



CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – UniCEUB
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CAROLINA FERREIRA RIBEIRO DE CASTRO

AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DOS TESTES EMPREGADOS NO
DIAGNÓSTICO DE MORMO EM EQUÍDEOS

Brasília

2022

CAROLINA FERREIRA RIBEIRO DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DOS TESTES EMPREGADOS NO
DIAGNÓSTICO DE MORMO EM EQUÍDEOS**

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências da Educação e Saúde para obtenção de grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Edel Donato.

Brasília

2022

CAROLINA FERREIRA RIBEIRO DE CASTRO

**AVALIAÇÃO DA ACURÁCIA DOS TESTES EMPREGADOS NO
DIAGNÓSTICO DE MORMO EM EQUÍDEOS**

Monografia apresentada à Faculdade de Ciências da Educação e Saúde para obtenção de grau de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Edel Donato.

Brasília, 8 de Dezembro de 2022.

Banca Examinadora

Prof. Dr. Lucas Edel Donato

Orientador

Prof. Dr. Marcel Batista dos Passos

Dra. Nathália Rodrigues Pereira

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado forças e todos os meios necessários para que eu realizasse esse sonho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Lucas Edel Donato por ter sido extremamente solícito e compreensível em toda elaboração desta monografia, meu muito obrigada.

A Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa que foi minha casa por três anos e a todos amigos que lá deixei, já dizia a canção: qual é o melhor curso da Universidade Extraordinária, sempre há de ser a Medicina Veterinária.

Aos meus mentores, que hoje chamo de família, Dr. Carlos Saquetti, Dra. Nathália Rodrigues e Dra. Joanna Vasconcellos. Vocês foram muito além de professores. Por todo apoio, aprendizado e força que me deram, eu serei sempre grata. Contem comigo sempre.

Aos meus colegas de estágio, em especial Alyssa e Brenda, por compartilharem todos os momentos de felicidade e desespero que não foram poucos. Vocês foram essenciais.

As minhas irmãs de coração, Isabela e Ingrid, essa vitória com certeza é de vocês também. Obrigada por estarem comigo nesses 15 anos, e que venham muitos mais pela frente. Eu amo vocês.

A minha família, em especial meus pais, que nunca mediram esforços para me dar todo o apoio, estrutura e incentivo para não desistir do meu sonho. Sou quem sou pelo amor de vocês.

Por fim e, de fato, mais importante a você, meu filho. André, tu me salvou de várias formas e, mesmo ainda em meu ventre, me direcionou à profissão que hoje tenho orgulho em ter escolhido. Seja em Brasília, Salvador, Lisboa ou até Uruguaiana, meu coração sempre estará onde tu estiver. A ti, toda minha gratidão, amor e devoção. Sempre contigo e por ti.

ALEA JACTA EST.

RESUMO

O mormo é uma zoonose antiga, de caráter agudo ou crônico, que acomete majoritariamente os equídeos, tendo o humano como hospedeiro acidental. Ela é causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, um agente etiológico gram-negativo, aeróbio e intracelular facultativo e que pode se tornar anaeróbio facultativo na presença de nitrato. A doença havia sido erradicada no Brasil no ano de 1968, entretanto, em 1999, o mormo reemergiu no território nacional, se mantendo presente até os dias atuais. A enfermidade se apresenta clinicamente nas formas nasal, cutânea, pulmonar ou até de forma assintomática, tornando seu diagnóstico desafiador. Sua transmissibilidade é alta devido à elevada concentração bacteriana em descargas nasais e oculares de animais infectados, facilitando sua transmissão por meio de fômites. A fim de diagnosticar precocemente a doença, a Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estabelecem e padronizam técnicas disponíveis para serem empregadas no diagnóstico do mormo. Entretanto, esses testes ainda não apresentam a acurácia necessária para o diagnóstico preciso e irrefutável da doença. A fim de atender essa demanda, o presente trabalho se fundamenta em uma revisão de literatura do tipo narrativa, que busca expor a performance dos testes empregados no diagnóstico de Mormo em equídeos e também propor soluções para a realização de um diagnóstico mais preciso.

Palavras-chave: mormo; burkholderia mallei; zoonose; diagnóstico; acurácia; glanders.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
2 METODOLOGIA	8
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO	8
3.1 Etiologia	8
3.2 Epidemiologia	8
3.3 Transmissão	10
3.4 Sinais Clínicos	11
3.5 Patogenia	12
3.6 Diagnóstico	14
3.6.1 Testes com a identificação do agente	14
3.6.1.1 <i>Reação em cadeia da polimerase (PCR) e real-time PCR</i>	15
3.6.1.2 <i>Cultura bacteriana</i>	15
3.6.2 Testes sorológicos	16
3.6.2.1 <i>Fixação de complemento (FC)</i>	16
3.6.2.2 <i>Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)</i>	16
3.6.2.3 <i>Western blot (WB)</i>	17
3.6.2.4 <i>Teste de aglutinação corado por rosa bengala (RBT)</i>	18
3.6.3 Testes para imunidade celular	19
3.6.3.1 <i>Teste de maleinização</i>	19
3.7 Recomendações da WOA e do MAPA para o diagnóstico de mormo	19
4 CONCLUSÃO	20
5 REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

O mormo é uma zoonose antiga, de caráter agudo ou crônico, que acomete majoritariamente os equídeos. Enquanto os equinos são mais suscetíveis à infecção em sua forma crônica, a forma aguda costuma afetar os asininos e muares. Já em humanos, a doença é comprovada apesar de ser considerada rara (MOTA e JUNIOR, 2022).

O mormo é uma doença causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, um agente etiológico gram-negativo, aeróbio e intracelular facultativo, podendo se tornar anaeróbio facultativo na presença de nitrato. Esse agente já foi classificado como *Pseudomonas*, *Pfeifferella*, *Loefflerella*, *Malleomyces* or *Actinobacillus* durante os anos (MOTA e JUNIOR, 2022; WOA, 2022).

A doença pode se apresentar clinicamente nas formas nasal, cutânea, pulmonar ou de forma assintomática. Lesões cutâneas como a presença de nodulações e abscessos nodulares podem ser encontradas em sua forma cutânea. Já sua forma nasal é caracterizada por lesões primárias no trato respiratório superior (WOA, 2022), enquanto que, em sua forma pulmonar, as lesões se manifestam de forma mais concentradas no trato respiratório inferior e nas cadeias linfáticas adjacentes, desenvolvendo, assim, granulomas que propiciam o aparecimento de úlceras (SPRAGUE et al, 2009).

Por se tratar de uma doença que apresenta cronicidade, é possível que o mormo se desenvolva de forma subclínica ou assintomática. Esse tipo de manifestação da doença torna seu diagnóstico e tratamento complexo visto que, a detecção precoce do mormo tende a ser decisiva para o prognóstico do animal (TAPIA, 2019).

Em 1811, o mormo foi trazido para o Brasil por cavalos infectados vindos da Europa e erradicado no território em 1968. Apesar de ser considerada erradicada no ocidente, essa doença ainda é endêmica em alguns países da Ásia, África, Oriente Médio e América do Sul (SPRAGUE et al, 2009).

Em 1999, novos casos foram confirmados em equídeos na região nordeste do Brasil, mais precisamente nos estados de Pernambuco e Alagoas e, entre os anos de 2020 e 2022, a doença reemergiu na China, Irã, Nepal e Turquia (MOTA e JUNIOR, 2022).

A hipótese da reemergência do mormo no Brasil foi levantada e confirmada por meio de informações clínicas, epidemiológicas, sorológicas e microbiológicas

que atestam, de fato, a circulação da bactéria em usinas de cana de açúcar nos estados supracitados (MOTA e JUNIOR, 2022).

A transmissão do mormo ocorre, na maioria das vezes, em sua forma subclínica ou latente por meio de alimentos, água e até arreios compartilhados entre animais sadios e infectados. Sendo assim, sua propagação pode se tornar rápida dentro de hípicas e fazendas, resultando em uma ameaça para a saúde pública e tornando, cada vez mais, desafiador o controle da doença (SPRAGUE et al, 2009; SINGHA et al. 2020b).

Existem algumas metodologias para a realização do diagnóstico de mormo como, por exemplo, os testes de reação em cadeia da polimerase (PCR), fixação do complemento (FC), *western blot* (WB), imunoadsorção ligada à enzima (ELISA) e teste de aglutinação corado por rosa bengala (RBT), teste de maleinização, entre outros métodos menos convencionais (NAUREEN et al., 2007; SPRAGUE et al., 2009; ELSCHNER et al., 2011; WOAHA, 2022).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é responsável pela elaboração das diretrizes e normativas que envolvem a doença. Em 16 de Janeiro de 2018, foi publicada pelo MAPA, a Instrução Normativa nº 6 estabelecendo as diretrizes gerais para prevenção, controle e erradicação do mormo no território nacional, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), que o diagnóstico da doença deve ser feito por meio da prova de fixação do complemento (FC) ou por imunoadsorção enzimática (ELISA) como testes de triagem e confirmados pelo *western blot* (WB). Contudo, outros testes também são reconhecidos se os mesmos obtiverem aprovação prévia por parte do Departamento de Defesa Animal (DDA) (BRASIL, 2018).

Em função de tal reemergência, a doença voltou a ter alta relevância no âmbito nacional e internacional se fazendo necessário uma análise mais ampla das possíveis técnicas de diagnóstico do mormo, a fim de obter-se um quadro mais legítimo da propagação do mormo (MEURER, 2021).

A fim de atender essa demanda, o presente trabalho tem o objetivo de realizar uma revisão de literatura acerca da performance dos testes empregados no diagnóstico de Mormo em equídeos e também buscar soluções para a realização de um diagnóstico mais preciso.

2 METODOLOGIA

O presente trabalho irá se fundamentar em uma revisão de literatura do tipo narrativa que busca expor a performance dos testes empregados no diagnóstico de Mormo em equídeos e também propor soluções para a realização de um diagnóstico mais preciso.

As plataformas de buscas empregadas foram o Pubmed, Scielo e Google Acadêmico, considerando estudos publicados nos idiomas português, inglês e alemão no período de 1960 a 2022.

A busca foi realizada a partir de descritivos que possibilitassem uma busca mais acurada e ampla acerca da atual performance dos testes supracitados para o diagnóstico da zoonose. Para tanto, utilizou-se de termos de pesquisa como *glanders*, *glanders diagnosis*, *glanders in Brazil*, consultados e de acordo com o padrão do *The Medical Subject Headings* (MeSH).

Foram encontrados cerca de 35 artigos dos quais muitos foram descartados por obterem elementos discrepantes ou por não contribuírem ao foco do presente estudo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E DISCUSSÃO

O mormo é uma doença infectocontagiosa capaz de circular entre humanos e animais, ou seja, uma zoonose. Ainda assim, os equídeos são, a princípio, o reservatório natural da doença, enquanto os humanos são conhecidos por serem o hospedeiros acidentais (KETTLE e WERNERY, 2016).

3.1 Etiologia

O agente causador da doença, *Burkholderia mallei*, é um bacilo gram-negativo, aeróbio, não esporulado, imóvel e intracelular facultativo, mas que, na presença de nitrato, se torna anaeróbio facultativo (WHOA, 2022). O intervalo de incubação da bactéria enquanto infecção aguda é de 1 a 14 dias, já em situações crônicas, esse período pode ser superior a doze semanas (VAN ZANDT et al, 2013).

3.2 Epidemiologia

Descrito inicialmente em 400 a.C por Hipócrates e em 330 a.C por Aristóteles, o mormo é considerado uma doença milenar e de importância mundial no que concerne à saúde dos equídeos. Com o passar dos anos e o uso desses animais

para transporte, a zoonose se disseminou, causando diversas epidemias (DVORAK e SPICKLER, 2008; LANGENEGGER, 1960).

No Brasil, a zoonose foi introduzida no ano de 1811 com a importação de equinos da Europa (LANGENEGGER, 1960). Com o passar dos anos, casos de mormo foram relatados em vários estados do país, acarretando em perdas econômicas e, cada vez mais, em limitações e burocracias para o transporte de equídeos (FONSECA-RODRÍGUEZ et al., 2019).

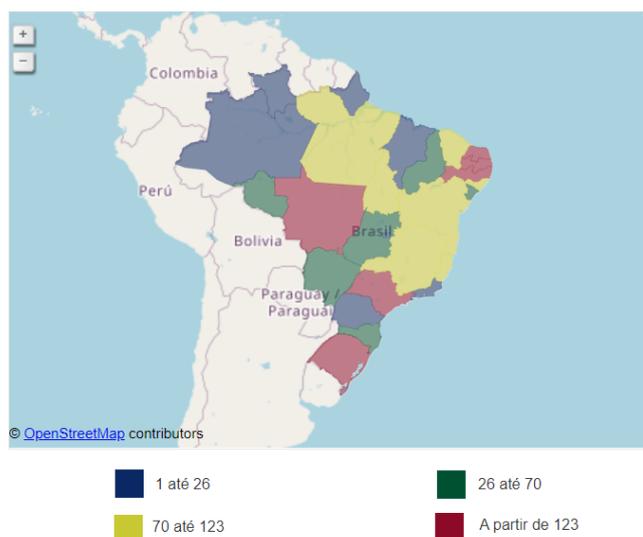
Devido à criação de programas de controle e a popularização de outros meios de transporte, o mormo foi erradicado em 1965 em vários países como Austrália, Canadá, Estados Unidos e a maioria da Europa (DVORAK e SPICKLER, 2008). Já no Brasil, a doença foi erradicada apenas no ano de 1968 (FONSECA-RODRÍGUEZ et al., 2019).

Durante os anos de 1998 e 2007, a doença voltou a ser evidenciada em alguns locais do Brasil, Turquia, Eritreia, Etiópia, Irã, Iraque, Paquistão, Emirados Árabes e Mongólia (DVORAK e SPICKLER, 2008). No Brasil, a reemergência dos casos de mormo ocorreu no final da década de 90 nos estados de Alagoas e Pernambuco em 1999 (MOTA e JUNIOR, 2022).

Recentemente, entre 2020 e 2022, novos casos da enfermidade foram registrados na China, Irã, Nepal e Turquia (MOTA e JUNIOR, 2022). Atualmente, a doença se limita a algumas áreas geográficas (DVORAK e SPICKLER, 2008) apesar de ainda ser encontrada em diversos continentes como Ásia, África, Oriente Médio e América do Sul (SPRAGUE et al, 2009).

No Brasil, entre o período de 2000 a 2021, foram notificados 3.157 casos de mormo no território (Figura 1) (MAPA, 2022).

Figura 1 - Distribuição de notificações de mormo no Brasil, período de 2000 a 2021



Fonte: CIEP/CGPZ/DSA/SDA

Neste período, a região que mais registrou casos foi o Nordeste, concentrando as notificações nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, enquanto que, no Distrito Federal, foram notificados 8 casos de mormo durante este período (MAPA, 2022).

3.3 Transmissão

O mormo normalmente afeta os animais solípedes, ou seja, equinos, asininos e muares. Entretanto, essa enfermidade infectocontagiosa pode ser transmitida a outros mamíferos como felinos, caninos, pequenos ruminantes e camelos. Animais selvagens também podem contrair a doença pela ingestão de carne de cavalo contaminada (MAIER, 1981).

Dentre as diversas espécies e grupos de animais, os porquinhos da índia apresentam certa predisposição para contrair o mormo, enquanto bovinos, suínos, ratos e aves são mais resistentes. Em relação aos seres humanos, esses são altamente susceptíveis à doença e, apesar de serem considerados hospedeiros acidentais, a enfermidade é comum entre aqueles que convivem com animais infectados ou que trabalham em laboratórios manipulando o agente (DVORAK e SPICKLER, 2008; WAAG e DESHAZER, 2004).

A transmissibilidade do mormo entre equídeos é extremamente alta, principalmente naqueles que estão inseridos em ambientes sem sanidade e

superlotados, gerando, ainda, um outro fator predisponente para a doença, o estresse (DVORAK e SPICKLER, 2008).

A transmissão do agente ocorre pela ingestão de alimentos e água infectados, pela penetração do feridas da pele e mucosas, por aerossóis e até mesmo pelo contato com o microrganismo por meio de fômites contaminadas (WHITLOCK et al., 2007).

A transmissão entre os equídeos ocorre principalmente pelo contato entre animais infectados e saudáveis por meio de fômites e do meio ambiente. A carga do agente em secreções respiratórias e exsudatos de pele provenientes de equídeos infectados costumam ser altas. Dessa forma, essas secreções se tornam a principal fonte de transmissão do mormo (BRIDGET et al., 2007).

Vale ressaltar que os equídeos infectados pela enfermidade, seja em sua forma crônica ou latente, são responsáveis pela manutenção da doença, ou seja, a presença desses animais em instalações e suas movimentações contribuem para a disseminação do mormo (DVORAK e SPICKLER, 2008).

3.4 Sinais Clínicos

Apesar de estarem mais susceptíveis ao mormo na sua forma crônica, os equinos ainda estão vulneráveis à forma aguda da doença. A infecção crônica pode se desenvolver durante semanas e até mesmo meses, enquanto se mantém subclínica (KHAN et al., 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH), o mormo pode se manifestar clinicamente nas formas nasal, pulmonar, cutânea e, ainda, manter o indivíduo infectado assintomático. Vale ressaltar que o indivíduo pode manifestar mais de uma forma da doença concomitantemente.

O mormo afeta principalmente o trato respiratório superior, pulmões e pele. A doença propicia a formação de nódulos e úlceras se desenvolvem nas vias aéreas superiores, isto é, nas cavidades nasais, faringe e laringe. Apesar dessas lesões serem mais comuns nas extremidades corpóreas, é possível encontrar nódulos em diferentes órgãos como fígado, baço e testículos (WOAH, 2022; DVORAK e SPICKLER, 2008).

Os nódulos causados pela doença têm um aspecto característico, se apresentando arredondados, firmes, com uma coloração acinzentada. Quando eles se rompem, observa-se uma descarga nasal hemorrágica e mucopurulenta bastante espessa, podendo, ainda, ocorrer descarga ocular purulenta. Essas secreções

podem se apresentar de forma bilateral ou unilateral, sendo elas nas narinas ou nos olhos (DVORAK e SPICKLER, 2008; AL-ANI, ROBERSON, 2007).

Decorrente das lesões causadas pelas rupturas dos nódulos, a membrana nasal pode se mostrar edemaciada e ulcerada, propiciando uma ruptura do septo nasal. Em relação aos linfonodos regionais, eles se tornam reativos e, com isso, doloridos (DVORAK e SPICKLER, 2008; MEURER, 2021).

A depender da extensão da infecção do trato respiratório, a doença pode evoluir para uma pneumonia, fazendo o animal apresentar sintomas como anorexia, tosse e hipertermia. Em infecções ainda mais avançadas é possível observar dispneia e até ruídos respiratórios na auscultação (MEURER, 2021).

A doença pode também aparecer em forma cutânea, desenvolvendo lesões de pele, abscessos subcutâneos e linfadenite. Os abscessos podem ulcerar, liberando pus que, ao alcançar os vasos linfáticos, leva a infecção para o resto do corpo (DVORAK e SPICKLER, 2008).

Recentemente, foram reportados sinais neurológicos que cientistas acreditam ser uma infecção secundária ao mormo. Eles acreditam que, com o desenvolvimento da doença, o ambiente se torna favorável à infecções por outras bactérias que, ao comprometerem a barreira hematoencefálica, originam sintomas neurológicos (DVORAK e SPICKLER, 2008).

3.5 Patogenia

A patogenia de qualquer doença pode estar relacionada à virulência do agente e também à competência do sistema imunológico do indivíduo, ou seja, esse mecanismo pode variar de acordo com a capacidade do organismo de combater o agente infeccioso, dando origem às diferentes manifestações da doença (KETTLE e WERNERY, 2016).

A *B. mallei* é capaz de provocar lesões já em seu local de entrada, que são, normalmente, as mucosas oculares, nasais, gastrointestinais ou até eventuais feridas cutâneas. Na porta de entrada, principalmente nos septos nasais e faringe, a bactéria pode causar, inflamação intensa, congestão da mucosa, lesões primárias granulomatosas e nódulos característicos (HIRSH e ZEE, 2003).

Em virtude da inflamação, os macrófagos são recrutados a fim de fagocitar a bactéria e dar fim à infecção, entretanto, a *B.mallei* é capaz de driblar o sistema imunológico do hospedeiro por diferentes meios, por exemplo, reduzindo a ação

fagocítica, ocasionando o desenvolvimento da infecção em diversos locais (HIRSH e ZEE, 2003).

A infecção aguda ocorre quando a bactéria estimula o sistema imune do indivíduo assim que entra no organismo, que pode reagir à ela formando um quadro de inflamação, enquanto que, na infecção latente, a bactéria é capaz de burlar a resposta imune mediada por células ao se disfarçar no citosol de uma célula, não ativando o sistema imune. Já em sua forma crônica, a infecção é parcialmente controlada pelo sistema imunológico, ou seja, a resposta imune gerada é capaz de se manter de forma satisfatória, no entanto não é capaz de impedir e/ou eliminar a progressão do microrganismo (KETTLE e WERNERY, 2016).

O agente etiológico precisa ultrapassar todos os mecanismos de defesa do hospedeiro como a imunidade inata e a imunidade adaptativa (GALYOV, et al, 2010) e, ainda, ser capaz de sobreviver e se replicar dentro das células (KETTLE e WERNERY, 2016).

A *B. mallei* possui um arsenal bastante amplo de fatores que contribuem para sua virulência, sendo alguns deles: a cápsula polisacarídea, que é o principal fator para a replicação da bactéria; o sensor de densidade; os lipopolissacarídeos; os sistemas de secreção II, III e IV; dentre outros (GALYOV, et al, 2010).

Inicialmente, a bactéria se adere à célula hospedeira com o auxílio de alguns desses fatores de virulência. Já aderida, a *B. mallei* conta com o sistema de secreção III em conjunto com outras enzimas, para inserir suas próprias proteínas secretoras dentro da célula do animal, atravessando a membrana celular hospedeira (KETTLE e WERNERY, 2016).

Então, a bactéria penetra a célula por fagocitose ou invasão. Dentro dela, o agente forma um vacúolo onde se instala e inicia sua replicação. A fim de não ser percebido pelo organismo do hospedeiro, a bactéria se camufla manipulando a expressão dos genes que maturam o endossoma, sendo esse último o responsável por endereçar as diferentes partículas que adentram a célula (KETTLE e WERNERY, 2016).

Ainda sem ser percebida, a bactéria dribla novamente o sistema imune do animal infectado ao criar um poro na membrana endossômica, sendo, assim, capaz de ir direto para o citoplasma da célula hospedeira. No citosol, o agente utiliza seus filamentos de actina para se mover dentro da célula (KETTLE e WERNERY, 2016).

A fim de infectar outras células, a bactéria é capaz de promover a fusão das membranas das células adjacentes, criando uma célula gigante multinucleada. Assim, a *B. mallei* se camufla completamente do sistema imunológico do hospedeiro, tornando o diagnóstico da doença mais desafiador (KETTLE e WERNERY, 2016).

3.6 Diagnóstico

O diagnóstico do mormo deve ser realizado por meio da associação dos sinais clínicos, alterações patológicas e dados epidemiológicos com testes sorológicos, reações imunoalérgicas (SOUZA, 2012) ou até com própria identificação da *B. mallei*, pelo seu isolamento ou por métodos moleculares (FERRAREZI et al, 2020).

O Manual Terrestre da Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH), no capítulo 3.6.11., atualizado em maio de 2018, descreve alguns dos métodos disponíveis para o diagnóstico da doença.

Neste manual, são descritos a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a cultura da própria bactéria, que permitem a identificação do agente etiológico em si; a fixação do complemento (FC), o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), o teste de aglutinação corado por rosa bengala (RBT) e o *western blot* (WB), que são testes sorológicos; e, por fim, o *Mallein test* também chamado de maleinização, que consiste em um teste de hipersensibilidade alérgica que permite testar a imunidade celular contra o mormo (WOAH, 2022).

Independente do teste, as amostras devem ser colhidas sempre por um Médico Veterinário habilitado e, para fins de trânsito animal, estas devem ser enviadas a laboratórios credenciados para a realização dos testes supracitados. Já para investigações epidemiológicas, os testes devem ser realizados por laboratórios oficiais ou públicos credenciados pelo Serviço Veterinário Oficial (SVO) (BRASIL, 2018).

3.6.1 Testes com a identificação do agente

Os testes para a identificação do agente causador do mormo são o PCR, o *real-time PCR* e a cultura da *B. mallei* em si. Esses testes são utilizados principalmente para o diagnóstico diferencial em casos de infecção por outros agentes como *Streptococcus equi*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Sporotrichium spp.*, e *Histoplasma farciminosum* (WOAH, 2022).

3.6.1.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR) e real-time PCR

O PCR consiste em um teste laboratorial que amplifica sequências específicas do DNA, *in vitro*, de forma a possibilitar a detecção de um determinado ácido nucleico em amostras biológicas e culturas bacterianas. Variações do PCR foram desenvolvidas e podem ser utilizadas para o diagnóstico de mormo como, por exemplo, o *real-time* PCR (SOUZA, 2012; ULRICH, 2006).

O *real-time* PCR é uma variação do PCR convencional que, por possibilitar o monitoramento do progresso do PCR em tempo real, viabiliza a amplificação e quantificação das sequências específicas de DNA de forma simultânea (SOUZA, 2012; WOA, 2022; TOMASO et al., 2006).

A realização do PCR e do *real-time* PCR para o diagnóstico de mormo é muito discutida entre cientistas nas últimas décadas (SOUZA, 2012). Segundo a WOA, o resultado positivo nesses testes indicam de fato a presença do agente etiológico, já o resultado negativo não é capaz de garantir a ausência da bactéria. Ainda, vale ressaltar que é possível que, nos próximos anos, a bactéria sofra mutações genéticas que a tornem indetectável por esses testes, diminuindo a especificidade deles.

3.6.1.2 Cultura bacteriana

Para realizar a cultura da bactéria *B. mallei*, uma amostra deve ser colhida com um *swab* preferencialmente de uma lesão fechada, para que não esteja contaminada. Em seguida, a amostra deve ser inoculada no meio de cultura para crescer e se proliferar (WOA, 2022).

A *B. mallei* é uma bactéria aeróbica mas que, na presença de nitrato, se torna anaeróbia facultativa. Esse agente cresce em condições ótimas à 37°C, de forma lenta e, habitualmente, o ágar sangue de cordeiro é utilizado como meio de cultura por oferecer ótimas condições para o crescimento da bactéria (WOA, 2022). Segundo a WOA, são recomendadas 72 horas de incubação da cultura e, no caso do ágar sangue, é possível enriquecer o meio com glicerol.

Existem outros meios de cultura onde é possível cultivar a bactéria causadora do mormo, entretanto, a maioria deles não apresenta o mesmo desempenho do ágar sangue, com exceção de um meio que foi desenvolvido exclusivamente para o cultivo da *B. mallei* e que pode ser encontrado no meio comercial (GLASS, 2009, WOA, 2022).

Mesmo em condições estéreis, é provável que haja a presença de outras bactérias na amostra e, conseqüentemente, o crescimento delas no meio de cultura. Por esses motivos, o isolamento do agente é extremamente difícil, (WERNERY, 2009) sendo recomendado pela WOAAH a realização do PCR com amostras da cultura para garantir a presença da *B. mallei*.

3.6.2 Testes sorológicos

Os testes sorológicos são os de eleição para o diagnóstico de mormo, entretanto, a sensibilidade e a especificidade dos antígenos utilizados nesses testes são, muitas vezes, inadequadas, causando polêmica acerca da acurácia desses testes (SOUZA, 2012).

3.6.2.1 Fixação de complemento (FC)

O teste de fixação de complemento é utilizado há muito tempo para o diagnóstico de mormo. Além de identificar casos crônicos da doença, ele é capaz de detectar a presença da bactéria a partir de uma semana após a infecção (ABREU, 2020).

O FC é capaz de indicar a quantidade de anticorpos, imunoglobulina (Ig) M e IgG, presentes em uma amostra. Contudo, é necessário que haja um controle de qualidade alto em relação aos antígenos e aos sistemas de complemento e hemolíticos, visto que, a especificidade e sensibilidade do teste dependem desses fatores (WOAH, 2022).

O Manual terrestre disponibilizado pela WOAAH descreve passo a passo como deve ser feito o processo da FC, bem como a preparação do antígeno. De acordo com a WOAAH, os resultados devem ser analisados sempre na diluição 1:5 e da seguinte forma: amostras com 100% de hemólise são negativas; amostras com 25-75% de hemólise são consideradas suspeitas e, por fim, quando não há hemólise o resultado é negativo.

Vale ressaltar que há a possibilidade de ocorrer falsos positivos, visto que existe uma reação cruzada entre a *B. pseudomallei* e a *B. mallei*. Além disso, os animais podem se manter positivos por meses após a infecção ou mesmo após o teste de hipersensibilidade alérgica (*Mallein test*), que será descrito posteriormente (WOAH, 2022).

3.6.2.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O ELISA consiste em um teste imunoenzimático, baseado nas reações antígeno anticorpo. Sua forma convencional é dividida em duas fases: a primeira é a

fase sólida, onde ocorre uma reação entre o anticorpo presente na amostra (anticorpo primário) e um antígeno purificado e fixo à placa de poliestireno; na segunda fase, adiciona-se um segundo anticorpo, ligado a uma enzima (conjugado), dirigido contra as imunoglobulinas da espécie em questão (KENDALL et al, 1983).

Por fim, adiciona-se um substrato específico para a enzima utilizada, ocorrendo a mudança de cor através da catálise enzimática, caso positivo. A coloração está quantitativamente proporcional à concentração do anticorpo na amostra (KENDALL et al, 1983).

Diversas variações do ELISA já foram desenvolvidas como o ELISA competitivo (C-ELISA) e o ELISA indireto (I-ELISA). O C-ELISA faz uso de um anti-lipossacarídeo (anti-LPS) juntamente com um anticorpo monoclonal (MAb) e, para o diagnóstico de mormo, foi utilizado *B. mallei* LPS MAb com um antígeno preparado anteriormente a partir do isolamento da bactéria em questão. Este teste obteve uma sensibilidade maior que o teste de FC, mostrando-se bastante promissor (SOUZA, 2012; WOAAH, 2022).

Já o I-ELISA segue o mesmo raciocínio do convencional mas utiliza-se um anticorpo secundário marcado, que, no caso do mormo, utilizou-se um recombinante móvel da *B. mallei*, trazendo maior especificidade para o teste com 98,88% e uma sensibilidade de 100% (SOUZA, 2012; WOAAH, 2022).

No caso do mormo, foi incorporado o sistema *avidin-biotin* ao ELISA para elevar a sensibilidade do teste convencional, entretanto, o procedimento ainda não foi validado pela WOAAH, necessitando de mais estudos (KENDALL et al, 1983; ELSCHNER, 2019; WOAAH, 2022).

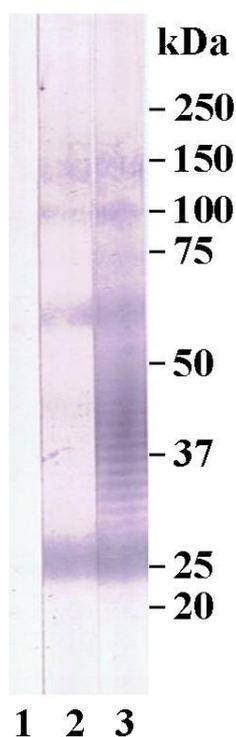
Apesar de todas essas variações, nenhuma forma do ELISA é capaz de diferenciar a *B. mallei* e a *B. pseudomallei* pela proximidade filogenética desses agentes. Dessa forma, nenhum teste ELISA é completamente validado pela WOAAH para o diagnóstico de mormo (ELSCHNER, 2019; WOAAH, 2022).

3.6.2.3 Western blot (WB)

O teste *western blot* (WB) consiste na separação de proteínas de acordo com o tamanho por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), a transferência e imobilização delas para uma membrana de suporte e, por fim, sua identificação através da inoculação de anticorpos específicos para a proteína alvo (HNASKO et al., 2015).

A fim de diagnosticar o mormo por intermédio do WB, anticorpos anti-*B. mallei* LPS são utilizados para reagir com a proteína presente no antígeno. Dessa forma, o teste será positivo quando o padrão de bandas da *B. mallei* LPS se tornam visíveis nas regiões de 20-60 kDa (linha 3 da figura 2), será suspeito quando o padrão de bandas estiver com uma cor um pouco mais fraca (linha 2 da figura 2) e será negativo quando não for vista nenhuma reação (linha 1 da figura 2). (WOAH, 2022; HNASKO et al., 2015).

Figura 2 - Demonstração do teste *western blot*



Fonte: BMC Veterinary Research

Apesar de ser considerado um teste com alta sensibilidade e especificidade, o WB não é capaz de diferenciar a *B. mallei* e a *B. pseudomallei*, pelo fato dessas bactérias possuírem proteínas altamente similares (WOAH, 2022).

3.6.2.4 Teste de aglutinação corado por rosa bengala (RBT)

O teste de aglutinação corado por rosa bengala (RBT) está sendo testado para o diagnóstico de mormo, utilizando uma suspensão bacteriana termo-inativada corada por rosa bengala em uma placa de aglutinação (WOAH, 2022).

Um estudo paquistanês revelou que o RBT possui uma sensibilidade de 90% e especificidade de 100%. Apesar de já ser validado na Rússia, segundo a WOAH, o RBT apresenta falsos negativos ou resultados inconclusivos em animais com a

doença crônica, e, por esse motivo, o teste ainda não detém de uma acurácia aceitável para fins de diagnóstico definitivo (WOAH, 2022).

3.6.3 Testes para imunidade celular

3.6.3.1 Teste de maleinização

O teste de maleinização consiste em um ensaio de hipersensibilidade alérgica à proteína da *B. mallei*. São injetados, de forma intradérmica, 0.1ml de um derivado da proteína da bactéria purificada na pálpebra inferior do animal e, entre 24 e 48 horas, já é possível observar o resultado do teste (WOAH, 2022).

Quando positivo, o local apresenta inchaço edematoso, hipertermia podendo ocorrer uma descarga purulenta advinda da carúncula lacrimal ou da conjuntiva. Caso tenha resultado negativo, o local apresentará um inchaço muito sutil da região sendo possível, ainda, que não haja reação alguma (WOAH, 2022).

Vale ressaltar que o teste pode expor resultados inconclusivos em casos clínicos avançados, além de não ser muito recomendado por comprometer o bem estar animal ao causar incômodo. Entretanto, o teste de maleinização se apresenta como uma alternativa eficaz para o diagnóstico de mormo em ambientes mais remotos e sem estrutura para realização de testes mais elaborados (WOAH, 2022).

3.7 Recomendações da WOAH e do MAPA para o diagnóstico de mormo

A WOAH definiu que o diagnóstico de mormo deve ser realizado a partir da identificação da própria bactéria, de seus antígenos específicos ou de seu próprio material genético.

O teste sorológico mais recomendado pela WOAH é o de fixação do complemento (FC), que deve ser confirmado por um segundo teste que tenha maior sensibilidade e especificidade. Dessa forma, para confirmação do diagnóstico são recomendados o *western blot* (WB), o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) (WOAH, 2022).

O MAPA instituiu através da Instrução Normativa nº 6 de 16 de Janeiro de 2018, que os testes laboratoriais a serem empregados para o diagnóstico de mormo no Brasil são o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) ou a fixação do complemento (FC), contando, ainda, com o teste complementar *western blot* (WB) para a confirmação do diagnóstico.

Segundo o Art. 13 dessa mesma Instrução Normativa, é considerado diagnóstico positivo para mormo: sempre que os testes de triagem juntamente ao teste complementar forem positivos; quando o teste complementar for positivo;

quando os testes de triagem apresentarem resultado positivo em local endêmico da doença e os sinais clínicos do animal condizerem com tais resultados; e, por fim, quando houver a detecção da própria bactéria, seja por método microbiológico ou molecular (BRASIL, 2018).

O mesmo Artigo salienta, ainda, que nos casos que não haja a identificação da *B. mallei*, não devem ser excluídos os resultados dos testes de triagem e complementar (BRASIL, 2018)

4 CONCLUSÃO

O mormo é uma zoonose que, apesar de acometer os humanos como hospedeiros acidentais, tem predileção pelos equídeos por serem extremamente suscetíveis à doença, acarretando em grande prejuízo econômico na área equestre.

Trata-se de uma doença infectocontagiosa com alta transmissibilidade tornando sua disseminação rápida e de difícil controle. Além disso, ela pode se apresentar de forma crônica, assintomática ou aguda, se subdividindo ainda em diferentes forma de manifestação, sendo elas, nasal, pulmonar e cutânea.

O diagnóstico do mormo no Brasil deve ser feito de acordo com as orientações descritas na Instrução Normativa nº 6 de 16 de Janeiro de 2018 do MAPA. Entretanto, nesta monografia são descritas outras técnicas disponíveis para diagnóstico da doença que, de forma conjunta, podem garantir resultados equivalentes ou até mais específicos e sensíveis daqueles mencionados na Instrução Normativa.

Portanto, torna-se clara a necessidade de estudos mais aprofundados acerca das técnicas disponíveis para o diagnóstico de mormo, a fim de desenvolver um protocolo mais acurado e prático diante do desafio de constatar a doença de forma precoce e, assim, evitar sua disseminação.

5 REFERÊNCIAS

- ABREU, D. C., et al. Systematic monitoring of glanders-infected horses by complement fixation test, bacterial isolation, and PCR. *Veterinary and animal science*, 10, 100147. 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. *Instrução Normativa nº6*, de 16 de janeiro de 2018.
- BRIDGET, C. G.; WAAG, D. M. Glanders. Cap. 6. *Medical Aspects of Biological Warfare*. 2007.
- DVORAK, G.D.; SPICKLER A.R. Glanders. *J Am Vet Med Assoc*. 2008.
- ELSCHNER, M. et al. Evaluation of the comparative accuracy of the complement fixation test, Western blot and five enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of glanders. *PloS one*, 14(4), e0214963. 2019.
- ELSCHNER, M. et al. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Veterinary Research*, v.7, p.4. 2011.
- FERRAREZI, B. et al. Burkholderia Mallei e o mormo. *Revista Intellectus*, v. 56, n. 1. p 91-100. 2020.
- FONSECA-RODRÍGUEZ, O.; JÚNIOR, J. W. P.; MOTA, R. A. Spatiotemporal analysis of glanders in Brazil. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 78, p. 14-19, 2019.
- GALYOV, E. E., BRETT, P. J., & DESHAZER, D. Molecular insights into Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei pathogenesis. *Annual review of microbiology*, 64, 495–517. 2010.
- GLASS, M. B.; BEESLEY, C. A.; WILKINS, P. P.; & HOFFMASTER, A. R. Comparison of four selective media for the isolation of Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(6), 1023–1028. 2009.
- HIRSH D.C.; ZEE, Y. C. *Microbiologia Veterinária*. 1º Ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 446p. 2003.
- HNASKO, T. S. & HNASKO, R. M. The Western Blot. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1318, 87–96. 2015.
- KHAN, I.; WIELER, L. H.; MELZER, F.; ELSCHNER, M. C.; MUHAMMAD, G.; ALI, S. et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. *Transboundary and Emerging Diseases*, v. 60, n. 3, p. 1-18, 2012.

KENDALL, C.; IONESCU-MATIU, I.; & DREESMAN, G. R. Utilization of the biotin/avidin system to amplify the sensitivity of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of immunological methods*, 56(3), 329–339. (1983).

KETTLE, A. N.; WERNERY, U. Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses. *Equine Vet J.* 2016.

LANGENEGGER, J.; DÖBEREINER, J.; LIMA, A. C. Foco de mormo (Malleus) na região de Campos, estado do Rio de Janeiro. *Arq. Inst. Bio. Anim.* v. 3, p. 91 – 108, 1960.

MAIER, H. *Pseudomonas mallei* und *Pseudomonas pseudomallei*. In *Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren*. Eds, H Bobel and TSchiesser. *Jena7Gustav Fischer Verlag*, pp 111 – 153. 1981.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Coordenação de Informação e Epidemiologia*. Consulta em 23 de novembro de 2022. Disponível em: <https://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal/index.htm>

MEURER, I. R. Mormo, uma zoonose reemergente: aspectos gerais e principais ferramentas de diagnóstico. *Brazilian Journal of Health Review*. Vol. 4 No. 6. 2021.

MOTA, R., & JUNIOR, J. Current status of glanders in Brazil: recent advances and challenges. *Brazilian Journal of Microbiology*, OnlineFirst, 1-13. 2022.

NAUREEN, A.; SAQIB, M.; MUHAMMAD, G.; HUSSAIN, M. H.; & MUHAMMAD, N. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19:362-367. 2007.

SINGHA, H.; SHANMUGASUNDARAM, K.; SAINI, S.; TRIPATHI, B. N. Serological Survey of Humans Exposed to *Burkholderia mallei*-Infected Equids: A Public Health Approach. *Asia Pacific Journal of Public Health*, v. 32, n. 5, p. 274-277, 2020b.

SOUZA, M. *Diagnóstico do Mormo através da técnica de fixação do complemento utilizando-se diferentes antígenos e métodos de incubação*. Tese (Mestranda em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, p.97. 2012.

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

TAPIA, D.; SANCHEZ-VILLAMIL, J. I.; TORRES, A. G. Emerging Role of Biologics for the Treatment of Melioidosis and Glanders. *Expert Opinion on Biological Therapy*, v. 19, n. 12, p. 1319-1332, 2019.

TOMASO, H.; SCHOLZ, H. C.; AL DAHOUK, S.; EICKHOFF, M.; TREU, T. M.; WERNERY, R.; WENERY, U.; & NEUBAUER, H. Development of a 5'-nuclease

real-time PCR assay targeting flpP for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. *Clinical chemistry*, 52(2), 307–310. 2006.

ULRICH, M. P.; NORWOOD, D. A.; CHRISTENSEN, D. R.; & ULRICH, R. L. Using real-time PCR to specifically detect *Burkholderia mallei*. *Journal of medical microbiology*, 55(Pt 5), 551–559. 2006.

VAN ZANDT, K. E.; GREER, M. T.; GELHAUS, H. C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet J Rare Dis*. 2013

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

WERNERY U. Glanders. In: *Infectious Diseases of the Horse*, Mair T.S. & Hutchinson R.E., eds. *Equine Veterinary Journal Ltd*, Cambridgeshire, UK, 253–260. 2009.

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

WOAH, Organização Mundial de Saúde Animal. *Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals*. Chapter 3.5.11. 2022