contato com a pele lesionada, com as mucosas ou pela inspiração de partículas secas contendo a bactéria. Este contato com o animal ocorre, principalmente, por via oral, mediante o consumo de água e alimentos contaminados. A bactéria chega aos linfonodo da região da cabeça, mesentéricos e dissemina-se pelo organismo por via linfo-hermática, localizando-se nos pulmões, rins, baço, fígado e articulações (KHAN et al., 2013; MEGID et al., 2016).

A doença do mormo é aguda e caracterizada por febre e sinais respiratórios em asininos e muares, causando inchaço das narinas, dispneia e pneumonia. Os animais vão a óbito em poucos dias. Por outro lado, em cavalos, a doença tem um curso mais crônico e os animais podem sobreviver por vários anos. Os cavalos doentes apresentam descarga nasal purulenta, pela presença de pústulas inflamatórias, úlceras na concha e no septo nasal e inchaço nos linfonodos submaxilares. Nos pulmões, ocorre formação de abscessos avermelhados com uma zona central necrótica. Estas lesões causam debilidade progressiva nos animais, com episódios de febre, tosse e dispneia. Diarréia e poliúria podem estar presentes. Podem ocorrer abscessos ou úlceras secas na pele (OIE, 2015).

A secreção nasal ou da pele de animais com mormo contém grande quantidade de bactérias viáveis podendo contaminar o ambiente e equipamentos, inclusive as ferramentas de casqueamento ou de adestramento que somado ao contato íntimo entre os animais contribui para a propagação da doença (KHAN et al., 2013). Moscas domésticas também podem transmitir a doença de um animal a outro, como vetor mecânico (LOPEZ et al., 2006).

O fluxo de portadores assintomáticos para comercialização, reprodução e práticas esportivas é a mais importante forma de disseminação da doença entre as criações (KHAN et al., 2013). Por isso, ações de vigilância epidemiológica baseadas no resultado de testes diagnóstico sejam fundamentais para evitar sua propagação ou o reaparecimento em áreas livres.

Cavalos com mormo na forma crônica e aqueles com a infecção subclínica atuam como fonte de infecção para equídeos saudáveis, pois a bactéria é eliminada de forma contínua ou intermitente nesses animais (WITTIG et al., 2006).

2.1.4. Prevenção

A prevenção e o controle do mormo dependem de programas sanitários específicos, com detecção precoce dos animais infectados, eliminação humanitária dos positivos, rigoroso controle de trânsito animal, isolamento e higienização das instalações e utensílios da criação afetada (OIE, 2015).

Uma etapa necessária para o controle e erradicação da doença é a identificação dos animais verdadeiramente infectados dentro de uma população, fato que exige um teste de diagnóstico com sensibilidade alta. Além disso, é importante que os testes de diagnóstico também tenham elevada especificidade, para evitar diagnósticos falso-positivos, que podem levar à eliminação de animais saudáveis e ao questionamento de laudos de diagnóstico, prejudicando programas de controle e erradicação.

2.1.5. Controle e Legislação

O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equinos do mundo e o maior da América Latina, sendo exportador tanto de cavalos vivos, quanto de carne equina. Como boa parte dos países importadores de cavalos do Brasil é livre da doença, o aparecimento de casos de mormo tem afetado este mercado (LIMA e CINTRA, 2016).

No Brasil as ações de vigilância e defesa sanitária dos equídeos são coordenadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos – PNSE, instituído pela INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 17, DE 8 DE MAIO DE 2008. O PNSE visa ao fortalecimento do complexo agropecuário dos equídeos, por meio de ações de vigilância e defesa sanitária animal, através das seguintes atividades: I - educação sanitária; II - estudos epidemiológicos; III - controle do trânsito; IV - cadastramento, fiscalização e certificação sanitária; e V - intervenção imediata quando da suspeita ou ocorrência de doença de notificação obrigatória. As ações previstas no PNSE em cada unidade da federação são de responsabilidade das respectivas Secretarias de Agricultura ou agências de defesa agropecuária (MAPA, 2008).

De acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 24, DE 05 DE ABRIL DE 2004, que estabelece as normas para controle e erradicação do Mormo no Brasil, como também institui a técnica de fixação do complemento como teste diagnóstico de triagem e trânsito no Brasil,

descrevendo a técnica detalhadamente, outras medidas são o controle de trânsito e de eventos de aglomeração de equídeos, bem como o saneamento dos focos detectados. Todas as medidas são baseadas nos resultados de testes sorológicos realizados por laboratórios privados credenciados pelo MAPA ou por laboratórios oficiais do MAPA (MAPA, 2004).

2.1.6. Tratamento

O tratamento é contraindicado, mesmo existindo fármacos antimicrobianos como sulfonamidas/trimetoprima, imipeném, cloranfenicol, cefotaxima, doxiciclina, rifampicina e eritromicina. São de baixa eficácia em virtude da viabilidade intracelular do microorganismo em fagócitos e da dificuldade de atingirem concentrações satisfatórias no interior dos focos piogranulomatosos, e ainda os riscos de transmissão ao homem e outros animais (MEGID et al., 2016).

2.1.7. Diagnóstico

A técnica de FC é bastante laboriosa envolvendo vários fatores como descrito seguindo as IN 24 de 2004. O teste de FC é um método sorológico usado para determinar a presença ou semi-quantificar anticorpos (Ac) ou antígenos (Ag) inibição da Fixação do complemento em uma amostra, utilizando a ação do sistema do complemento. (MAPA, 2004; 2016). O sistema complemento é um conjunto de proteínas séricas que tem por função ajudar na eliminação de microorganismo invasor. Este sistema funciona em cascata e possui três vias. O teste de fixação do complemento tem como base a via clássica, onde o complemento liga-se ao sítio ativo formado pelo complexo antígeno- anticorpo. O complexo Ag-Ac quando moléculas de anticorpos se ligam ao antígeno, os sítios ativos da região Fc tornam-se disponíveis para a ligação do complemento. A ativação do sistema complemento por anticorpos ligados antígenos resulta na formação de complexos de ataque a membrana que podem romper a membrana celular. Se o anticorpo é ligado a antígenos adsorvidos nas hemácias, estas são destruídas e ocorre hemólise (TIZARD e YAWEI, 1998; VAZ et al., 2007).

A FC é o teste prescrito pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para o diagnóstico do mormo visando à certificação para trânsito internacional (OIE, 2015). No Brasil a prova sorológica de FC é o teste oficial prescrito pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) para o diagnóstico do mormo e deve ser realizada em laboratório oficial ou credenciado (BRASIL, 2004).

A OIE considera crucial a aplicação rigorosa do controle de qualidade na formulação dos antígenos da FC do complemento e do sistema hemolítico utilizado no teste, uma vez que

a sensibilidade e a especificidade do teste de FC são criticamente dependentes do antígeno empregado (OIE, 2015).

Apesar do amplo emprego da FC para diagnóstico do mormo, poucos relatos avaliaram seu desempenho. Elschner et al. (2011) avaliaram o teste de FC usando o antígeno c.c.pro (GmbH, Oberdorla, Alemanha) e encontraram sensibilidade alta, pois apresentou 205 positivos na FC de 205 considerados verdadeiros positivos) e especificidade a partir de 1.212 negativos na FC de 1.282 considerados verdadeiros negativos, portanto 70 falsos positivos. Khan et al. (2011) compararam a sensibilidade e a especificidade de três antígenos comerciais usados na FC para diagnóstico do mormo: antígeno c.c.pro (Alemanha), antígeno CIDC (Central Veterinary Institute of Wageningen UR, Holanda) e antígeno USDA (United States Department of Agriculture, Estados Unidos) (Tabela 2).

Khan et al. (2012) avaliaram os antígenos c.c.pro e CIDC para o diagnóstico do mormo em regiões endêmicas e livres, onde foram utilizados 1.678 soros do Paquistão e 200 soros da Alemanha, respectivamente. Ambos antígenos apresentaram alta sensibilidade (Tabela 3). A especificidade foi semelhante para os testes com soro da área endêmica e variou para os soros da área livre. Assim, os resultados demonstram diferentes desempenhos do mesmo teste de FC em diferentes situações epidemiológicas (Tabela 3).

No Brasil, Silva (2014) comparou o desempenho da FC empregando os antígenos c.c.pro e USDA ao teste usando o western blotting (WB). Foram utilizadas 456 amostras séricas de animais provenientes de propriedades dos Estados de Pernambuco, Ceará, Distrito Federal, São Paulo, Espírito Santo e Paraná com histórico de mormo e/ou submetidas à vigilância através da abertura de foco pelas Secretárias de Defesa Animal (SDA). A sensibilidade observada foi de 14,5% utilizando o antígeno USDA e 28,3% com o antígeno c.c.pro. Já especificidade da FC com o antígeno c.c.pro foi de 93,1% e a do antígeno USDA de 94,1%.

Tabela 2. Sensibilidade e especificidade dos antígenos para diagnóstico de Mormo.

Antígeno (País)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
C.C.PRO (Alemanha)	100,0	97,5
CIDC (Holanda)	99,39	96,5
USDA (Estados Unidos)	62,19	100,0

Tabela 3. Avaliação dos antígenos c.c.pro e CIDC para o diagnóstico do mormo em regiões endêmicas e livres

Classificação de Área de Risco	Antígeno (País)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)
Endêmica	c.c.PRO	100,00	75,71
	CIDC	100,00	77,45
Livre	c.c.PRO	100,00	94,79
	CIDC	100,00	93,75

Globalmente, os resultados dos trabalhos apresentados demonstram que há variação do desempenho da FC para diagnóstico do mormo, dependendo do antígeno utilizado (c.c.pro, USDA e CIDC), a situação epidemiológica da população onde os soros foram colhidos para o teste (endêmica x livre). Além disso, os protocolos empregaram método de FC preconizado pela OIE desde 2008.

Além da FC, outros testes podem ser empregados para diagnóstico do mormo. No Brasil, o teste de inoculação intradérmica de PPD-maleína é usado como teste confirmatório. Mais recentemente, o WB passou também a ser adotado como prova confirmatória (MAPA, 2016). Entretanto, a prova de inoculação intradérmica de PPD-maleína possui as maiores limitações para uso. De acordo com as recomendações da OIE (2015), o teste não é recomendado por poder comprometer o bem-estar dos animais, embora possa ser útil em áreas remotas endêmicas, onde o transporte de amostras ou condicionamento sejam difíceis. Este exame causa desconforto no animal, principalmente no caso de reação positiva e depende de uma interpretação também relativamente subjetiva.

O teste de WB foi desenvolvido na Alemanha (ELSCHNER et al., 2011) e o laboratório que o desenvolveu forneceu antígeno para laboratórios oficiais do governo brasileiro (LANAGRO) para a realização do teste. Apesar de ser considerado sensível e específico, a interpretação do resultado possui caráter subjetivo e o ensaio é de difícil repetibilidade e reprodutibilidade.

A reação de polimerase em cadeia (PCR) para detecção de DNA de *B. mallei* pode ser usada para confirmação da presença do agente causal do mormo, principalmente em lesões

post mortem. Porém, o teste tem pouca utilidade em animais vivos, pois o principal material coletado é sangue, que costuma não apresentar a bactéria causadora do mormo. Conforme a OIE (2015), a sensibilidade da PCR em amostras clínicas é desconhecida. Um resultado negativo, portanto, não é a prova de ausência de *B. mallei* na amostra e, portanto, outros meios de diagnóstico devem ser aplicados para a confirmação.

Os ensaios imunoenzimáticos, principalmente o ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA), são considerados mais adequados para diagnóstico de inquéritos epidemiológicos, por serem de fácil execução, permitirem a automatização e tem caráter de leitura objetivo (OIE, 2015).

3 – REFERÊNCIAS

- AL-ANI, F.; AL-RAWASHDEH, O.; ALI, A.; HASSAN, F. Glanders in horses: clinical, biochemical and serological studies in Iraq. **Veterinarski Arhiv**, v.68, p.155-162, 1998.
- ARUN, S.; NEUBAUER, H.; GUREL, A.; AYYILDIZ, G.; KUSCU, B.; Y.; ESILDERE, TMEYER, H.; HERMANN, W. Equine glanders in Turkey. **The Veterinary Record**, v.144, p. 255-258, 1999.
- BAZARGANI, T.; TADJBAKHS, H.; BADII, A.; ZAHRAEI, T. 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.
- BRASIL - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 24, de 05 de abril de 2004, da Secretaria de Defesa Agropecuária, publicada no Diário Oficial da União em 12 de abril de 2004, seção 1, página 7.2004.
- DERBYSHIRE, J.B. The eradication of glanders in Canada. **The Canadian Veterinary Journal**, v.43, p.722-726, 2002.
- ELSCHNER, M.C.; NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L.D. The Resurrection of Glanders in a new Epidemiological Scenario: A Beneficiary of “Global Change”. **Current Clinical Microbiology Reports**, v.4, n.1, p.54-60, 2017.
- ELSCHNER, M.; SCHOLZ, H.C.; MELZER, F.; SAQIB, M.; MARTEN, P.; RASSBACH, A.; DIETZSCH, M.; SCHMOOCK, G.; DE ASSIS SANTANA, V.L.; DE SOUZA, M.M.; WERNERY, R.; WERNERY, U.; NEUBAUER, H. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. **BMC Veterinary Research**, v.7, n.1, p.4, 2011.
- ELSCHNER, M.; KLAUS, C.; 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**, v.21, p.147-150, 2009.

- FLUGGE, F. *Pseudomonas*. In: MERCHANT, I.A.; PACKER, R.A. **Veterinary Bacteriology and Virology**, 7 ed. Ames: Iowa State University Press, 1967, p.659-663.
- 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**, v.15, n.12, p.2036-2039, 2009.
- KHAN, I.; WIELER, L.H.; MELZER, F.; ELSCHNER, M.C.; MUHAMMAD, G.; ALI, S.; SAQIB, M. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. **Transboundary and emerging diseases**, v.60, n.3, p.204-221, 2013.
- KHAN, I.; MANDY C.E.; FALK, M.; MAYADA, G.; LOTHAR, H.W.; 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. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.125, n.3-4, p.117-121, 2012.
- KHAN, I.; WIELER, L.H.; MELZER, F.; GWIDA, M.; SANTANA, V.D.A.; DE SOUZA, M. M.A.; SAQIB, M.; ELSCHNER, M.C.; NEUBAUER, H. Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. **Veterinary Record-English Edition**, v.169, n.19, p.495-499, 2011.
- LANGENEGGER, J.; DOBEREINER, J.; LIMA, A.C. Foco de mormo (*Malleus*) na região de Campos, Estado do Rio de Janeiro 1960. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.3, p.91-108, 1960.
- LAROUCAU, K., COLANERI, C., JAÿ, M., CORDE, Y., DRAPEAU, A., DURAND, B., BECK, C. Interlaboratory ring trial to evaluate CFT proficiency of European laboratories for diagnosis of glanders in equids. **The Veterinary Record**, v. 178, n. 25, p. 632-632, 2016.
- LIMA, R.A.S.; CINTRA, A.G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2016, 56 p.

- LOPEZ, J.; COPPS, J.; WILHELMSSEN, C.; MOORE, R.; KUBAY, J.; ST-JACQUES, M.; FRITZ, D. L. Characterization of experimental equine glanders. **Microbes and Infection**, v.5, p.1125-1131, 2006.
- MALIK, P. Harmonising diagnostic testing for glanders in equids. **Veterinary Record**, v.178, n.25, p.630-631, 2016.
- MALIK, P.; KHURANA, S.; SINGH, B.; DWIVEDI, S. Recent outbreak of glanders in India. **Indian Journal of Animal Sciences**, v.79, p.1015-1017, 2009.
- MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Ofício circular, 002\2016, rede credenciada, 2016.
- MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. SITUAÇÃO DO MORMO NO BRASIL. Departamento de Saúde Animal, Secretária de Defesa Agropecuária, Brasil, 2015.
- MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 17, DE 8 DE MAIO DE 2008. Institui o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2008.
- MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 24, DE 5 DE ABRIL DE 2004. Aprova as normas para controle e erradicação do Mormo, 2004.
- MAREK, J.; MANNINGER, R. Rotzkrankheit. Malleus. **Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere**, v.9, p.591-627, 1945.
- MEGID, J.; RIBEIRO, M.G.; PAES, A.C. **Doenças Infeciosas em Animais de Produção e de Companhia**. Rio de Janeiro, 1 ed., Roca, 2016, p.423-432.
- MERCHANT, I. A.; R.A. PACKER. **Veterinary Bacteriology and Virology**, 7 ed., Ames, Iowa State University Press, 1967, p.64-369.

- MOTA, R.A.; DA FONSECA OLIVEIRA, A.A.; DA SILVA, A.M.; JUNIOR, J.W.; DA SILVA, L.B., DE FARIAS BRITO, M.; RABELO, S.S. Glanders in donkeys (*Equus asinus*) in the state of Pernambuco, Brazil: A case report. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, n 1, p.146-149, 2010.
- MOTA, R.A.; BRITO, M.F.; CASTRO, F.J.C; MASSA, M. Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.20, n.4, p.155-159, 2000.
- NAUREEN, A.; SAQIB, M.; MUHAMMAD, G.; HUSSAIN, M.H.; ASI, M.N. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. **Journal of veterinary diagnostic investigation**, v.19, p.362-367, 2007.
- ODONTSETSEG, N.; MWEENE, A.S.; KIDA, H. Viral and bacterial diseases in livestock in Mongolia. **The Japanese journal of veterinary research**, v.52, p.151-162, 2005.
- OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2017. 2017a
- OIE-Terrestrial Animal Health Code, Disponível em: http://www.oie.int/file-admin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/chapitre_glanders.pdf, 2015.
- OIE-World Animal Health Information Database, http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines. 2017b.
- PIMENTEL, W. História e organização do serviço veterinário do exército. **Revista Militar de Medicina Veterinária**, v.1, n.4, p.283-322, 1938.
- ROGUL, M.; BRENDLE, J.J.; HAAPALA, D.K.; ALEXANDER, A.D. Nucleic acid similarities among *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas multivorans*, and *Actinobacillus mallei*. **Journal of bacteriology**, v.101, n.3, p.827-835, 1970.
- SAID, N.C.; DE NARDI JUNIOR, G.; DOMINGUES, P.F. Mormo em equinos e a biossegurança no agronegócio. **Tekhne e Logos**, v.7, n.2, p.29-42, 2016.

- 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 reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based polymerase chain reaction assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.54, p.241-247, 2006.
- SILVA, C.M.S.L. **Avaliação da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e ELISA indireto para o Diagnóstico do Mormo**. 2014. Mestrado em Ciência Animal Tropical. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE. Orientador: Manoel Adrião Gomes Filho. Coorientador: Vania Lucia de Assis Santana, 2014.
- SMITH, P.B.; CHERY, W.B. Identification of Malleomyces by specific bacteriophages. **Journal of bacteriology**, v.74, n.5, p.668, 1957.
- TIZARD, I.; YAWEI, N.I. Use of serologic testing to assess immune status of companion animals. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 213, n. 1, p. 54-60, 1998.
- WAHID-World Animal Health Information Database Interface. 2010.
- WERNERY, U.; WERNERY, R.; JOSEPH, M.; AL-SALLOOM, F.; JOHNSON, B.; KINNE, J.; JOSE, S.; TAPPENDORF, B.; HORNSTRA, H.; SCHOLZ, H.C. Natural *Burkholderia mallei* infection in Dromedary, Bahrain. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, p.1277-1279, 2011.
- WETMORE, P.W.; GOCHENOUR, W.S. Comparative studies on the genus Malleomyces and selected Pseudomonas species. **Journal of bacteriology**, v.72, p.79-89, 1956.
- WITTIG, M.B.; WOHLSEIN, P.; HAGEN, R.M.; AL DAHOUK, S.; TOMASO, H.; SCHOLZ, H.C.; NIKOLAOU, K.; WERNERY, R.; WERNERY, U.; KINNE, J.; ELSCHNER, M.; NEUBAUER, H. Glanders—a comprehensive review. **DTW. Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v.113, p.323-330, 2006.
- YABUUCHI, E.; KOSAKO, Y.; OYAIZU, H.; YANO, I.; HOTTA, H.; HASHIMOTO, Y.; ARAKAWA, M. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the

genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiology and immunology**, v.36, n.12, p.1251-1275, 1992.

4 – EXPERIMENTO

**Desempenho da fixação do complemento para diagnóstico do mormo
utilizando antígeno de cepas brasileiras de *Burkholderia mallei***

Desempenho da fixação do complemento para diagnóstico do mormo utilizando antígeno de cepas brasileiras de *Burkholderia mallei*

*Complement Fixation Performance for the diagnostic of glanders using antigen from Brazilian strains of *Burkholderia mallei**

Paulo Castelo Branco de **Gouveia Filho** & Roberto Soares **Castro**

Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-PE, Brasil.

Resumo

O mormo é uma zoonose frequentemente fatal que afeta equinos, asininos e muare, causada pela *Burkholderia mallei*. A Fixação do Complemento (FC) é o teste prescrito pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) para seu diagnóstico. Este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o desempenho da FC empregando antígeno (Biovotech, Recife Brasil), produzido com cepas brasileiras de *B. mallei* para diagnóstico do mormo comparativamente ao antígeno c.c.pro (GmbH, Oberdorla, Alemanha), que emprega cepas da Iugoslávia, Índia e Indonésia. Os testes foram realizados em paralelo utilizando o protocolo de incubação a frio (4°C, 12 horas) da mistura soro, complemento e antígeno. Dos 259 soros avaliados, 102 e 133 apresentaram resultado positivo e negativo, respectivamente, em ambos os testes. Vinte e quatro soros negativos no teste com antígeno c.c.pro apresentaram resultado positivo no teste com antígeno Biovotech. O índice de concordância ajustada kappa calculado foi 0,81, considerado quase perfeito.

Palavras chave: *Burkholderia mallei*, equino, diagnóstico

Abstract

Glanders is an often fatal zoonosis that affects horses, donkeys and mules, caused by *Burkholderia mallei*. Complement Fixation (CF) is the test prescribed by the World Organization for Animal Health (OIE) for its diagnosis. This work was conducted with the objective of evaluating the performance of CF using antigen produced with Brazilian strains of *B. mallei* (Biovotech, Recife Brazil) for the diagnosis of glanders compared to the antigen c.c.pro (GmbH, Oberdorla, Germany), which employs strains from Yugoslavia, India and Indonesia. The tests were performed in parallel using the protocol of cold incubation (4 ° C, 12 hours) of the serum, complement and antigen mixture. Of the 259 sera evaluated, 102 and 133 presented positive and negative results,

respectively, in both tests. Twenty-four negative sera in the c.c.pro antigen test showed a positive result in the Biovetech antigen test. The calculated concordance index kappa was 0.81, considered almost perfect.

Keywords: *Burkholderia mallei*, horse, diagnostic

INTRODUÇÃO

O mormo é uma zoonose frequentemente fatal que afeta equinos, asininos e muares, causada pela *Burkholderia mallei*, bactéria gram-negativa, imóvel, parasita intracelular (Khan et al., 2013). Os animais acometidos apresentam febre alta, sinais respiratórios e lesões cutâneas. A doença geralmente é de evolução aguda em asininos e muares, porém crônica em equinos, com evolução em dias a anos (KHAN et al., 2013).

O mormo é uma doença de notificação obrigatória, segundo a Organização Mundial de Saúde Animal – OIE (OIE, 2017a). Apesar de ter a prevalência global consideravelmente reduzida, com erradicação na Europa, América do Norte e Austrália, o mormo é endêmico na África, Ásia, Oriente Médio e América do Sul, inclusive no Brasil, e vem reemergindo com relatos de focos em número crescente de países (OIE, 2017b), inclusive na Alemanha, após 60 anos de erradicação (ELSCHNER et al., 2016).

No Brasil o foi registrado pela primeira vez em 1811, introduzido por animais infectados importados da Europa (PIMENTEL, 1938), e foi considerado erradicado em 1968, com o último foco diagnosticado no estado do Rio de Janeiro (LANGENEGGER et al., 1960). Desde 1999, após os relatos nos estados de Pernambuco e Alagoas (MOTA et al., 2000), a doença foi notificada de forma progressiva em 25 das 27 unidades federativas brasileiras (OIE, 2017b).

A prevenção e o controle do mormo dependem de programas sanitários específicos, com detecção precoce dos animais infectados, eliminação dos positivos, rigoroso controle de movimentação e de aglomerações de animais susceptíveis, interdição e higienização das instalações e utensílios, bem como monitoramento sorológico dos animais após saneamento dos focos (ELSCHNER et al., 2017). No Brasil as ações de vigilância e defesa sanitária dos equídeos são coordenadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA, por meio do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos – PNSE (MAPA, 2008), cujas principais medidas sanitárias são o controle de trânsito e de eventos de aglomeração de equídeos, bem como o saneamento dos focos detectados (MAPA, 2004).

Os métodos de diagnóstico bacteriológicos clássicos, bem como as modernas técnicas moleculares, têm se mostrado insuficientes para detecção do organismo durante a infecção assintomática. Portanto, a identificação desses animais portadores é o maior desafio para o controle do mormo (MALIK, 2016; ELSCHNER et al., 2017). A Fixação do Complemento (FC) é o teste prescrito pela OIE para o diagnóstico do mormo visando a certificação para trânsito internacional (OIE, 2015). No Brasil, a FC é o teste de triagem realizado em laboratório oficial ou na rede de laboratórios privados credenciados pelo MAPA. Apesar do amplo emprego da FC para diagnóstico do mormo, são poucos os estudos sobre sua avaliação. Os resultados dos trabalhos demonstram que há variação do desempenho do teste dependendo do antígeno utilizado (KHAN e al., 2011; LAROUCAU et al., 2016) e da situação epidemiológica da população alvo (endêmica ou livre) (KHAN et al., 2012).

Considerando que, no Brasil, o teste de FC tem sido realizado com antígenos importados (c.c.pro - Alemanha e USDA - USA) e que recentemente foi desenvolvido um antígeno produzido com cepas brasileiras de *B. mallei* (Biovotech, Recife) este trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar seu desempenho para diagnóstico do mormo.

MATERIAL E MÉTODOS

Local dos testes

Os testes foram realizados no Laboratório da Sociedade Nordestina dos Criadores (LSNC), credenciado pelo MAPA para diagnóstico do Mormo e da Anemia Infecciosa Equina, sob a portaria nº 87 DE 27/06/2014.

Fixação do complemento

Antígenos

1) c. c. pro (GmbH, Oberdorla, Alemanha).

Extrato de *B. mallei* (cepas Zargreb, Iugoslávia; Mukteshwar, Índia; e Bogor, Indonésia) em PBS com 0,5% de fenol.

2) Biovotech (Recife, Brasil)

Extrato semi-purificado de *B. mallei* (cepas brasileiras) em PBS com 0,5% de fenol.

Teste

Os testes de fixação do complemento foram realizados em paralelo empregando antígenos c.c.pro e Biovotech, sob as mesmas condições. O protocolo utilizado foi de incubação a frio (4°C, 12 horas) da mistura soro, complemento e antígeno, realizado

conforme a instrução normativa nº 12 de 29 de Janeiro de 2004 (MAPA, 2004).

Desenho e análise estatística

O experimento foi delineado para verificar a similaridade do teste FC realizado com dois antígenos, empregando os mesmos constituintes do teste (diluente, complemento, hemácias e hemolisina). Como não existe um padrão para ser usado como referência, a comparação foi feita pelo nível de concordância entre os testes, empregando o teste Kappa, que mede o nível de concordância além da concordância que pode ser obtida por acaso (McGINN et al., 2004).

O número mínimo de amostras para a comparação dos resultados da FC com dois antígenos foi determinado conforme a fórmula $n \geq z^2 \cdot p \cdot (1-p) / e^2$ (TDR Diagnostics Evaluation Expert Panel, 2010). Onde: $z = 1,96$ para 95% de intervalo de confiança; $p = 0,99$ (para 99% de sensibilidade - Se) ou $0,88$ (para 88% de especificidade - Sp); $e = 0,05$ (5% de erro) / $e = 0,05$ (5% de erro) respectivamente. A sensibilidade e a especificidade esperadas foram estimadas com base nas médias das publicações disponíveis (KHAN et al., 2011/2012). Assim, o número mínimo calculado de amostras positivas foi 15 e o número mínimo de amostras negativas, 138.

Para análise foram consideradas apenas as amostras que apresentaram resultado conclusivo (positivo ou negativo) nos testes. A concordância entre os resultados obtidos com os dois antígenos foi estimada com base no índice de concordância ajustada – kappa, calculado e interpretado conforme McGINN et al. (2004).

Tabela 1 - Classificação qualitativa dos valores kappa como grau de concordância além da chance

Valor de Kappa	Grau de concordância além da chance
0	Nenhum
0–0,2	Fraco
0,2–0,4	Razoável
0,4–0,6	Moderado
0,6–0,8	Substancial
0,8–1,0	Quase perfeito

Fonte: McGINN et al. (2004).

Amostras

Para comparação dos testes foram utilizadas 259 amostras de soro equino, distribuídos em cinco grupos (Tabela 1).

Tabela 2 - Distribuição das 259 amostras séricas de equinos utilizadas para comparação do teste de fixação do complemento para diagnóstico do mormo empregando antígenos c.c.pro e Biovetech.

Grupo	n	Origem	Histórico
G I	31	PE	Animais de um rebanho endêmico positivos no WB e sacrificados pelo Serviço Veterinário Oficial
G II	66	PE	Animais originários de um rebanho endêmico monitorado com ELISA para o mormo durante um ano
G III	34	Diversas	Amostras submetidas a teste de rotina no LSCN
G IV	79	Diversas	Amostras submetidas a teste de rotina para mormo
G V	51	Diversas	Painel de amostras Lanagro PE

c.c.pro (GmbH, Oberdorla, Alemanha), Biovetech (Recife, Brasil).

RESULTADOS

Os resultados dos testes das 259 amostras estão apresentados na tabela 2, onde observa-se 102 (39,4%) resultados positivos e 157 (60,6%) negativos no teste de FC empregando o antígeno c.c.pro; o teste realizado com o antígeno Biovetech mostrou 126 (48,6%) amostras positivas e 133 (51,4%) negativas.

Dos 259 soros avaliados, 102 e 133 apresentaram resultado positivo e negativo, respectivamente, em ambos os testes. Vinte e quatro soros negativos no teste com antígeno c.c.pro apresentaram resultado positivo no teste com antígeno Biovetech. O índice de concordância ajustada kappa calculado foi 0,81 (Tabela 3), considerado quase perfeito (McGinn et al., 2004). Os 24 soros com resultados divergentes, negativos no teste com antígeno c.c.pro e positivos no Biovetech, estão distribuídos entre os grupos da seguinte forma: G I, 2/31 (6,46%) soros; G II, 3/64 (4,69%); G III, 1/34 (2,94%); G IV, 17 (21,52%); e G 5, 1/51 (1,96%). Informações de testes anteriores foram rastreadas de cinco desses 24

animais. Dois animais divergentes do G I foram sacrificados por serem positivos no WB, realizado conforme Elschner et al. (2011); dos 3 divergentes do G II, 2 apresentavam resultado positivo no ELISA e 1 negativo.

Tabela 3 - Distribuição dos resultados de soros equinos testados pela fixação do complemento com antígenos c.c.pro e Biovetech para diagnóstico do mormo.

Grupo	n	c.c.pro		Biovetch	
		Positivo (%)	Negativo (%)	Positivo (%)	Negativo (%)
I	31	23 (74,2)	8 (25,8)	25 (80,6)	6 (19,4)
II	64	2(3,1)	62 (96,9)	5 (7,8)	59 (92,2)
III	34	1(2,9)	33 (97,1)	2 (5,9)	32 (94,1)
IV	79	28 (35,4)	51 (64,6)	45 (57,0)	34 (43,0)
V	51	48 (94,1)	3 (5,9)	49 (96,1)	2 (3,9)
Total	259	102 (39,4)	157 (60,6)	126 (48,6)	133 (51,4)

Tabela 4 - Análise da concordância ajustada (Kappa) dos resultados de soros equinos testados pela fixação do complemento com antígenos c.c.pro e Biovetech para diagnóstico do mormo.

Antígeno		c.c. pro		
		Positivo	Negativo	Total
Biovetch	Positivo	102	24	126
	Negativo	0	133	133
Total		102	157	259

Kappa = 0,81 (concordância quase perfeita; McGINN et al., 2004).

DISCUSSÃO

Desde 2000 o mormo tem sido progressivamente relatado em diversos estados brasileiros, onde as medidas sanitárias envolvem, basicamente, o controle de trânsito e o saneamento dos focos. Essas medidas são apoiadas em testes sorológicos, sendo a FC o teste

de triagem, conforme preconizado pela OIE (2015). Os testes têm sido realizados com antígenos importados – USDA, o mais empregado, e c.c. pro.

Até o momento não havia descrição de um teste de FC com cepas de *B. mallei* de origem brasileira para diagnóstico do mormo. A OIE considera crucial o controle de qualidade na formulação dos antígenos, uma vez que a sensibilidade e a especificidade da FC são criticamente dependentes do antígeno utilizado (OIE, 2015).

Na ausência de material de referência, foi escolhido o antígeno c.c.pro para efeito comparativo, pois o mesmo tem mostrado sensibilidade superior ao antígeno USDA (KHAN et al., 2011; LAROUCAU et al., 2016). O protocolo de incubação adotado foi a frio, pois resulta em incremento na sensibilidade da FC comparativamente à incubação a quente (37°C, 1 hora) (KHAN et al., 2014).

Globalmente os antígenos c.c.pro e Biovetech tiveram desempenho equivalente, com grau de concordância além do acaso, Kappa, quase perfeito. Deve-se notar que o valor Kappa não dá nenhuma indicação qual dos testes é melhor. Um bom acordo pode indicar que ambos os testes são igualmente bons ou igualmente ruins (VIERA and GARRET, 2005).

Para avançar na avaliação dos testes, as amostras divergentes foram analisadas com base no histórico dos animais, quando disponível. Quatro dos cinco animais rastreados apresentavam resultado positivo ou no ELISA ou no WB. Esses resultados indicam que o teste com o antígeno Biovetech é mais sensível.

A diferença na sensibilidade entre os antígenos pode estar relacionada à variabilidade genotípica e fenotípica das cepas empregadas na elaboração dos antígenos. Ao evoluir a partir de *B. pseudomallei*, um organismo de solo metabolicamente versátil, para um patógeno de mamífero obrigatório altamente especializado, *B. mallei* desenvolveu importante capacidade adaptativa do seu genoma que permitiu infectar múltiplos hospedeiros com extraordinária capacidade para evadir das respostas imunes adaptativas (NIERMAN et al., 2004; GALYOV et al., 2010). Diferenças fenotípicas entre cepas de *B. mallei* que possam interferir no diagnóstico sorológico do mormo não são estudadas extensamente. Foi demonstrado que uma simples inserção no genoma de duas cepas de *B. mallei* interrompeu a expressão da porção O-PS do lipopolissacarídeo (LPS) de *B. mallei*, importante constituinte antigênico. Essas variantes antigênicas não reagiram com soro policlonal anti-LPS de *B. mallei* (BURTNICK et al., 2002). Tem sido relatado maior sensibilidade da FC realizada com antígenos elaborados com mistura de cepas (Zargreb, Mukteshwar e Bogor), como o c.c.pro, do que com uma única cepa, como é o caso do antígeno USDA (KHAN et al., 2011; LAROUCAU et al., 2016). A maior sensibilidade da FC empregando o antígeno Biovetech, elaborado com cepas

brasileiras, pode ser, em parte, explicada devido à sua maior possibilidade de similaridade antigênica com as cepas circulantes na população testada.

Adicionalmente deve-se considerar variações na composição dos antígenos. A estrutura antigênica de *B. mallei* é formada por uma fração proteica, de composição muito variada, e outra de LPS (BURTNICK et al., 2002). Ambos antígenos utilizados são descritos genericamente como extratos de culturas de *B. mallei*, sem detalhamento da composição ou do processo de obtenção, que é determinante para a composição final do antígeno, sua imunoreatividade e, conseqüentemente, o desempenho do teste. É necessário, ainda, considerar a concentração dos antígenos c.c.pro e Biovetech. O ensaio de limite de detecção dos soros controles revelou que o antígeno c.c.pro reagiu com ambos os soros até a diluição de 1:640, enquanto que o antígeno Biovetech reagiu até a diluição de 1:1.280 (dados não apresentados). Ambos antígenos foram titulados frente a soros produzidos in-house, sem a prévia calibração com um soro de referência, o que pode afetar a sensibilidade analítica do teste. Diferentes limites de detecção foram observados em teste de proficiência realizado entre 24 laboratórios europeus de diagnóstico do mormo (LAROUCAU et al., 2016).

O diagnóstico laboratorial preciso é um ponto crucial para o sucesso de programas sanitários para prevenção e controle do mormo, inclusive para realizar inquéritos sorológicos com a finalidade de conhecer sua prevalência. Passo fundamental é a detecção e eliminação de animais infectados, o que se consegue com testes de diagnóstico com sensibilidade elevada. Além disso, é importante que os testes de diagnóstico também tenham elevada especificidade, para evitar diagnósticos falso-positivos, que podem levar à indesejável eliminação de animais saudáveis.

O Brasil possui o terceiro maior rebanho equino do mundo e o maior da América Latina, exporta tanto animais vivos quanto carne. Além do trabalho diário nas atividades agropecuárias, os equinos progressivamente vêm sendo utilizados para o lazer, esporte e terapia. A renda anual gerada pelo Complexo do Agronegócio do Cavalo no Brasil totalizou, em 2015, R\$ 16,15 bilhões, responsável, direta e indiretamente, por 3 milhões de pessoas ocupadas (LIMA e CINTRA, 2016). Os diversos focos do mormo distribuídos em quase todas unidades federativas brasileiras (OIE, 2017b) vêm impactando as atividades equestres devido às restrições à movimentação e à aglomeração de equídeos.

Conclusão

Com a disponibilização de um antígeno brasileiro, com maior sensibilidade da FC, espera-se contribuir para o controle do mormo e para evitar sua propagação no território

nacional, com potencial redução das perdas econômicas diretas e indiretas à equideocultura, associadas à ocorrência da doença.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsas e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em particular À Coordenação Geral de Apoio Laboratorial – CGAL e ao LANAGRO-PE, pelo fornecimento de amostras.

REFERÊNCIAS

- BURTNICK, M. N.; BRETT, P. J.; AND WOODS, D. E.; Molecular and Physical Characterization of *Burkholderia mallei* O Antigens. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 3, p. 849–852, 2002.
- EDOUARD E. GALYOV, PAUL J. BRETT, DAVID DeSHAZER. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* V.64, p.495–517. 2010.
- ELSCHNER, M.C.; NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L.D. The Resurrection of Glanders in a new Epidemiological Scenario: A Beneficiary of “Global Change”. **Current Clinical Microbiology Reports**, v.4, n.1, p.54-60, 2017.
- ELSCHNER M., LIEBLER-TENORIO E., BRÜGMANN M. Re-appearance of glanders into Western Europe: clinical, laboratory and pathological findings in a German horse. **OIE Bulletin**, n.1/2016:76-9. 2016.
- ELSCHNER MC, SCHOLZ HC, MELZER F, SAQIB M, MARTEN P, RASSBACH A, DIETZSCH M, SCHMOOCK G, DE ASSIS SANTANA VL, DE SOUZA MM et al: Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Vet Res*, 7:4, 2011.
- GALYOV, E.E.; BRETT, P.J.; DESHAZER, D. Molecular insights into *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* pathogenesis. **Annual review of microbiology**, v. 64, p. 495-517, 2010.

- KHAN, I., WIELER, L. H., SAQIB, M., MELZER, F., SANTANA, V. L., NEUBAUER, H. & ELSCHNER, M. C. Effect of incubation temperature on the diagnostic sensitivity of the glanders complement fixation test. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 33, n. 3, 2014.
- KHAN, I.; WIELER, L.H.; MELZER, F.; ELSCHNER, M.C.; MUHAMMAD, G.; ALI, S.; SAQIB, M. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. **Transboundary and emerging diseases**, v.60, n.3, p.204-221, 2013.
- KHAN, I.; MANDY C.E.; FALK, M.; MAYADA, G.; LOTHAR, H.W.; 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. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.125, n.3-4, p.117-121, 2012.
- KHAN, I.; WIELER, L.H.; MELZER, F.; GWIDA, M.; SANTANA, V.D.A.; DE SOUZA, M. M.A.; SAQIB, M.; ELSCHNER, M.C.; NEUBAUER, H. Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. **Veterinary Record-English Edition**, v.169, n.19, p.495-499, 2011.
- LANGENEGGER, J.; DOBEREINER, J.; LIMA, A.C. Foco de mormo (*Malleus*) na região de Campos, Estado do Rio de Janeiro 1960. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.3, p.91-108, 1960.
- LAROUCAU, K., COLANERI, C., JAŤ, M., CORDE, Y., DRAPEAU, A., DURAND, B., BECK, C. Interlaboratory ring trial to evaluate CFT proficiency of European laboratories for diagnosis of glanders in equids. **The Veterinary Record**, v. 178, n. 25, p. 632-632, 2016.
- LIMA, R.A.S.; CINTRA, A.G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2016, 56 p.
- MALIK, P. Harmonising diagnostic testing for glanders in equids. **Veterinary Record**, v.178, n.25, p.630-631, 2016.

MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 17, de 8 mai. 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, 09 mai. 2008. Seção 1, p.27.

MAPA-MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa Nº 24, de 5 abr. 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 abr. 2004. Seção 1, p.27.

MCGINN, T.; WYER, P. C.; NEWMAN, T. B. Tips for learners of evidence-based medicine: 3. Measures of observer variability (kappa statistic). **Canadian Medical Association Journal**, v. 171, n. 11, p. 1369-1373, 2004.

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

NIERMAN, W.C.; DESHAZER, D.; KIM, H.S.; TETTELIN, H.; NELSON, K.E.; FELDBLYUM, T.; ULRICH, R.L.; RONNING, C.M.; BRINKAC, L.M.; DAUGHERTY, S.C.; DAVIDSEN, T.D.; DEBOY, R.T.; DIMITROV, G.; DODSON, R.J.; DURKIN, A.S.; GWINN, M.L.; HAFT, D.H.; KHOURI, H.; KOLONAY, J.F.; MADUPU, R.; MOHAMMOUD, Y.; NELSON, W.C.; RADUNE, D.; ROMERO, C.M.; SARRIA, S.; SELENGUT, J.; SHAMBLIN, C.; SULLIVAN, S.A.; WHITE, O.; YU, Y.; ZAFAR, N.; ZHOU, L. FRASER, C.M. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 39, p. 14246-14251, 2004.

OIE-Listed diseases, infections and infestations in force in 2017. <http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2017.2017a>.

OIE-World Animal Health Information Database, http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasetimelines. 2017b.

OIE-Terrestrial Animal Health Code, 2015. Disponível em: http://www.oie.int/file-admin/Home/eng/Health_standards/tahc/2010/chapitre_glanders.pdf. 2015.

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

VIERA, A.; Garrett, J. M. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. **Fam Med**, v. 37, n. 5, p. 360-363, 2005.