



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA  
AGROPECUÁRIA**

**ENSAIO DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O  
DIAGNÓSTICO DO MORMO COM ANTÍGENO DE  
*Pseudomonas aeruginosa* E SUAS POSSIBILIDADES DA  
EPIDEMIOLOGIA DESSA ZONOSE NO BRASIL**

**Caroline Pereira Correia**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2024**

**ENSAIO DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DO  
MORMO COM ANTÍGENO DE *Pseudomonas aeruginosa* E SUAS  
POSSIBILIDADES DA EPIDEMIOLOGIA DESSA ZOOSE NO  
BRASIL**

**Caroline Pereira Correia**

Bacharel em Medicina Veterinária

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2019

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Defesa Agropecuária da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Defesa Agropecuária na Área de Ciências Agrárias.

**Orientador:** Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
JANEIRO – 2024**

## FICHA CATALOGRÁFICA

C824e	<p>Correia, Caroline Pereira.</p> <p>Ensaio de um teste elisa indireto para o diagnóstico do mormo com antígeno de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e suas possibilidades da epidemiologia dessa zoonose no Brasil / Caroline Pereira Correia._ Cruz das Almas, BA, 2024. 117f.; il.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas, Mestrado Profissional em Defesa Agropecuária.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira.</p> <p>1.Zoonoses – Veterinária. 2.Zoonoses – Equino. 3.Doenças transmissíveis – Análise. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 636.12</p>
-------	--

## FOLHA DE APROVAÇÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA - UFRB  
CENTRO DE CIÊNCIAS, AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA  
AGROPECUÁRIA

### ENSAIO DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DO MORMO COM ANTÍGENO DE *Pseudomonas aeruginosa* E SUAS POSSIBILIDADES DA EPIDEMIOLOGIA DESSA ZONOSE NO BRASIL

Comissão Examinadora da Defesa de Mestrado de  
Caroline Pereira Correia

Aprovado em: 05 de janeiro de 2024

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ROBSON BAHIA CERQUEIRA  
Data: 29/02/2024 12:14:27-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. Robson Bahia Cerqueira  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB)  
Presidente da banca

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** JOSE ROBERTO PINHO DE ANDRADE LIMA  
Data: 29/02/2024 12:25:34-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. José Roberto Pinho de Andrade Lima  
Escola Superior de Defesa (ESD)  
Examinador Externo



Dra. Luciana Bahiense da Costa  
Secretaria de Saúde do Estado da Bahia (SESAB)  
Examinador Externo

## **DEDICATÓRIA**

Dedico aos meus pais e avó (in memoriam), exemplos de vida, amor e carinho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por nunca ter me desamparado.

Aos meus pais, irmã e Mel, exemplos de amor e dedicação, agradeço por todo apoio.

Aos meus professores e orientador, agradeço por toda confiança.

## EPÍGRAFE

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação”.

Simone de Beauvoir

## **ENSAIO DE UM TESTE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DO MORMO COM ANTÍGENO DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* E SUAS POSSIBILIDADES DA EPIDEMIOLOGIA DESSA ZOOSE NO BRASIL.**

**RESUMO:** O mormo é uma doença grave, reemergente e altamente contagiosa causada pela bactéria gram-negativa *Burkholderia mallei*, afetando vários mamíferos, especialmente equídeos, e tem implicações significativas na saúde animal e humana. Reconhecida pela Organização Mundial para a Saúde Animal (OMSA) como zoonose e potencial arma biológica, tornou-se uma preocupação global. No Brasil, é uma doença de notificação obrigatória, conforme a Instrução Normativa 50 de 24 de setembro de 2013 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo transmitida principalmente por água, alimentos e fômites contaminados. Com o maior rebanho equino da América Latina, o país enfrenta desafios econômicos consideráveis devido aos impactos do mormo na indústria de esportes, lazer, exportação de animais e produção de carne. Após um longo período sem registros, novos casos surgiram no país no início do século XXI, gerando preocupações crescentes em todos os estados brasileiros. Diante desse cenário, a pesquisa e padronização de novos testes diagnósticos são essenciais para saúde pública. Este estudo iniciou com a aplicação de um questionário investigativo para médicos veterinários atuantes na medicina equina sobre o conhecimento da doença e a padronização um teste imunoenzimático indireto usando um antígeno dialisado para detectar *B. mallei*. Primeiramente cultivou-se *Pseudomonas aeruginosa* para produção do antígeno dialisado, seguido pela realização do ELISA com amostras negativas e positivas para mormo permitindo definir sensibilidade, especificidade e valor preditivo negativo e positivo, indicando a eficácia considerável do teste. Assim, o ELISA indireto padronizado com antígeno dialisado pode ser considerado uma ferramenta eficaz de diagnóstico.

**Palavras-Chave:** *Burkholderia mallei*, sorodiagnóstico, saúde única

## **TRIAL OF AN INDIRECT ELISA TEST FOR THE DIAGNOSIS OF GLADERS WITH *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ANTIGEN AND ITS POSSIBILITIES FOR THE EPIDEMIOLOGY OF THIS ZONOSIS IN BRAZIL.**

**ABSTRACT:** Glanders is a serious, re-emerging and highly contagious disease caused by the gram-negative bacterium *Burkholderia mallei*, affecting several mammals, especially equids, and has significant implications for animal and human health. Recognized by the World Organization for Animal Health (WOAH) as a zoonosis and potential biological weapon, it has become a global concern. In Brazil, it is a notifiable disease, according to Normative Instruction 50 of September 24, 2013 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MALS), being transmitted mainly by contaminated water, food and fomites. With the largest equine herd in Latin America, the country faces considerable economic challenges due to the impacts of glanders on the sports industry, leisure, animal exports and meat production. After a long period without records, new cases emerged in the country at the beginning of the 21st century, generating growing concerns in all Brazilian states. Given this scenario, research and standardization of new diagnostic tests are essential for public health. This study began with the application of an investigative questionnaire to veterinarians working in equine medicine about their knowledge of the disease and the standardization of an indirect immunoenzymatic test using a dialyzed antigen to detect *B. mallei*. First, *Pseudomonas aeruginosa* was cultivated to produce dialyzed antigen, followed by ELISA with negative and positive samples for glanders, allowing sensitivity, specificity and negative and positive predictive value to be defined, indicating the considerable effectiveness of the test. Therefore, standardized indirect ELISA with dialyzed antigen can be considered an effective diagnostic tool.

**Keywords:** *Burkholderia mallei*, serodiagnosis, one health

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 – Cultivo microbiológico de <i>Burkholderia mallei</i> em ágar base acrescido de 5% de sangue ovino. Colônias pequenas, mucoides, acinzentadas e não hemolíticas .....	25
Figura 2 – Esquema ilustrativo da resposta imune inata com a barreira física da pele quebrada, as substâncias químicas produzidas para estimular a inflamação como citocinas e quimiocinas, o sistema do complemento e a fagocitose pelos neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs) .....	31
Figura 3 – Esquema ilustrativo dos vários componentes da resposta adaptativa - resposta humoral e celular. As subpopulações de células T não se encontram diferenciadas neste esquema .....	33
Figura 4 – Exemplificação do ELISA indireto .....	38
Figura 5 – Brasil: número efetivo do rebanho equino entre 2004 e 2022 .....	45
Figura 6 – Fluxo de produção da cadeia de abate e exportação de jumentos no Nordeste .....	49
Figura 7 – Diálise do antígeno em meio PBS .....	55
Figura 8 – Bloqueio das reações em placa de ELISA com PBS+LPD .....	56
Figura 9 – Imagem da placa de padronização do ELISA .....	57
Figura 10 -Representação esquemática de ELISA utilizando soro de paciente para pesquisa de anticorpos para uma determinada doença .....	58
Figura 11 -Gradiente de cor referente ao resultado obtido do ELISA indireto para a titulação do antígeno .....	62
Figura 12 -Estado de atuação profissional .....	68
Figura 13 -Ocorrência de espécies atendidos .....	69
Figura 14 -Tempo de atuação na medicina equina .....	70
Figura 15 -Relação de médicos veterinários cadastrados no PNSE .....	71
Figura 16 -Relação de conhecimento da IN 6 de 16 de janeiro de 2018 .....	72
Figura 17 -Média de entendimento quando aos exames laboratoriais para diagnóstico do mormo .....	73
Figura 18 -Relação da <i>Burkholderia mallei</i> e resistência ambiental .....	74
Figura 19 -Áreas de atuação profissional .....	75
Figura 20 -Afecções clínicas da rotina de atendimento veterinário .....	76
Figura 21 -Sinais clínicos para suspeita de mormo .....	77
Figura 22 -Diagnóstico diferencial de mormo .....	78
Figura 23 -Percentual de atendimentos para doenças de notificação obrigatória .....	79
Figura 24 -Profissionais que atenderam casos suspeitos ou confirmados de mormo .....	80
Figura 25 -Principal via de contaminação da <i>Burkholderia mallei</i> em equídeos ....	81
Figura 26 -Prática do uso de EPI entre médicos veterinários da medicina equina .....	82
Figura 27 -Frequência de diagnóstico diferencial de mormo .....	83
Figura 28 -Utilização do teste de maleína para diagnóstico de mormo .....	84
Figura 29 -Regularidade de necropsia nos atendimentos a equídeos .....	85

## LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

	Página
Gráfico 1 – Padronização de ELISA indireto com amostras de soro equino para mormo .....	63
Gráfico 2 – Amostras comprovadamente positivas de soro equino para mormo .....	64
Gráfico 3 – Amostras de soro equino negativo para mormo .....	65
Tabela 1 – Brasil: Distribuição da tropa, anos 2004 e 2013 .....	46
Tabela 2 – Mapa referente a padronização para titulação do teste ELISA indireto no diagnóstico de <i>Burkholderia mallei</i> .....	56
Tabela 3 – Esquematização dos cálculos de sensibilidade e especificidade .....	59
Tabela 4 – Valores para cálculo de sensibilidade e especificidade .....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.E.C – Antes da Era Comum

ADAB – Agência Estadual de Defesa Agropecuária da Bahia

Ag – Antígeno

AIE – Anemia Infecciosa Equina

APC – Células Apresentadoras de Antígenos

BHI - Brain Heart Infusion

CFMV – Conselho Federal de Medicina Veterinária

CIEF – Contraimunoeletroforese

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CV – Coeficiente de Variação

DCs – Células dendríticas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DO – Densidade Óptica

DP – Desvio Padrão

DSA – Divisão de Defesa Sanitária Animal

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FAO – Food and Agriculture Organization

FC – Fixação de Complemento

FDA – Food and Drug Administration

GM-CSF – Fator Estimulador das Colônias de Granulócitos e Macrófagos

GTA – Guia de Trânsito Animal

HAI – Hemaglutinação Indireta

HUMV – Hospital Universitário de Medicina Veterinária

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IDGA – Imunodifusão em Gel de Agarose

IFN – Interferon

IL – Interleucina

IN – Instrução Normativa

LADESA – Laboratório de Sanidade Animal

LDI – Laboratório de Doenças Infecciosas Linfócitos

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade

OMSA – Organização Mundial para a Saúde Animal

PBS – Phosphate Buffered Saline

PBS-T – Phosphate Buffered Saline Tween

PCFE – Propriedades Criadoras e Fornecedoras de Equídeos

PCR-RFLP – Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism

PNSE – Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos

PPM – Pesquisa Pecuária Municipal

PROTEA – Propriedades de Triagem e Espera de Equídeos

qPCR – Reação em Cadeia de Polimerase quantitativa

RB – Rosa Bengala

RIISPOA – Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal

RPM – Rotação por Minuto

SDA – Sistema de Defesa Agropecuária

SVO – Serviço Veterinário Oficial

TLR – Toll Like Receptor

TMP-SMX – Trimetoprima/Sulfametoxazol

TNF – Fator de Necrose Tumoral

UFRB – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

UE – União Europeia

WB – Western Blotting

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$  – alfa

$\beta$  – beta

$^{\circ}\text{C}$  – graus Celsius

% – porcentagem

N<sup>o</sup> – número

$\mu\text{L}$  – microlitros

## SUMÁRIO

	Página
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>OBJETIVOS</b> .....	21
OBJETIVO GERAL .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
ETIOLOGIA .....	24
EPIDEMIOLOGIA .....	26
TRANSMISSÃO .....	28
PATOGENIA .....	29
RESPOSTA IMUNE .....	30
Resposta imune inata .....	31
Resposta imune adaptativa .....	31
INTERAÇÃO BURKHOLDERIA E <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	34
SINAIS CLÍNICOS .....	35
DIAGNÓSTICOS .....	37
Clínico – epidemiológico .....	37
Laboratorial .....	37
MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO .....	41
TRATAMENTO .....	42
LEGISLAÇÃO .....	42
AGRONEGÓCIO DO CAVALO .....	44
ABATE DE EQUÍDEO: SITUAÇÃO ATUAL NO BRASIL .....	47
ABATE DE ASININOS NA BAHIA .....	47
SITUAÇÃO ECONÔMICA NA BAHIA .....	49
ETAPAS DO ABATE .....	51
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	52
PARA ESTUDO DO ENSAIO INDIRETO .....	52
PRODUÇÃO DO ANTIGENO .....	52
EXPANSÃO BACTERIANA - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	53
OBTENÇÃO DO ANTÍGENO .....	53
DIALISE .....	54

PROTOCOLO DO ELISA indireto .....	55
ESTUDO DA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO - DETERMINAÇÃO DO CUT- OFF .....	58
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	59
PARA O ESTUDO DO QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO .....	60
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	60
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	61
LOCAL .....	61
AVALIAÇÃO QUALITATIVA .....	61
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	62
Com relação a padronização ao ELISA indireto .....	62
Com relação ao questionário epidemiológico .....	67
<b>CONCLUSÃO</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88
<b>ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....	93
<b>APÊNDICE</b> .....	108

## 1 INTRODUÇÃO

O mormo é uma doença conhecida desde a antiguidade, sendo responsável por grandes prejuízos sociais, econômicos e sanitários. Sua predileção entre as espécies animais são os equídeos; no entanto, pode infectar acidentalmente outros animais, como carnívoros, pequenos ruminantes e o homem, principalmente por meio de água, alimentos e fômites contaminados (ROCHA, 2018).

No Brasil a doença é conhecida por diversos nomes, variando a cada região do país como lamparão, cancro nasal, catarro-de-mormo, catarro-de-burro e garrotilho atípico sendo o agente etiológico a bactéria gram-negativa *Burkholderia mallei* (SILVA, 2014; CARVALHO, 2019).

As manifestações clínicas do mormo podem surgir de forma isolada ou em conjunto, envolvendo alterações respiratórias, linfáticas e cutâneas. A doença é normalmente aguda em asininos e muares, enquanto em equinos é usualmente crônica. Apesar do avanço no estudo, as imunizações desenvolvidas se mostraram ineficazes para os animais suscetíveis, e o tratamento não é liberado (RADOSTITS *et al.*, 2002; VERMA *et al.*, 2014; TITBALL, *et al.*, 2017; PORTO, 2020).

No âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a Instrução Normativa Nº 6, de 16 de janeiro de 2018, estabelece diretrizes gerais para a prevenção, controle e erradicação do mormo no Brasil (BRASIL, 2018). Para o diagnóstico da doença, seguem-se as diretrizes da Instrução Normativa Nº 35, de 17 de abril de 2018, do MAPA, que define os testes de triagem e confirmatórios (BRASIL, 2018).

Em 30 de junho de 2023, a portaria Nº 593 do MAPA revogou alguns incisos da IN Nº 6, trazendo mudanças significativas, como a obrigatoriedade dos testes diagnósticos para o trânsito animal (BRASIL, 2023). Tais alterações podem resultar em dados epidemiológicos subestimados, que não refletem a realidade a longo prazo, devido à redução e direcionamento da testagem populacional.

Essa situação remete a um exemplo ocorrido em 2001, quando a suspensão dos testes de tuberculose durante o surto de febre aftosa na Inglaterra e no País de Gales contribuiu para o aumento da incidência da doença nos rebanhos. De acordo com Allen; Skuce; Byrne (2018) essa suspensão resultou em um aumento subsequente da tuberculose bovina, provocando surtos significativos entre o gado. Os impactos econômicos consideráveis desse aumento ressaltaram a importância da manutenção de programas eficazes de testagem e vigilância para prevenir e controlar doenças animais.

A interação entre animais representa um desafio adicional, uma vez que o mormo é uma zoonose, havendo potencial de disseminação do microrganismo pelo contato entre animais e seres humanos. Isso ressalta a importância da intervenção e responsabilidade do médico veterinário não apenas na gestão do mormo, mas também na promoção da saúde coletiva.

Desta forma, a nova portaria entra em conflito com o objetivo de controlar e erradicar a doença, uma vez que resultará na redução dos testes realizados no rebanho de equídeos nacional. A realização de testes diagnósticos em larga escala é de extrema importância, como evidenciado por Silva (2018) pelo sucesso de países como os Estados Unidos, Inglaterra e Austrália que implementaram medidas severas de controle epidemiológico e erradicação da doença.

Pesquisas que exploram o mormo por meio da utilização de antígenos com similaridade antigênica, sensibilidade e especificidade nas análises laboratoriais representam uma nova abordagem diagnóstica. Estudos como este, que se dedicam a essa linha de investigação, desempenham um papel crucial na ampliação do conhecimento sobre a doença e o desenvolvimento de testes laboratoriais acessíveis e eficazes, contribuindo para confirmações e novas descobertas que fortaleçam as medidas de controle e prevenção da enfermidade.

Resoluções como da portaria N° 593 de 30 de junho de 2023 podem resultar em dados epidemiológicos que não condizem com a realidade da população a longo prazo, visto a diminuição e direcionamento da testagem populacional nacional. A interação entre animais representa um desafio, pois, sendo uma zoonose, há o potencial de disseminação deste microrganismo pelo contato entre animais e seres humanos. Isso

destaca a relevância da intervenção e responsabilidade do médico veterinário tanto na gestão do mormo quanto na promoção da saúde coletiva. Deste modo, pesquisas são de extrema importância para conhecimento do patógeno, testes laboratoriais acessíveis e eficientes, bem como a valorização das medidas de controle e prevenção.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a capacidade antigênica da *Pseudomonas aeruginosa* visando a padronização de um teste ELISA indireto para o diagnóstico do mormo.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um ensaio imunoenzimático indireto utilizando *Pseudomonas aeruginosa* como antígeno.
- Estabelecer os estudos de sensibilidade e especificidade do teste padronizado.
- Avaliar o conhecimento dos profissionais médicos veterinários sobre a doença, etiopatogenia e exames laboratoriais.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

O mormo é uma zoonose infectocontagiosa piogranulomatosa responsável por grandes prejuízos sociais, econômicos e sanitários. Descrito por Aristóteles e Hipócrates nos séculos III e IV AEC, porém somente em 1862 ocorreu o isolamento do patógeno procedente de amostras de fígado e baço contaminados com *Burkholderia mallei* (SILVA, 2018).

A doença afeta principalmente solípedes, mas também pode ocorrer em outras espécies animais, como os carnívoros que consomem carne contaminada, pequenos ruminantes e, ocasionalmente, o ser humano como hospedeiro acidental. Neste último caso, é classificada como uma doença de natureza ocupacional. Devido ao seu elevado potencial de infecção, é frequentemente mencionado como um agente de bioterrorismo. (SILVA, 2014; ROCHA, 2018; CARVALHO, 2019).

Clinicamente o mormo afeta o sistema respiratório e linfático causando alta mortalidade e morbidade notadamente nos seres humanos. Tem potencial de assumir três formas clínicas distintas: nasal, pulmonar e cutânea, a depender da localização da lesão primária. Nos asininos e muares manifesta-se com sinais clínicos de infecção aguda podendo levar a óbito de sete a dez dias, enquanto nos equinos a evolução tem caráter crônico, podendo apresentar ou não sinais clínicos evidentes e característicos da doença (RADOSTITS *et al.*, 2002; VERMA *et al.*, 2014; PORTO, 2020).

O diagnóstico do mormo no território nacional é conduzido de acordo com a Instrução Normativa Nº 35, de 17 de abril de 2018, que estabelece os testes laboratoriais oficiais. Para o diagnóstico de triagem, é utilizado o Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), reconhecido como teste oficial padronizado pelo MAPA em todo o país. Desde o ano de 2020, o teste de Fixação de Complemento (FC) é utilizado exclusivamente para trânsito internacional. Para confirmação diagnóstica, emprega-se o Western Blotting (WB), também designado como teste oficial confirmatório (BRASIL, 2018).

Segundo Silva (2018) outras técnicas como hemaglutinação indireta (HAI), contraimunoeletroforese (CIEF), reação de aglutinação com antígeno corado por rosa bengala (RB) e outras técnicas ou modificações das técnicas conhecidas podem ser realizadas sem fins de diagnóstico oficial.

Apesar do avanço no estudo para imunoprofilaxias de *Burkholderia mallei*, estas se mostraram ineficazes para imunizar os animais suscetíveis. Estudos como de Titball *et al.*, (2017) avaliando vacinas de bactérias inteiras mortas, subunidades de proteínas, polissacarídeos, DNA ou vacinas glicoconjugadas bem como as pesquisas de Silva; Dow (2013) com estudo imunogênico e desenvolvimento de vacinas vivas atenuadas de *B. mallei* e *B. pseudomallei* enfrentaram desafios como desenvolvimento de resposta imune humoral e celular eficiente e duradoura.

As estratégias empregadas pelo patógeno, que incluem a diminuição na sinalização da resposta imune e a habilidade de escapar da formação do fagolisossomo, favorecem sua sobrevivência no meio intracelular. Como resultado, o tratamento não se mostra eficaz na eliminação da *B. mallei* do hospedeiro. Esses fatores contribuem para que o paciente se torne um potencial disseminador da doença. Estudos recentes têm ampliado nossa compreensão das interações entre o patógeno e as proteínas do hospedeiro, assim como das disfunções na ativação de macrófagos e na evasão imune promovida pela *Burkholderia mallei*, embora ainda não estejam completamente elucidadas. (TITBALL *et al.*, 2017; SAIKH; MOTT, 2017).

As únicas estratégias de controle e prevenção da doença no país estão alinhadas com as diretrizes estabelecidas pela Instrução Normativa Nº 6, de 16 de janeiro de 2018 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Essas diretrizes, inseridas no âmbito do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), recomendam medidas específicas para a prevenção, controle e erradicação do mormo no território nacional. De acordo com essa instrução normativa, são determinados o sacrifício e a destruição dos casos confirmados da doença, seguindo os procedimentos e métodos aprovados pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFMV), dentro do prazo máximo de quinze dias a contar da notificação ao proprietário do animal.

Em 30 de junho de 2023, a Portaria N° 593 foi emitida, resultando na revogação de certos dispositivos da Instrução Normativa N° 6 e introduzindo mudanças significativas no cenário regulatório. Uma dessas alterações importantes é a inclusão da opcionalidade dos testes de triagem para o trânsito interestadual de equídeos e participação em eventos de aglomeração cumprindo outras exigências sanitárias conforme estabelecido na legislação estadual correspondente.

Outro aspecto crucial abordado na portaria diz respeito aos casos positivos em testes laboratoriais na ausência de sinais clínicos evidentes. Conforme a nova regulamentação, animais assintomáticos que testarem positivo não serão submetidos ao sacrifício imediato, mas sim passarão por avaliação clínica pelo Serviço Veterinário Oficial. Essa consideração é relevante à luz do entendimento atual sobre a etiopatogenia e a transmissão da *Burkholderia mallei* em seus hospedeiros.

### 3.1 ETIOLOGIA

O mormo tem como patógeno a bactéria *Burkholderia mallei*, que morfológicamente apresenta-se como um cocobacilo gram-negativo irregular, isolado ou em pequenas cadeias, sem cápsula, imóvel, não formadora de esporos, anaeróbica facultativa, oxidase e catalase positivas, indol negativa, redutoras de nitrato e nitrito, hidrolisa a uréia, descarboxila lisina, fermenta glicose, mas não fermenta maltose, lactose, manose e manitol. Sua morfologia depende das condições de cultivo, como observado na figura 1 (ROCHA, 2018; CARVALHO 2022).

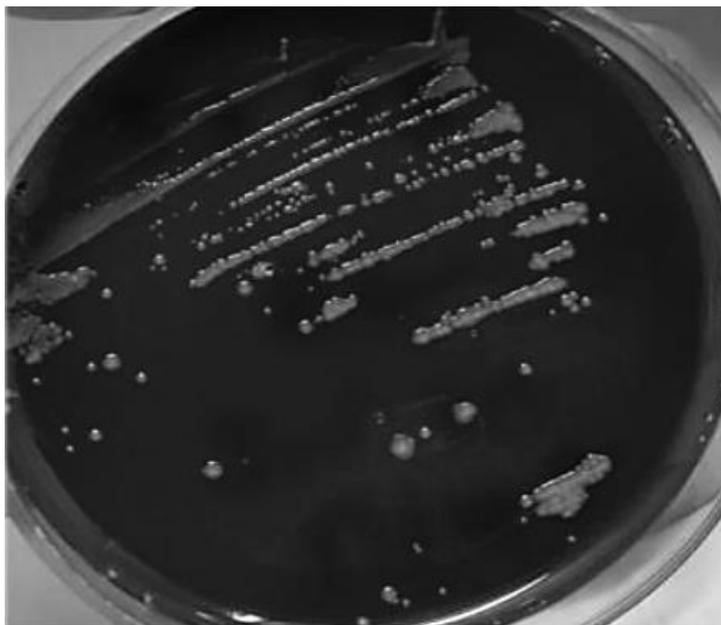


Figura 1 – Cultivo microbiológico de *Burkholderia mallei* em ágar base acrescido de 5% de sangue ovino. Colônias pequenas, mucoides, acinzentadas e não hemolíticas (CARVALHO, 2022).

A *Burkholderia mallei* é uma proteobactéria do grupo betaproteobactéria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae, gênero *Burkholderia*, espécie *Burkholderia mallei*. Desde a sua descoberta em 1862 onde os pesquisadores Loeffler e Schutz isolaram e conseguiram reproduzir a doença em animais, a *B. mallei* já foi classificada nove vezes: *Loefferella mallei* e *Pfeifferellamallei*, *Bacillus mallei*, *Malleomyces*, *Actinobacillus mallei*, *Corynebacterium mallei*, *Mycobacterium mallei* e *Pseudomonas mallei* (esta penúltima classificação baseada nas características e similaridades nutricionais e bioquímicas do gênero que a bactéria tem perante ao gênero *Pseudomonas*). Por fim, permanecendo no gênero *Burkholderia* com mais oitenta espécies, onde podemos destacar a *Burkholderia cepacia* - um fitopatógeno de raízes de cebolas, e a *Burkholderia pseudomallei* - agente causador da melioidose em humanos (DINIZ *et al.* 2008; ROCHA, 2018; SYED; WOOTEN, 2021; CARVALHO 2022).

O isolamento da *B. mallei* pode ser conduzido utilizando amostras de sangue ou secreções. Entretanto, não há disponível comercialmente um meio seletivo específico

para o cultivo dessa bactéria. É possível cultivá-la em meios que contenham sangue ou glicerol, como é o caso do ágar sangue e do MacConkey, por exemplo. A bactéria exibirá pleomorfismo nos meios de cultura, manifestando-se desde uma coloração amarelo-esbranquiçada até uma aparência viscosa-cremosa, dependendo do meio utilizado, conforme mencionado anteriormente (MOTA, 2006; ROCHA, 2018; SYED; WOOTEN, 2021).

A *Burkholderia mallei* é uma bactéria intracelular facultativa, bem adaptada ao seu hospedeiro principal, mas não resistindo muito tempo no ambiente. É sensível a luz solar, irradiação ultravioleta, calor e desinfetantes comuns como à base de iodo, permanganato de potássio, hipoclorito de sódio na concentração de 500 p.p.m., etanol a 70% e glutaraldeído a 2% (ROCHA, 2018).

De acordo com Syed; Wooten (2021), estudos genômicos revelam que a *B. mallei* é derivada de um clone da *B. pseudomallei*, havendo ao longo da evolução perda significativa de segmentos de DNA. Contudo, mesmo com essas alterações genômicas, a capacidade intrínseca de virulência da *B. mallei* permaneceu, especialmente relacionada à sua cápsula de lipopolissacarídeos (LPS). Essa cápsula desempenha funções vitais, como fornecer uma barreira de permeabilidade e modular a resposta imune do hospedeiro. Dois mecanismos patogênicos se mantiveram em ambas as espécies de *Burkholderia*: a formação de granulomas/piogranulomas e a capacidade de persistência intracelular.

### 3.2 EPIDEMIOLOGIA

O mormo é uma das mais antigas doenças conhecidas e registradas de equídeos, mencionada por Hipócrates e Aristóteles entre os séculos III e IV a.C. na região da África, Ásia e Oriente Médio. Atualmente a doença é erradicada nos Estados Unidos, países da Europa, Canadá e Austrália devido à adoção de medidas de obrigatoriedade de testes diagnósticos e sacrifício dos animais positivos. Entretanto ainda existe a ocorrência da doença no Brasil, Turquia, Iraque, Irã, Índia e Paquistão, sendo considerada enzoótica em alguns países do continente africano, asiático, da América Central e Sul (MORAES, 2011; ROCHA, 2018; SILVA, 2018).

Segundo Adhikari; Acharya; Wilson (2019) entre os anos de 2015 e 2018 houve um aumento significativo de casos positivos na Índia e no Nepal. Já segundo Nasiri *et al.* (2023), no Irã um caso de zoonose foi relatado no ano de 2023 enfatizando a necessidade de estudos, controle e erradicação da doença que persiste até os dias atuais.

No século XIX, a ilha de Marajó no Pará foi um importante local de importação de equinos vindos da cidade do Porto em Portugal e acredita-se que desta maneira o mormo tenha ingressado no país. Em 1896 foi registrado um surto em equídeos de tração, fato que culminaria com o primeiro relato de isolamento e identificação da *Burkholderia mallei* no Brasil. Entre 1908 e 1909 ocorreu uma epidemia acometendo homens do exército brasileiro e animais (FALCÃO; SILVA; MOTA, 2019).

Após a década de 1960 o mormo foi considerado erradicado do país, sendo os últimos registros de 1967 do Instituto Vital Brasil no Rio de Janeiro e 1968 na cidade de São Lourenço da Mata em Pernambuco, não ocorrendo mais registros oficiais da doença. Em 1999, trinta e um anos após o último caso positivo catalogado, equídeos do estado de Alagoas e região da Zona-da-Mata pernambucana testaram positivo reemergindo a doença no país e levantando o questionamento sobre o status sanitário da erradicação ou falta de notificação nesse período (FALCÃO; SILVA; MOTA, 2019).

São poucos os registros de mormo em seres humanos, não havendo relatos sobre predisposição, sexo ou idade. Os casos relatados mostram ser uma doença ocupacional de pessoas com contato direto com animais doentes ou suas secreções como no caso dos tratadores, médicos veterinários, funcionários de abatedouros e laboratoristas (MOTA, 2006; ROCHA, 2018).

Apesar de poucos relatos documentados Howe; Miller (1947) refere que achados de nódulos com características sugestivas de mormo durante autópsias em humanos que tinham grande contato com equinos sugerem que a prevalência de formas inaparentes da doença pode ser maior que o relatado no período.

O estudo epidemiológico sobre os casos de mormo em equídeos no estado do Paraná entre 2010 e 2019 revela uma lacuna significativa nas pesquisas relacionadas à *Burkholderia mallei* e à compreensão da doença entre alunos de Medicina Veterinária

e profissionais da área. Essa ausência dificulta a análise comparativa, uma vez que não há estudos semelhantes na literatura para embasar discussões mais aprofundadas sobre o assunto. A falta de pesquisa nesta área é particularmente preocupante, dada a importância do conhecimento público na prevenção de doenças zoonóticas. Portanto, é crucial realizar estudos que não apenas investiguem a epidemiologia da doença, mas também avaliem o nível de conscientização e entendimento sobre ela em diferentes setores da sociedade. Isso permitirá uma abordagem mais abrangente e eficaz no controle do mormo e de outras doenças associadas à *Burkholderia* sp.

### 3.3 TRANSMISSÃO

Moraes (2011) e Machado *et al.* (2013) descrevem que a via de excreção mais importante da bactéria é a via respiratória. A transmissão ocorre principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados pelas secreções nasais dos animais infectados, onde o patógeno pode invadir as mucosas oral, nasal, conjuntival e genital, assim como feridas na pele (RADOSTITS *et al.*, 2002; MEURER, 2021).

Animais carnívoros podem ser infectados através da ingestão de carcaça contaminada e pequenos ruminantes através do contato estreito e direto com equídeos infectados. A doença já foi relatada em caprinos, ovinos, camelídeos e carnívoros de zoológico alimentados com carne de cavalos com mormo (SOUZA, 2012; VERMA *et al.*, 2014; PORTO, 2020).

Em humanos a infecção tem caráter ocupacional e ocorre através do contato com material contaminado, inalação de aerossóis em ambientes altamente contaminados, contato com secreções do trato respiratório, infecções cutâneas de animais doentes e manipulação inadequada da bactéria em laboratório. A doença cursa com gravidade, com alta taxa de mortalidade de 90 a 95% dentro de três semanas se não iniciado tratamento com múltiplas terapias com antibióticos de ação sistêmica (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2020).

### 3.4 PATOGENIA

A *Burkholderia mallei* comumente penetra no organismo através das mucosas nasal, trato digestivo, soluções de continuidade na pele ou pela mucosa conjuntival. Ao penetrar no organismo a bactéria produz lesões na porta de entrada, especialmente faringe e septos nasais. A mucosa geralmente apresenta congestão e lesão primária granulomatosa ou formações nodulares que podem ulcerar, apresentando exsudato muco purulento com estrias de sangue (SOUZA, 2012; RADOSTITS *et al.*, 2002; SILVA, 2018).

Ao penetrar do sistema digestório, o patógeno atravessa a mucosa intestinal atingindo a corrente sanguínea e causando septicemia. Quanto à via aérea, os pulmões podem ser infectados tanto através da via hematogênica como através do sistema respiratório. No septo nasal ocorrem lesões de origem hematogênica ou secundária a um foco pulmonar. Nestes locais ocorrem um intenso processo inflamatório onde o patógeno é fagocitado por macrófagos, seguindo para o sistema linfático, atingindo os linfonodos e provocando inflamação. Sendo drenados até o ducto torácico, chegando na circulação e provocando pneumonia, ocorrendo assim a bacteremia cíclica (ROSSDALES, 2015; VIEIRA, 2016; SILVA, 2018).

Nos pulmões e em outros órgãos como fígado e baço, há presença de piogranulomas formados a partir da infiltração de neutrófilos, hemácias e fibrina, com área necrótica de leucócitos infiltrados no tecido de granulação. Em decorrência das áreas de inflamação proliferativa, localizadas no fígado e baço, hemorragias, petéquias e múltiplos abscessos podem ser observados nesses órgãos na necropsia. Pleurite fibrinosa com aderência e espessamento também podem ser observados (VIEIRA, 2016).

Os exames hematológicos dos animais positivos com sinais clínicos evidentes cursam com anemia do tipo normocítica normocrônica, relacionada à deficiência na eritropoiese devido aos processos infecciosos crônicos ou inflamatórios e às falhas na produção de hemácias por deficiência de ferro e vitaminas do complexo B. Quanto ao leucograma, é observada moderada leucocitose com neutrofilia, com aumento de bastonetes e neutrófilos segmentados. Eosinopenia e linfopenia também podem ser observadas (RADOSTITS *et al.*, 2002; MOTA, 2006).

O aspecto importante da patogênese da *B. mallei* é a capacidade de invadir e multiplicar-se dentro de células eucarióticas enganando a resposta imune do hospedeiro e a ação de antibióticos. Uma vez invadindo as células, a bactéria produz vacúolos e adentram no citoplasma onde se multiplicam atingindo células vizinhas através de ligações citoplasmáticas. O mecanismo intracelular é crucial para sua virulência (VIEIRA, 2016; SILVA, 2018).

### **3.5 RESPOSTA IMUNE**

Embora os mecanismos possam variar entre *Burkholderia* spp., a adesão e a invasão das células epiteliais do hospedeiro são etapas cruciais durante a infecção e contribuem para a virulência. Para uma infecção bem-sucedida das células hospedeiras, a *B. mallei* utiliza infinitos fatores de virulência, especialmente os relacionados a sua LPS e mecanismos para manipular os muitos processos e vias do sistema imune do hospedeiro (SAIKH; MOTT, 2017).

#### **3.5.1 RESPOSTA IMUNE INATA**

A imunidade inata proporciona a primeira linha de defesa contra patógenos, sendo a barreira física o primeiro componente deste tipo de imunidade. A pele e a mucosa epitelial conferem proteção física por impedirem a entrada de microrganismos, como também pelas substâncias químicas produzidas. Quando estas barreiras são violadas, a resposta imune continua através de outros componentes humorais e celulares (Figura 2). Na presença do patógeno, interagem entre si com a finalidade de eliminar o agente infeccioso promovendo a sua lise ou facilitando a fagocitose, e induzindo a resposta inflamatória (LOPES, 2012).

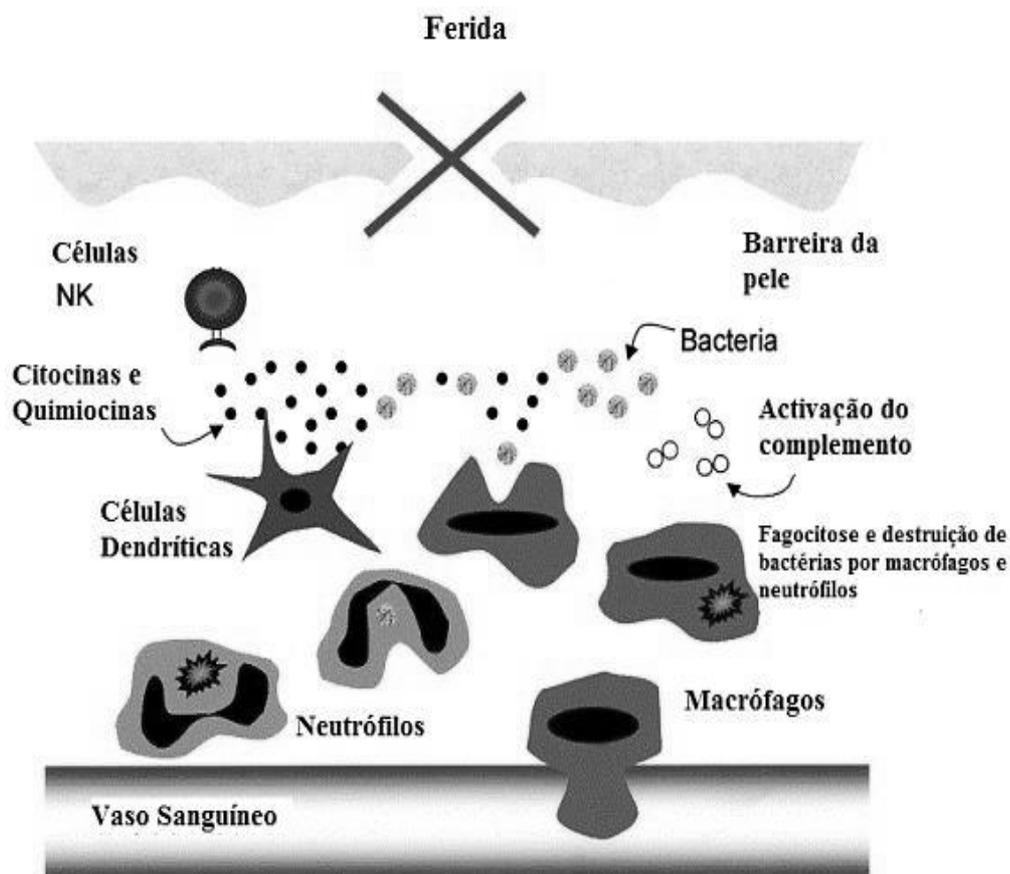


Figura 2 – Esquema ilustrativo da resposta imune inata com a barreira física da pele quebrada, as substâncias químicas produzidas para estimular a inflamação como citocinas e quimiocinas, o sistema do complemento e a fagocitose pelos neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DCs) (LOPES, 2012).

### 3.5.2 RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA

A imunidade adaptativa é mais específica que a imunidade inata. Este tipo de imunidade é composto por dois tipos de resposta: humoral e celular (Figura 3). A resposta humoral é mediada pelos anticorpos produzidos pelos linfócitos B, e tem como principal função combater agentes extracelulares e toxinas, neutralizando ou opsonizando-os. Já a resposta celular é mediada pelos linfócitos T. (SAIKH; MOTT, 2017).

Existem dois principais exemplos de linfócitos T: os linfócitos T citotóxicos (Tc) e os linfócitos T auxiliares. Os linfócitos Tc, também conhecidos como linfócitos T CD8<sup>+</sup> (pela expressão da molécula CD8 na sua superfície de membrana) reconhecem antígenos intracelulares, processam e apresentam à superfície da célula infectada, ligados a moléculas de proteína MHC de classe-I (MHC-I). As moléculas de MHC-I são expressas por todas as células nucleadas e quando os antígenos intracelulares são reconhecidos pelos linfócitos Tc, ocorrendo co-estimulação e ambiente citotóxico adequado estes linfócitos exercem a sua toxicidade autócrina, estimulando apoptose. Sendo assim, a resposta mais importante para patógenos intracelulares facultativos como a *Burkholderia mallei* (LOPES, 2012; SAIKH; MOTT, 2017; SYED; WOOTEN, 2021).

Já os linfócitos T auxiliares, também nomeados por T CD4<sup>+</sup> (pela expressão da molécula CD4 na sua superfície de membrana), reconhecem nas Células Apresentadoras de Antígenos (APC) o MHC-II dos antígenos que sofrem endocitose do meio extracelular. Estes linfócitos T CD4<sup>+</sup> quando ativados secretam diversas citocinas que podem ativar os linfócitos T CD4<sup>+</sup>Th1 que são essenciais na promoção da imunidade celular e linfócitos T CD4<sup>+</sup>Th2 importantes na estimulação da imunidade humoral com ativação dos linfócitos B e anticorpos (LOPES, 2012).

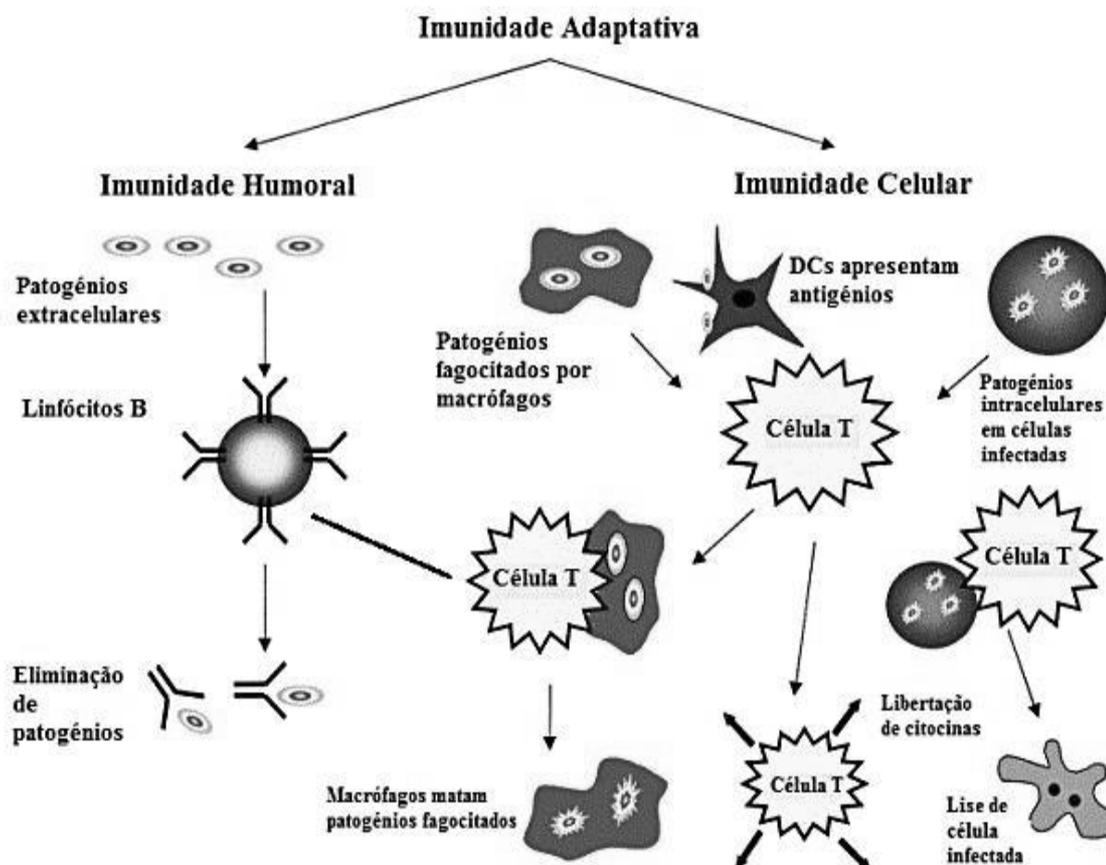


Figura 3 – Esquema ilustrativo dos vários componentes da resposta adaptativa - resposta humoral e celular. As subpopulações de células T não se encontram diferenciadas neste esquema (LOPES, 2012).

A aderência e invasão das células epiteliais do hospedeiro representam estágios cruciais durante a infecção e parecem contribuir para a virulência em geral. Segundo Saikh; Mott (2017) a *Burkholderia mallei* resiste intracelular por meio da modulação da resposta imune do hospedeiro, o que contribui para sua resiliência e ineficiência dos tratamentos atuais. Análises topológicas da bactéria sugere que tem como alvo proteínas intracelulares multifuncionais do hospedeiro: proteínas que interagem entre si e proteínas com um grande número de parceiros de interação. Os processos do hospedeiro inspirado por essas interações proteína-proteína incluem o sistema de degradação de ubiquitinação e as vias de adesão focal.

O lipopolissacarídeo (LPS) é um componente essencial da membrana externa das bactérias gram-negativas e desempenha um papel crucial como estimulador potente

das respostas imunes inatas do hospedeiro. Pesquisas sobre a relação estrutural-atividade revelam que a atividade biológica do LPS está associada à composição de sua fração lipídica A (SINGHA *et al.*, 2014; SAIKH; MOTT, 2017).

Pesquisas sobre a LPS da *B. mallei* mostrou que o lipídio A parece ter um ativador mais fraco de Células Apresentadoras de Antígeno como o macrófago e consequente significativa redução na expressão de interleucina 6 (IL-6), TNF $\alpha$  e interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) de linfócitos T CD4+Th1 (SYED; WOOTEN, 2021).

A evasão imunológica também ocorre por meio da mudança do LPS, indo da forma lisa para uma rugosa, causada pela perda do seu polissacarídeo O (OPS). Essas alterações estruturais acontecem durante a transição da fase aguda para a crônica ou subclínica da infecção, reduzindo a capacidade de estimular a resposta imune do hospedeiro. De maneira similar a *Burkholderia* sp. outra bactéria gram-negativa a *Pseudomonas aeruginosa* apresenta características semelhantes de evasão: evita a fagocitose através da produção de um exopolissacarídeo, adquirindo um aspecto mucoide, perda da OPS em infecções crônicas, além de abandonar a mobilidade conferida pelo flagelo monotríquico (LOPES, 2012; SAIKH; MOTT, 2017).

### 3.6 INTERAÇÃO BURKHOLDERIA E PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Ambas bactérias são patógenos oportunistas em humanos e responsáveis por infecções graves em ambientes hospitalares, como nos casos de pacientes com fibrose cística e pacientes imunocomprometidos, Análises da diversidade em *P. aeruginosa* revelaram a presença de ilhas genômicas altamente semelhantes a cepas de *Burkholderia* sp. Essa descoberta sugere uma troca frequente de material genético entre esses dois organismos (EBERL; TÜMMLER, 2004; WEAVER; KOLTER, 2004).

Provas bioquímicas e genéticas evidenciam que a ornibactina, um sideróforo produzido por quase todas as cepas de *Burkholderia cepacia* (comum nas infecções de pacientes com fibrose cística), pode induzir o desenvolvimento de *Pseudomonas aeruginosa*, sugerindo que a ornibactina produzida por *B. cepacia* é identificada pela *P. aeruginosa* quando as duas espécies coexistem (WEAVER; KOLTER, 2004).

A análise da diversidade em *P. aeruginosa* revelou a presença de ilhas genômicas contendo genes altamente semelhantes aos encontrados em cepas de *Burkholderia* sp. Esse achado sugere uma troca frequente de material genético entre os dois organismos (EBERL; TÜMMLER, 2004). Tais descobertas podem revelar o grau de similaridade fenotípica entre ambas as bactérias, o que poderia ampliar o estudo da etiopatogenia das infecções no hospedeiro bem como progredir em pesquisas diagnósticas.

### 3.7 SINAIS CLÍNICOS

Clinicamente o mormo afeta os sistemas respiratório e linfático, causando elevada mortalidade e morbidade, podendo apresentar-se de três formas distintas: nasal, pulmonar e cutânea, a depender da localização da lesão primária (VERMA *et al.*, 2014; PORTO, 2020; MEURER, 2021).

A enfermidade se desenvolve com dois cursos clínicos: um agudo, que comumente acomete os asininos e muares causando morte dentro de sete a dez dias, e outro crônico acometendo sobretudo os equinos que demonstram uma maior resistência ao aparecimento dos sinais clínicos da doença que segundo, o que, segundo Falcão; Silva; Mota (2019) tem relação com o melhor manejo e cuidados dos equinos em relação aos asininos e muares. Os animais podem apresentar uma ou as três formas dos sinais clínicos simultaneamente (VIEIRA, 2016; SILVA, 2018; CARVALHO 2022).

Silva (2018) descreve que geralmente os asininos e muares apresentam a forma aguda da infecção caracterizada com o aparecimento de febre alta, hiporexia, emagrecimento progressivo e ulceração do septo nasal com aparecimento inicial de descarga mucopurulenta podendo evoluir para hemorrágica e nódulos nas cavidades nasais. Os equinos também podem ser acometidos pela forma aguda da doença, porém devido aos cuidados mais intensos e melhor manejo de criação usualmente apresentam a forma crônica da doença, sendo observados presença de nódulos e descarga nasal inicialmente serosa evoluindo para mucopurulenta, linfadenopatia de linfonodos submandibulares. Os sinais clínicos mais observados são o corrimento

nasal com úlceras, febre, nódulos na pele com aparecimento de lesões cutâneas que posteriormente evoluem para úlceras.

A forma nasal é caracterizada pelo aparecimento inicial de secreção serosa unilateral, evoluindo para descarga mucopurulenta ou hemorrágica bilateral, com aparecimento de ulcerações e necrose na mucosa. As lesões no septo nasal iniciam com nódulos e evoluem para úlceras que cicatrizam em forma de estrela, considerado lesão sugestiva para mormo (SILVA *et al.*, 2009; ROSSDALES, 2015).

A forma cutânea apresenta pequenos nódulos superficiais no sistema linfático de consistência firme, podendo drenar secreção purulenta de cor amarelada. Essa organização das lesões cutâneas insinua um “colar de rosário”, também sugestivo para mormo (SILVA *et al.*, 2009; CARVALHO 2022).

A forma pulmonar pode aparecer inaparente por longos anos e quando ocorre o aparecimento dos sinais clínicos consistem em hipertermia, tosse, apatia e perda de peso. Em estágios mais avançados há dispneia com a presença de estertores pulmonares. Lesões pulmonares usualmente são oriundas de focos de pneumonia com aspecto branco acinzentado, bordos avermelhados, centro caseoso ou calcificado circundado por tecido fibroso. A forma pulmonar é a manifestação clínica mais importante em equinos com mormo, sendo caracterizada pela formação de nódulos encapsulados e firmes ao longo do tecido pulmonar (SILVA, 2018, CARVALHO 2022).

Em humanos o mormo se apresenta com aumento dos linfonodos, nódulos no trato respiratório, emagrecimento, dispnéia e abscessos subcutâneos. Pneumonia com broncopneumonia com ou sem bacteremia, abscessos pulmonares, efusão pleural, e empiema podem ocorrer. Na forma aguda há descarga nasal e lesões granulomatosas no pulmão e na forma crônica ulcerações na mucosa nasal e faringe. A forma crônica é associada a múltiplos abscessos subcutâneos e intramusculares, linfadenopatia e linfangite e a ocorrência de infecções secundárias (SILVA, 2018; SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2020).

### 3.8 DIAGNÓSTICOS

#### 3.8.1 CLÍNICO – EPIDEMIOLÓGICO

O diagnóstico clínico e bacteriológico do mormo é bastante difícil em estágios iniciais da doença, pois em quase 90% dos casos são inaparentes. Os sinais respiratórios como secreção nasal purulenta acompanhada ou não de estrias de sangue, dispnéia, úlceras na mucosa nasal, hipertrofia dos linfonodos submandibulares, nódulos fechados ou fistulados no trajeto dos vasos linfáticos em equídeos procedentes de regiões endêmicas, associados à alta letalidade em animais sem sucesso terapêutico, são fortes indicativos para a suspeita de mormo (MOTA, 2006).

O diagnóstico epidemiológico baseia-se na associação dos sinais clínicos com dados epidemiológicos como espécies susceptíveis, fatores de risco associados à doença - introdução de animais doentes no plantel, sistemas de criação e manejo higiênico-sanitário inadequado. Apesar de não ser uma doença sazonal, as maiores notificações ocorrem durante quando é necessário o atestado de sanidade animal para trânsito animal ou esporte (MOTA, 2006; CARVALHO, 2022).

#### 3.8.2 LABORATORIAL

O diagnóstico da *B. mallei* pode ser realizado através de investigação sorológica utilizando diversas metodologias como o teste de fixação do complemento (FC), hemaglutinação indireta (HAI), contraímunoeletroforese (CIEF), Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), Western Blotting (WB), Immunoblotting (IB), aglutinação, reação de aglutinação com antígeno corado por Rosa Bengala (RB) e outras técnicas ou modificações das técnicas conhecidas (MOTA, 2006; SILVA, 2014).

O MAPA através da Portaria Nº 22, de 16 de março de 2018 do Ministério, definiu o ELISA como teste de triagem oficial desde o ano de 2020. Desse modo, os laboratórios credenciados para realização do Fixação de Complemento (com a finalidade de trânsito internacional desde 2020), dispuseram de dois anos desde a data da publicação da Portaria para solicitar a alteração de escopo e autorização para a realização do ELISA (BRASIL, 2018).

Diferentes formatos de ELISA, incluindo ELISA direto, ELISA indireto, ELISA sanduiche ou ELISA de bloqueio ou competição já foram estudados para desenvolvimento diagnóstico, incluindo mormo (TELES, 2012; MEURER, 2021).

A técnica de ELISA, ou ensaio imunoenzimático, possui diferentes variantes que se adequam a diferentes propósitos. A ELISA direta consiste na utilização de um anticorpo de detecção primária, formando um complexo antígeno-anticorpo. Nessa abordagem, o anticorpo de detecção primária é marcado diretamente com uma enzima. Já a ELISA indireta, embora semelhante à ELISA direta, emprega um anticorpo secundário marcado, conferindo maior especificidade à detecção (Figura 4). Nesse caso, a presença de anticorpos é revelada através da formação da ligação antígeno-anticorpo, sendo detectada pela adição de um segundo anticorpo específico contra imunoglobulinas da espécie em questão. A intensidade da cor é estimada colorimetricamente é proporcional a concentração do anticorpo pesquisado (TELES, 2012; FRANCO *et al.*, 2021; PEREIRA FILHO, 2023).

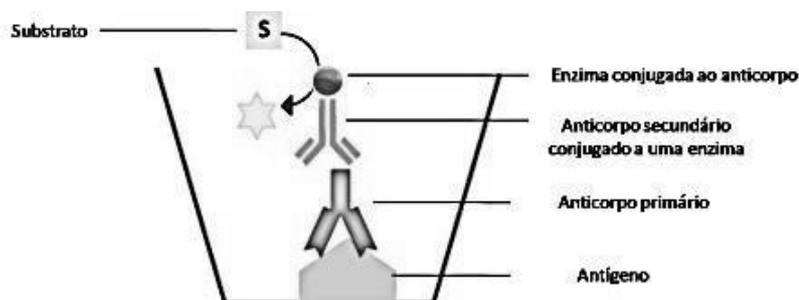


Figura 4 – Representação esquemática de ELISA indireto (PEREIRA FILHO, 2023).

Já ELISA sanduíche é realizada ancorando um antígeno a um suporte sólido, como a placa de ELISA, geralmente sensibilizada previamente. A formação antígeno-anticorpo é detectada pela adição de um segundo anticorpo direcionado contra as imunoglobulinas da espécie em análise. Outra abordagem é a ELISA de bloqueio ou competição, onde a presença de anticorpos em um determinado soro é revelada pela competição com um anticorpo específico (mono ou policlonal) direcionado ao antígeno. O resultado é obtido pela adição de um conjugado, e a coloração aparece nos locais onde não há presença de anticorpos. Essas variações na técnica de ELISA

oferecem flexibilidade para atender a diferentes requisitos experimentais e objetivos específicos (FRANCO *et al.*, 2021; PEREIRA FILHO, 2023).

A confirmação do diagnóstico da *Burkholderia mallei* ocorre pelo teste de Western-Blotting segundo regulamento do MAPA podendo também ocorrer através do isolamento e identificação do agente em amostras clínicas sendo considerado o teste padrão ouro. Devido ao baixo número de bactérias no tecido infectado, abscessos e conteúdo excretado, o cultivo em meios líquidos ou sólidos é frequentemente negativo, além de demandar tempo para um resultado conclusivo. Se o material é originário de animais com doença sem sinais clínicos ou em casos crônicos, o isolamento bacteriológico torna-se ainda mais difícil (SILVA, 2018).

A técnica de Western-Blotting (WB), também chamado de protein blotting ou immunoblotting, é uma ferramenta crucial na biologia molecular permitindo a detecção, caracterização e quantificação de várias proteínas, principalmente aqueles presentes em baixas quantidades da amostra. Essa técnica é baseada na formação de um complexo entre anticorpos e proteínas imobilizadas em uma membrana, seguida pela detecção do anticorpo ligado através de diferentes métodos. No contexto da detecção de anticorpos e proteínas de agentes infecciosos, o WB é altamente sensível e específico, destacando como padrão para identificar animais com infecções em estágio agudo e crônico incluindo os pacientes sem sinais clínicos (ROCHA, 2018).

A utilização de métodos moleculares para detectar *B. mallei* é recomendada em situações agudas e crônicas devido à sua capacidade de identificação rápida do agente. Esse tipo de diagnóstico é fundamental para diferenciar infecções provocadas por *B. pseudomallei*, oferecendo alta sensibilidade e não dependendo da viabilidade do agente para sua detecção. Neste cenário, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) destaca-se como uma ferramenta crucial na detecção de *B. mallei*, dada sua elevada sensibilidade e independência da viabilidade do agente para identificação (MEURER, 2021).

A maleína foi um teste comumente utilizado para o diagnóstico do mormo e consistia no uso de uma glicoproteína, extraída de culturas de *B. mallei*, como antígeno no teste intrapalpebral, subcutâneo ou oftálmico, porém sua limitação em termos de

sensibilidade e especificidade em animais que possuem sinais clínicos avançados são baixos. Além disso, a eficiência do teste está associada às estirpes de *Burkholderia mallei* utilizadas na preparação do composto podendo acarretar em reações inespecíficas. Reações cruzadas também foram notificadas após maleinização entre *B. mallei* e *Streptococcus equi*, resultando em reações falso-positivas (MOTA, 2006).

Atualmente, segundo a Instrução Normativa Nº 35, de 17 de abril de 2018, a maleinização intrapalpebral com o uso de Maleína PPD poderá ser empregada como teste complementar exclusivamente em equídeos com menos de seis meses de idade de éguas positivas e com sintomas compatíveis com o mormo, mediante autorização do DSA/SDA/MAPA.

O processamento de exames de *Burkholderia* sp. deve ser realizado em laboratórios que possuam o nível de biossegurança 3. Esse nível de biossegurança é essencial para garantir a segurança dos profissionais e a integridade das amostras, especialmente quando se trabalham com microrganismos que podem causar doenças graves ou potencialmente fatais, como é o caso da *Burkholderia mallei*. No entanto, é importante ressaltar que nem todos os laboratórios possuem essa infraestrutura, o que pode limitar o acesso a esses exames em algumas regiões. Nesse sentido, a busca por novos testes diagnósticos que possam ser realizados em laboratórios com níveis menores de biossegurança se torna fundamental para acelerar o processo de diagnóstico e ampliar o acesso aos exames, especialmente em áreas onde os recursos são limitados (SILVA, 2018).

Além disso, a investigação e o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico são essenciais para permitir uma detecção inicial rápida e eficiente, seguida de confirmação em laboratórios de biossegurança de nível adequado para o mormo. Nesse contexto, o uso de antígenos semelhantes a *Burkholderia mallei*, como a *Pseudomonas aeruginosa* surge como uma abordagem promissora. Segundo Eberl; Tümmler (2004) esses antígenos apresentam similaridade antigênica com a *B. mallei* e dessa baseado nesses dados investigou-se nessa pesquisa o desenvolvimento de testes mais acessíveis e confiáveis em níveis de sensibilidade e especificidade em laboratórios de biossegurança de nível 2 (NB-2). Portanto, investir em pesquisas que explorem essa abordagem pode representar um avanço significativo no controle e na prevenção de doenças causadas por microrganismos como a *B. mallei*.

### 3.9 MEDIDAS DE CONTROLE E PREVENÇÃO

A medida de controle e prevenção mais assertiva é o manejo adequado dos animais, com testagem periódica de todo plantel bem como a quarentena e testagem dos novos animais. O microorganismo é pouco resistente no ambiente sendo sensível a ação da luz solar, irradiação ultravioleta, calor e desinfetantes comuns como o permanganato de potássio e hipoclorito de sódio na concentração de 500 p.p.m. e etanol a 70%, dificilmente sobrevive em ambientes contaminados por mais de seis semanas e é destruído em 10 minutos a 55°C (RADOSTITS *et al.*, 2002; OIE, 2015).

Não há tratamento específico que elimine a bactéria do organismo animal e não há vacina eficiente que produza uma resposta imunológica satisfatória. Estudos recentes demonstram a susceptibilidade da *B. mallei* a antibióticos testados *in vitro*, porém não havendo sucesso na erradicação do agente do organismo dos animais quando desafiado em laboratório. Nos experimentos *in vivo*, o tratamento com antimicrobianos resultou em melhora do quadro clínico, com sobrevivência dos animais no período dos experimentos, porém sem eliminação total da bactéria (SILVA, 2018).

Um fator agravante para o desenvolvimento de vacinas eficazes é a capacidade da *Burkholderia mallei* de penetrar e permanecer viável intracelular em vacúolos de células eucarióticas, tornando-se inacessível a ação da resposta imune humoral, tornando crítica a resposta imune celular (PAL *et al.*, 2012; SINGHA *et al.*, 2014).

Não havendo nenhuma vacina eficaz contra a infecção pela *B. mallei*, a prevenção consiste no teste de rotina e sorologia periódica seguindo recomendações do MAPA. Recomenda-se a incineração ou enterro dos cadáveres no próprio local, desinfecção das instalações e fômites, sob supervisão do serviço veterinário oficial (SVO), interdição e sorologia da propriedade com foco comprovado da doença (BRASIL, 2018).

### 3.10 TRATAMENTO

A OMSA não recomenda o tratamento de animais afetados pelo mormo, pois eles podem se tornar portadores subclínicos, representando uma fonte de infecção para outros animais e também para os seres humanos (SOUZA, 2012).

Em seres humanos é verificada a eficácia da antibioticoterapia aprovada pela Food and Drug Administration (FDA) onde o inclui o protocolo misto de antibióticos com terapias intensivas intravenosas e de erradicação oral por muitas vezes de uso prolongado. O protocolo inclui imipenem e meropenem ou ceftazidima com ou sem trimetoprima/sulfametoxazol (TMP-SMX) e deve ser contínua por no mínimo 10 dias. O tempo da terapia oral depende da gravidade da doença e a antibioticoterapia oral com TMP-SMX com ou sem doxiciclina pode durar de 12 semanas a até 12 meses (MEURER, 2021).

Vale ressaltar o caso positivo de mormo em 2020 em um adolescente de 11 anos da periferia de Aracaju no estado de Sergipe, no qual possuía contato próximo com famílias que possuíam cavalos e apresentou a sintomatologia da doença como dor no tórax e falta de ar. O paciente apresentou piora clínica importante até confirmação da doença e ao final das doze semanas de tratamento, o paciente apresentou melhora clínica (SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2020).

Como relatado por Santos Júnior *et al.* (2020) o diagnóstico é difícil e basear-se somente na avaliação clínica não é adequado visto a doença causar uma vasta variedade de manifestações. O isolamento e identificação da *B. mallei* é laborioso, mesmo em abscessos agudos e as hemoculturas são frequentemente negativas até os estágios terminais da doença.

### 3.11 LEGISLAÇÃO

Complementando as estratégias que buscam a sanidade dos rebanhos, o MAPA através das suas atribuições instituiu por meio da Instrução Normativa nº 17, de 8 de maio de 2008 o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE) visando o fortalecimento do complexo agropecuário dos equídeos, por meio de ações de

vigilância e defesa sanitária animal. Cujo seu principal intuito é prevenir, diagnosticar, controlar e erradicar doenças que possam causar danos ao complexo agropecuário dos equídeos (BRASIL, 2008).

Compondo o referido Programa, o mormo é uma das doenças de notificação obrigatória para os equídeos, cuja IN N° 6, de 16 de janeiro de 2018 regulamenta e aprova as diretrizes gerais para prevenção, controle e erradicação do mormo no território nacional, no âmbito do PNSE. A Instrução resumidamente define como confirmar e descartar casos de mormo, esclarece acerca dos testes laboratoriais de triagem e confirmatório bem como sua validade, além da ação do Serviço Veterinário Oficial (SVO) diante de foco confirmado de mormo, incluindo interdição e desinterdição da (s) unidade (s) epidemiológica (s) e manutenção da condição sanitária nas zonas livres de mormo (BRASIL, 2018).

Em 30 de junho de 2023 a portaria do MAPA N° 593 retificou a Instrução Normativa N° 6 no qual ficou estabelecidos que o trânsito interestadual e participação em eventos de equídeos ficará condicionada à apresentação de guia oficial de trânsito animal e demais exigência (s) sanitária (s) observada a legislação específica, não sendo mais obrigatório o teste diagnóstico negativo para mormo. Atualmente somente aqueles equídeos com sinais clínicos ou patológicos compatíveis com mormo serão obrigados a testagem com testes sorológicos ou isolamento e identificação da *B. mallei*. Demais animais sem sinais clínicos passarão por avaliação clínica do Serviço Veterinário Oficial (SVO), sem necessidade de testagem de todo plantel (BRASIL, 2023).

Na esfera estadual, a Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB), responsável por promover e executar a defesa sanitária animal e vegetal, o controle e a inspeção de produtos de origem agropecuária regulamentou normas gerais para a emissão de Guia de Trânsito Animal (GTA) para o abate de equídeos no estado da Bahia, definiu procedimentos para o cadastramento, funcionamento e fiscalização das Propriedades de Triagem e Espera de Equídeos (PROTEA) e Propriedades Criadoras e Fornecedoras de Equídeos (PCFE) e outras providências, segundo a portaria N°. 13 de 16 de março de 2020 (ADAB, 2020).

No âmbito do abate para consumo e exportação da carne e subprodutos de equídeos o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal

(RIISPOA) do dia 19 de agosto de 2020 Art. 189 determina que carcaças e órgãos de animais evidenciando lesões associadas ao mormo devem ser considerados impróprios para consumo. O abate deve ser interrompido rapidamente e iniciada a higienização imediata a todos os locais, equipamentos e utensílios que possam ter entrado em contato com resíduos ou materiais potencialmente contaminados deve ocorrer assim que forem identificadas lesões durante a inspeção post mortem, em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo serviço oficial de saúde animal.

Devido ao potencial zoonótico, medidas de precaução devem ser adotadas para proteger os funcionários que tiveram contato com o material contaminado, além do encaminhamento para avaliação médica. Por fim, todas as carcaças ou partes das carcaças, incluindo peles, cascos, órgãos e seus conteúdos que estiveram em contato com animais ou materiais infecciosos, devem ser condenados (RIISPOA, 2020).

### **3.12 AGRONEGÓCIO DO CAVALO**

Segundo a Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo a tropa de equinos no Brasil até a data o ano de 2016 era superior a 5 milhões, contabilizando os cavalos de trabalho, raça, lazer e competição (BRASIL, 2016). Segundo o relatório do Censo Agropecuário e a Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) observa-se na figura abaixo o número efetivo do rebanho equino entre 2004 e 2022 (IBGE, 2022).

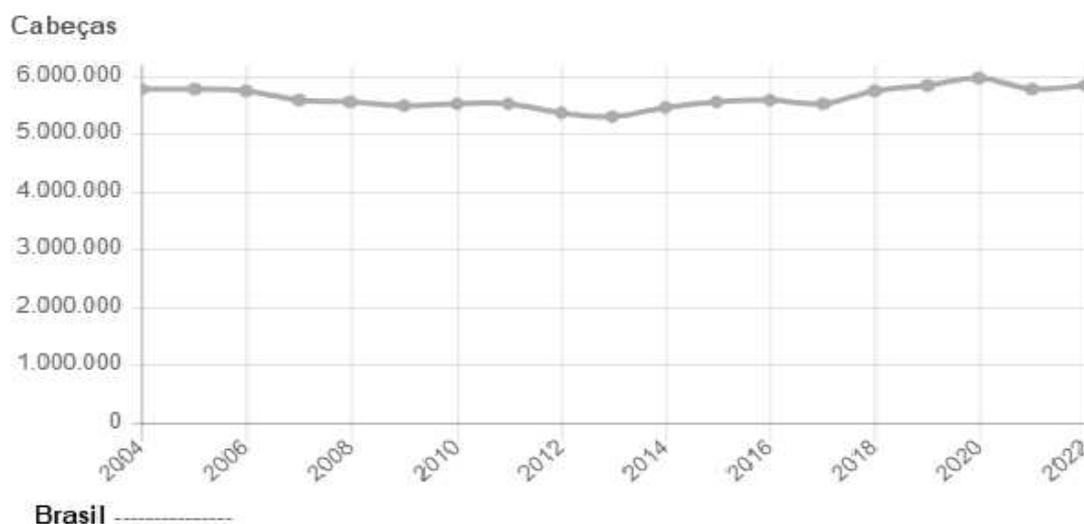
**Equino / Efetivo do rebanho ( Unidade: cabeças )**

Figura 5 – Brasil: número efetivo do rebanho equino entre 2004 e 2022 (IBGE, 2022).

Segundo dados do IBGE (2022) o Brasil é classificado como o quarto país em rebanho a nível mundial, atrás somente da China, México e Estados Unidos. Quanto à distribuição da tropa entre os anos de 2004 e 2013 nos estados brasileiros, observa-se na tabela 1 que o estado da Bahia ocupava a terceira posição no ranking nacional (BRASIL, 2016).

Tabela 1 – Brasil: Distribuição da tropa, anos 2004 e 2013.

UF	2004		2013		Variação 2004 a 2013
	Efetivo	%	Efetivo	%	
Brasil	5.787.250		5.363.185		-8,21%
Minas Gerais	859.974	14,86%	758.880	14,29%	-11,76%
Rio Grande do Sul	484.512	8,37%	535.299	10,08%	10,48%
Bahia	614.073	10,61%	485.356	9,14%	-20,96%
Goiás	442.818	7,65%	394.799	7,43%	-10,84%
São Paulo	500.177	8,64%	347.411	6,54%	-30,54%
Mato Grosso do Sul	366.399	6,33%	337.124	6,35%	-7,99%
Paraná	434.381	7,51%	312.626	5,89%	-28,03%
Pará	282.835	4,89%	284.437	5,35%	0,57%
Mato Grosso	311.598	5,38%	245.153	4,62%	-21,32%
Tocantins	156.150	2,70%	239.535	4,51%	53,40%
Maranhão	175.027	3,02%	175.575	3,31%	0,31%
Rondônia	146.683	2,53%	173.440	3,27%	18,24%
Ceará	139.102	2,40%	128.602	2,42%	-7,55%
Pernambuco	119.680	2,07%	128.027	2,41%	6,97%
Santa Catarina	128.343	2,22%	118.342	2,23%	-7,79%
Rio de Janeiro	105.827	1,83%	113.203	2,13%	6,97%
Piauí	150.866	2,61%	102.092	1,92%	-32,33%
Espírito Santo	72.956	1,26%	74.585	1,40%	2,23%
Sergipe	68.640	1,19%	67.922	1,28%	-1,05%
Acre	32.752	0,57%	64.871	1,22%	98,07%
Alagoas	52.686	0,91%	58.228	1,10%	10,52%
Rio Grande do Norte	40.338	0,70%	53.552	1,01%	32,76%
Paraíba	52.020	0,90%	46.262	0,87%	-11,07%
Roraima	27.800	0,48%	28.548	0,54%	2,69%
Distrito Federal	6.000	0,10%	17.162	0,32%	186,03%
Amazonas	11.907	0,21%	15.479	0,29%	30,00%
Amapá	3.706	0,06%	5.566	0,10%	50,19%

Fonte: BRASIL, 2016.

Os dados apresentados demonstram a robustez da cadeia produtiva do cavalo no Brasil, apesar da diminuição em alguns estados durante o período de 2004 a 2013.

Além disso, segundo Augustinho (2016) os setores de exportação de animais vivos, assim como os segmentos de couro e carne, também se destacaram.

### **3.13 ABATE DE EQUÍDEO: SITUAÇÃO ATUAL NO BRASIL**

O abate de equídeos no Brasil teve início em 1962 na cidade de Araguari, Minas Gerais, quando o país contava com 15 frigoríficos exportadores de carne equina. No entanto, ao longo do tempo, essa atividade entrou em declínio gradualmente, e atualmente no estado da Bahia apenas 3 frigoríficos estão em operação. A carne equina é destinada quase que exclusivamente à exportação, sendo os principais destinos a China e a União Europeia (UE), com destaque para países como Bélgica, França e Itália. O abate é obrigatoriamente regido pelo Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) (SILVA *et al.*, 2009; CAMPOS, *et al.*, 2010; AUGUSTINHO, 2016).

O consumo de carne de equídeos no mercado interno enfrenta alguns obstáculos devido a fatores como os hábitos alimentares, características sensoriais distintas e bem diferentes dos cortes bovinos e suínos, que são mais consumidos nacionalmente e culturalmente aceitos. Além disso, há um vínculo emocional das pessoas com os cavalos, o que também influencia na aceitação da carne equina como alimento (AUGUSTINHO, 2016).

### **3.14 ABATE DE ASININOS NA BAHIA**

Além do consumo de carne de equídeos, outro subproduto de grande interesse no mercado internacional, especialmente na China, é o *ejiao*, que consiste de colágeno extraído do couro de jumentos. Apesar de supostamente possuir propriedades medicinais, essas alegações ainda não foram cientificamente comprovadas, mas o *ejiao* é amplamente utilizado na medicina tradicional chinesa. No mercado chinês, os colágenos extraídos dessas peles chegam a valer US\$4.000 enquanto em países como Vietnã e Hong Kong, os preços de mercado são bem menores (MEDEIRO, 2023).

A discussão surge em decorrência da atividade apresentar características predatórias, extrativistas e finitas. De acordo com Tatemoto; Lima (2020), a China experimentou uma queda acentuada na população de jumentos em seu território. Enquanto nos anos 2000 o país possuía cerca de 9 milhões de animais, em 2016 esse número foi reduzido para apenas 2 milhões de asininos. No início do século XXI estima que a produção anual de *ejiao* era de 1,2 toneladas, e em 2016 esse número aumentou para 5 toneladas, o que projeta cerca de 5 milhões de peles por ano para a produção. Entretanto em 2017 o estoque interno já não era mais capaz de suprir a demanda.

Para atender o consumo interno, a China começou a explorar mais ativamente outros países da Ásia e da África causando o declínio da população de jumentos como a exemplo do Quirguistão, que perdeu 57% de seu rebanho desde 2017. Países como Mali, Gana e Etiópia recentemente proibiram o abate de jumentos, embora ainda ocorra de maneira clandestina. A exploração então chegou a países da América Latina como México, Peru e Brasil. No Brasil, os jumentos são comercializados a valores irrisórios no sertão nordestino e repassados para entrepostos ou atravessadores (MACHADO, 2022).

De acordo com Augustinho (2016), dados oficiais do IBGE de 2011 indicaram uma população de 974.688 jumentos no Brasil nesse ano, com uma redução para 376.874 jumentos em 2017, sendo a maioria localizada no Nordeste. Isso representa uma queda de 38% em seis anos. Por outro lado, segundo dados coletados por Tatemoto e Lima (2020) da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO), de 2008 a 2018, a redução foi de 28%. Embora haja divergências entre as duas referências, é notória a redução da população de jumentos no país.

Até o ano de 2022, o estado da Bahia possuía três frigoríficos para abate de equinos: Cabra Forte em Simões Filho, Frinordeste em Amargosa e o frigorífico Sudoeste na cidade de Itapetinga, que são liberados para abate e exportação de equinos e asininos. Os principais países para exportação desse material são a China, Hong Kong e União Europeia para consumo humano e alimentação animal (MACHADO, 2022).

A Figura 6 representa o fluxo de produção da cadeia de abate e exportação de jumentos no Nordeste, desde os possíveis locais de origem até o abate nos frigoríficos credenciados.



Figura 6 – Fluxo de produção da cadeia de abate e exportação de jumentos no Nordeste (MEDEIRO, 2023).

### 3.15 SITUAÇÃO ECONÔMICA NA BAHIA

Desde o ano de 2016 o Brasil exporta peles de jumento para China, recolhendo os animais na região da caatinga e zonas rurais do Nordeste como nos estados do Piauí, Ceará e Rio Grande do Norte por um valor insignificante. Sem a existência de uma cadeia de produção que renove o rebanho nacional, o abate sem controle está levando a uma vertiginosa queda no número de animais e colocando em risco a existência da espécie (TATEMOTO; LIMA, 2020).

No contexto econômico, cidades localizadas no centro-sul do estado da Bahia passaram a depender do abate de jumentos como fonte de sustento. Desde 2017, Amargosa destacou-se como o município com o maior número de abates de asininos no país. De acordo com o prefeito da cidade, a partir de 2021, o frigorífico desempenhou um papel fundamental na geração de renda e empregos diretos,

especialmente durante a pandemia do Coronavírus-2019, sendo responsável pelo sustento de várias famílias na região (MACHADO; LIMA, 2021; MEDEIRO, 2023).

Essa realidade é questionável, pois o crescimento do setor ocorre paralelamente ao aumento da fome e da pobreza na região, além de relatos de trabalho análogo à escravidão e denúncias de maus-tratos a animais. Os animais são capturados ou adquiridos em toda a região nordeste, vítimas de transporte cruel e ilegal, pois muitas vezes ocorrem sem a devida Guia de Trânsito Animal (GTA). Posteriormente, são transferidas para as Propriedades de Triagem e Espera Equídea (PROTEA) autorizadas pela portaria da ADAB Nº. 13 de 16 de março de 2020. Em muitos casos, essas propriedades não suprem a estrutura adequada para fornecer água, alimentação e assistência veterinária aos animais, configurando maus-tratos. Em 2019, centenas de jumentos foram encontrados em situação de abandono e maus-tratos nas cidades de Itapetinga e Canudos, na Bahia. Estima-se que em Canudos, cerca de 200 dos aproximadamente mil asininos encontrados tenham morrido por inanição, enquanto o restante estava extremamente debilitado (TATEMOTO; LIMA, 2020).

De acordo com Machado; Lima (2021), em Canudos foram localizados dois imigrantes chineses encarregados de cuidar de rebanhos em uma possível PROTEA. Esses trabalhadores encontravam-se em condições precárias, sem receber salário, passando fome e sem acesso a instalações sanitárias. O relatório policial indicou ocorrência de trabalho análogo à escravidão, porém nunca mais foram avistados na região de Canudos.

Não existem diretrizes específicas sobre o bem-estar de jumentos pela OIE ou Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. O MAPA elaborou o “Manual de Boas Práticas de Manejo em Equideocultura” que é específico para equinos, porém cita que as referências apresentadas para cavalos podem ser aplicadas a outros equídeos como os jumentos, mulas e pôneis (BRASIL, 2017).

Observa-se que por muitas vezes desde a apreensão dos jumentos ao abate existem inadequações graves ao bem-estar animal, não respeitando as cinco liberdades básicas: livre de sede e fome, dor, sofrimento, estresse e doenças (TATEMOTO; LIMA, 2020).

### 3.16 ETAPAS DO ABATE

No abate de equídeos, o método físico pode ser realizado através da utilização de uma pistola de insensibilização por ar comprimido, conhecida como percussiva não penetrativa, ou por meio do dardo cativo, que é percussiva penetrativa, sendo comumente empregado em frigoríficos. A pistola deve possuir força adequada para penetrar os crânios e sua posição ideal é alcançada acima da interseção das duas linhas imaginárias traçadas entre a base das orelhas e os olhos contralaterais (região da frente) (CONCEA, 2015; AUGUSTINHO, 2016).

Em caso de dúvida, deve-se insensibilizar novamente o animal. Logo após a insensibilização é necessário causar a morte, que no processo de abate é a sangria seguido da esfolagem mecânica. O tempo entre a insensibilização e o procedimento de eutanásia deve ser breve o suficiente para evitar o retorno da consciência do animal (CONCEA, 2015).

Qualquer erro em uma ou mais etapas podem gerar perda parcial de consciência e possível dor no animal. Ao ser usada o método com pistola, ocorrem colapso e espasmos musculares, tornando o procedimento visualmente desagradável. Machado; Lima (2021) menciona um relato de um funcionário do frigorífico na cidade de Amargosa, Bahia, que faz uma comparação entre o processo de abate de equídeos e o ato de “matar um cachorro, um animal de estimação”. Além do vínculo social, cultural e afetivo, a forma da morte pode ser impactante ao executante.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. PARA O ESTUDO DO ENSAIO INDIRETO

O experimento foi realizado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), no Hospital Universitário de Medicina Veterinária (HUMV), Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), localizado no município de Cruz das Almas – Bahia (12°39'35.755"S 39°5'26.023"W). As amostras de soros negativas utilizadas foram adquiridas através de banco de soro sanguíneo de equídeos negativas para AIE e sem relato clínico de síndrome respiratórias ou outras patologias no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2013, oriundos da região de Bom Jesus da Lapa na Bahia.

As vinte amostras de soro positivas foram obtidas por doação com compromisso ético e científico por um laboratório privado que realiza sorologia oficial para mormo com o teste de ELISA indireto recomendado pelo MAPA. As alíquotas foram fornecidas sem identificação por se tratar de uma doença de notificação e necessidade de manutenção do sigilo pelo o laboratório que oferece o serviço. Os animais apresentaram sinais clínicos respiratórios, emagrecimento, febre alta, hiporexia, emagrecimento progressivo e ulceração do septo nasal com aparecimento inicial de descarga mucopurulenta, linfadenopatia de linfonodos submandibulares e alguns animais apresentaram sinais clínicos como lesões no septo nasal que evoluíram para úlceras que cicatrizam em formato de “estrela”, considerado lesão sugestiva para mormo.

### 4.2. PRODUÇÃO DO ANTIGENO

A *B. mallei* apresenta riscos significativos para a saúde humana e animal, uma vez que pode afetar diversos organismos, incluindo seres humanos. Em virtude desse potencial patogênico, a manipulação de agentes causadores de certas doenças, como os associados a *Burkholderia* sp., é permitida apenas em laboratórios de nível de segurança 3 (NB-3) (SILVA, 2018).

No entanto, o Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (LDI-HUMV) não atende a essa classificação, o que impõe limitações à utilização da *Burkholderia* sp. em projetos de pesquisa.

Através da revisão bibliográfica, foi possível constatar similaridades nutricionais, bioquímicas, capacidade de evasão a resposta imune adaptativa e interação patógeno-hospedeiro entre *B. mallei* e outros organismos como a *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, análises bioquímicas e genéticas forneceram provas concretas dessa interação (WEAVER; KOLTER, 2004; SYED; WOOTEN, 2021;). Com base nesses achados, foi desenvolvido o antígeno para a standardização do ELISA indireto para *Burkholderia mallei* utilizando *Pseudomonas aeruginosa* como bactéria para a produção do antígeno.

#### **4.2.1. EXPANSÃO BACTERIANA - *Pseudomonas aeruginosa***

Encontrava-se no acervo interno do laboratório um cultivo de *P. aeruginosa* em placa de Petri cultivado meio ágar nutriente. Para crescimento bacteriano, com o uso de alça de platina e bico de Bunsen, amostras das colônias foram alocadas em tubo de 15 ml contendo meio ágar BHI (Brain Heart Infusion Broth) sendo posteriormente alocados em estufa a 37 °C, para crescimento subsequente das colônias.

Para extração de quantidade considerável de massa bacteriana, após 48 horas de crescimento o conteúdo total foi transferido para erlenmeyer com aproximadamente 500 ml de caldo BHI para expansão de *P. aeruginosa*. O preparo do meio BHI seguiu-se o recomendado pelo fabricante, utilizando as medidas proporcionais de 18,5g de BHI diluído em 500 ml de água destilada. Posteriormente distribuído no erlenmeyer e vedada com uso de capuchão e esterilizado em autoclave.

#### **4.2.2. OBTENÇÃO DO ANTÍGENO**

Após 48 horas em estufa a 37 °C, o conteúdo bacteriano expandido em meio BHI foi distribuído em seis tubos de 15 ml com cerca de 12 ml da solução bacteriana com auxílio de pipeta de vidro de 20 ml e micropipetador de 100 ml.

Os tubos foram colocados em centrífuga a 3.000 rotações por minuto (RPM), durante uma hora, dividido em dois intervalos de 30 minutos, visando separar a massa bacteriana do sobrenadante que foi então desprezado.

Para maior purificação do antígeno, foi realizada a lavagem da massa resultante da centrifugação. Com seis tubos do tipo Falcon separados e utilizando pipeta e ponteira, adicionaram-se 500 µL de solução salina no primeiro tubo. Em seguida, todo conteúdo foi realocado no segundo tubo e homogeneizado aspirando e dispensando o líquido através da pipetagem, a fim de total diluição do conteúdo bacteriano. Essa sequência foi realizada até o sexto tubo que ao final completou-se o tubo com solução salina até o volume de 10 ml. O sexto e último tubo foi novamente centrifugado com a mesma rotação e tempo anterior, desprezando novamente o sobrenadante e ressuspensando o conteúdo com solução salina até o volume de 12 ml e armazenado em freezer.

Com intuito de inativação bacteriana, visto o grau de patogenicidade e posterior dialise, o tubo remanescente do processo de lavagem foi colocado em banho-maria a 60 ° C por três horas, homogeneizando por agitação manual a cada trinta minutos. Em seguida, foi transferido para o congelador, onde permaneceu por 24 horas. Esse procedimento em banho-maria e congelamento foi repetido por três dias consecutivos. Ao final do terceiro dia, o sobrenadante foi acondicionado e a massa bacteriana descartada.

#### **4.2.3. DIÁLISE**

Ponteiras, Becker de 25 ml, suporte, pipeta de vidro de 10 ml, barbante, luvas de procedimento e membrana de diálise de 10 micrômetros foram esterilizados em fluxo laminar com luz UV por 10 minutos. A membrana foi cuidadosamente acondicionada no Becker de 25 ml e preenchida com todo último sobrenadante da etapa anterior, sendo amarrado com o barbante.

O saco resultante foi amarrado a uma pipeta de vidro e mergulhada em um Becker de 1000 ml preenchido com PBS, dentro do qual foi inserida uma barra magnética, e todo o conjunto foi posicionado sobre um agitador magnético (Figura 7). O conteúdo PBS foi trocado a cada 12 horas durante três dias; ao final do terceiro dia, o líquido restante na membrana foi armazenado em seis tubos eppendorf resultando no antígeno dialisado.



Figura 7 – Diálise do antígeno em meio PBS (arquivo pessoal).

#### 4.3. PROTOCOLO DO ELISA INDIRETO

Na fase inicial, realizou-se diluições do antígeno para identificar a titulação mais adequada na padronização do ELISA indireto. Para sensibilização da placa de poliestireno de 96 poços com alta capacidade de adsorção foi preparada uma solução de 1 ml de carbonato-bicarbonato em 9 ml de água destilada.

Foram utilizados 50 e 100  $\mu\text{L}$  por poço, contendo diluições do antígeno de 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200, conforme detalhado na tabela 2. Após 24 horas de incubação em câmara úmida na geladeira, os poços foram lavados duas vezes com PBS-Tween (PBS-T).

Tabela 2 – Mapa referente a padronização para titulação do teste ELISA indireto no diagnóstico de *Burkholderia mallei*.

	1:100		1:200		1:400		1:800		1:1600		1:3200	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Branco 50 µL	Branco 100 µL										
<b>B</b>	Branco 50 µL	Branco 100 µL										
<b>C</b>	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL										
<b>D</b>	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL										
<b>E</b>	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL										
<b>F</b>	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL										
<b>G</b>	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL										
<b>H</b>	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL										

FONTE: Arquivo pessoal.

A etapa de bloqueio das reações (Figura 8) foi realizada adicionando 200 µL por poço da solução de PBS-T contendo 1 grama de leite em pó desnatado (LPD), seguida de incubação por 2 horas a 37°C em câmara úmida na estufa. Em seguida a placa foi lavada uma vez com PBS-T e armazenada na câmara úmida em geladeira.

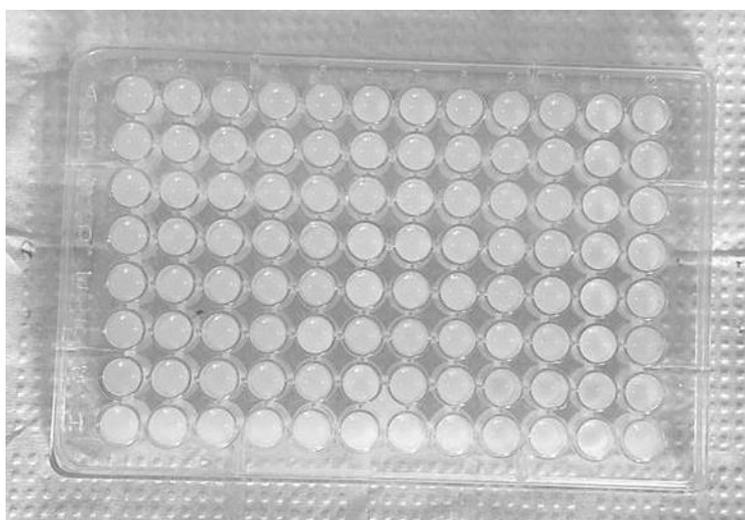


Figura 8 – Bloqueio das reações em placa de ELISA com PBS+LPD (Arquivo pessoal).

Para diluição dos soros positivo e negativo utilizou-se 0,1 gramas de LPD a 2%, 5 ml de PBS-T com 12 µL da alíquota positiva e negativa separadamente. Desta solução,

50  $\mu\text{L}$  foram preenchidos nos poços ímpares e 100  $\mu\text{L}$  foram preenchidos nos poços pares. Os poços marcados como branco foram preenchidos apenas com a solução PBS-T+LPD. A placa foi incubada em câmara úmida e, em seguida, transferida para uma estufa a 37 °C por 1 hora e 30 minutos. Na fase posterior, 50  $\mu\text{L}$  de conjugado foi distribuído em todos os poços e novamente inserido em câmara úmida e incubada na estufa por uma hora a 37 °C.

Ao fim do tempo acrescentou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução reveladora (4,16 gramas de OPD + 10 ml de tampão cítrico + 60  $\mu\text{L}$  de água oxigenada a 30%) em todos os poços da placa. Após duas horas a reação foi interrompida com 25  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Figura 9). A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em leitor de microplacas com filtro ajustado.

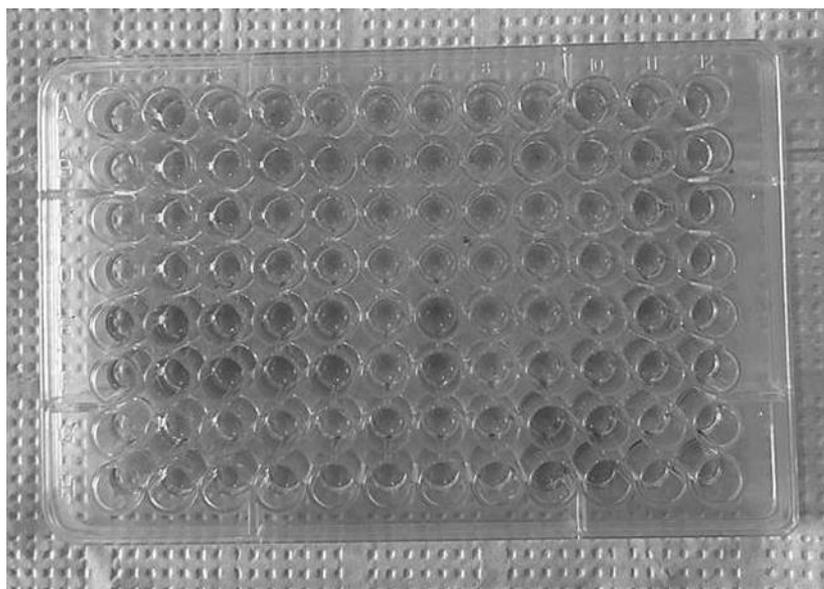


Figura 9 – Imagem da placa de padronização do ELISA (Arquivo pessoal).

Posteriormente, foi realizado a testagem dos soros comprovadamente positivos (20 amostras) e comprovadamente negativos (44 amostras) com 12  $\mu\text{L}$  do Ag na diluição de 1:200 que melhor escala de colorimetria na placa de padronização. Todas as etapas anteriormente descritas foram então realizadas em ambas as placas negativas e positivas desde a etapa de sensibilização até a revelação e leitura da DO. Para

melhor compreensão, a figura 10 representa esquematicamente a realização do ELISA indireto desde a etapa de sensibilização até leitura da placa.

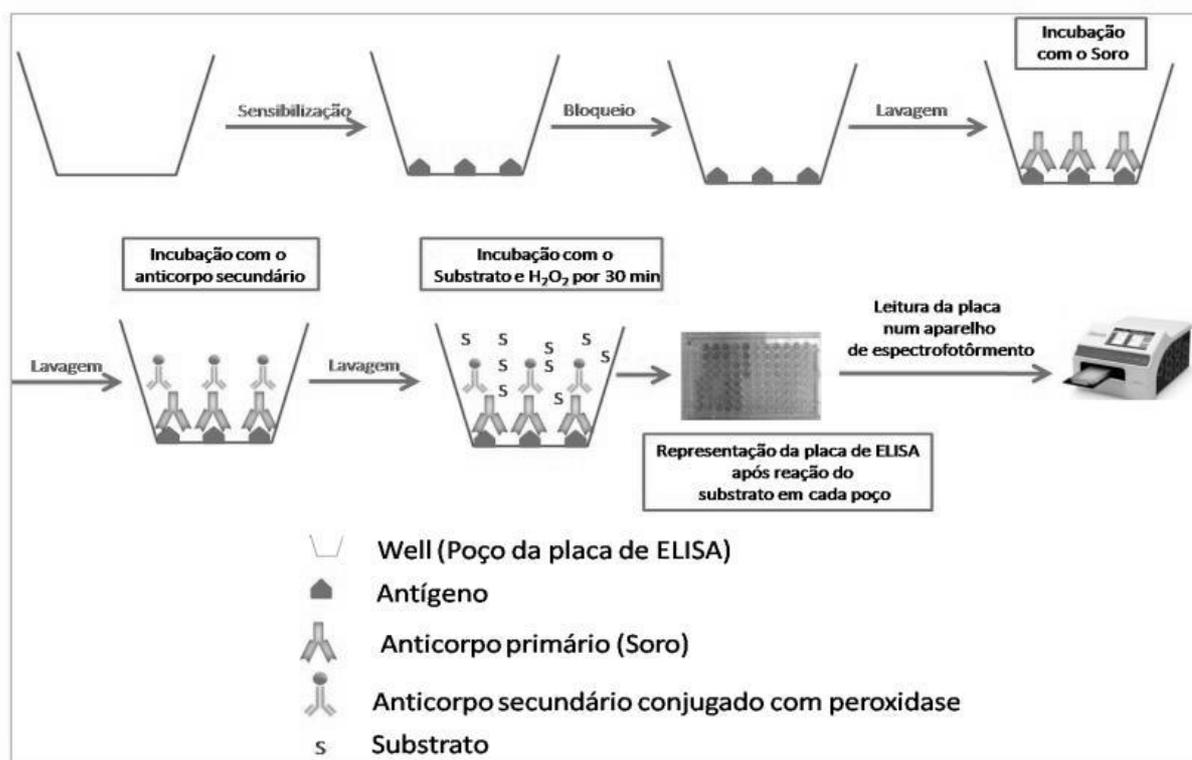


Figura 10 – Representação esquemática de ELISA utilizando soro de paciente para pesquisa de anticorpos para uma determinada doença (FILHO, 2023).

#### 4.4. ESTUDO DA SENSIBILIDADE, ESPECIFICIDADE, VALOR PREDITIVO NEGATIVO E VALOR PREDITIVO POSITIVO - DETERMINAÇÃO DO CUT-OFF

Os testes estatísticos foram conduzidos conforme as diretrizes de Soares *et al.* (2012), contemplando a análise de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. A sensibilidade, expressando a probabilidade dos indivíduos doentes testarem positivo, foi calculada como  $a/(a+c)$ . A especificidade, representando a probabilidade dos indivíduos não doentes testarem negativo, foi

calculada como  $d/(b+d)$ . Ambos os valores de sensibilidade e especificidade são em porcentagem.

O valor preditivo positivo, indicando a probabilidade da presença da doença quando o teste é positivo, foi calculado como  $a/(a+b)$ , enquanto o valor preditivo negativo, refletindo a probabilidade da ausência da doença quando o teste é negativo, foi calculado como  $d/(c+d)$ . A tabela 3 a seguir facilita a compreensão desses conceitos.

Tabela 3 – Esquematização dos cálculos de sensibilidade e especificidade.

Condição do animal	Doente	Não-doente	Total
Positivo	A	B	A+B
Negativo	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D(N)

FONTE: Soares *et al.*, 2012.

O cut-off foi determinado através do cálculo da média de animais não reagente acrescido de quatro vezes o desvio padrão populacional.

#### 4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises das placas de titulação das amostras positivas e negativas foram efetuadas no Excel®, através dos valores obtidos pela avaliação da densidade ótica e aplicação de fórmulas.

#### **4.6. PARA O ESTUDO DO QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO**

O experimento foi adaptado para aplicação em formato eletrônico para maior alcance de médicos veterinários no país que atuam com equinos sobre o mormo. O levantamento sobre o conhecimento a respeito do mormo por médicos veterinários atuantes na área da medicina equina foi realizado através de aplicação de questionário eletrônico. As perguntas realizadas basearam-se em dados oficiais disponibilizados pelas agências estaduais e federais, como Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Agência de Defesa Agropecuária da Bahia (ADAB).

Os dados resultantes foram registrados em uma planilha Excel<sup>®</sup> e realizada uma análise descritiva para as variáveis categorizadas referente a profissionais, região onde pertencem, área de atuação, além das perguntas sobre conhecimento do mormo, totalizando dezoito perguntas. As respostas foram então analisadas para avaliar o conhecimento sobre a doença.

#### **4.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**

Este estudo enquadrou-se no modelo de delineamento denominado pesquisa de levantamento. Caracteriza-se pela investigação direta com pessoas através de aplicação de questionário eletrônico, divulgado por e-mail, redes sociais (Instagram<sup>®</sup> e Facebook<sup>®</sup>) e aplicativo de mensagem instantânea (Whatsapp<sup>®</sup> e Telegram<sup>®</sup>).

O questionário desenvolvido consistiu em dezoito perguntas, abordando uma variedade de detalhes, que incluiu desde informações sobre a localização e o tempo de experiência profissional até a rotina de atendimento e conhecimento sobre o mormo. As perguntas foram elaboradas de forma diversificada, incluindo questões abertas, fechadas e de múltipla escolha. Além disso, para garantir a ética e a confidencialidade dos dados obtidos, foi solicitado o consentimento dos participantes para a utilização e divulgação das informações obtidas.

#### **4.8. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O estudo foi executado mediante a autorização dos participantes através da aquiescência do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), garantindo e se comprometendo com o sigilo e a confidencialidade de todas as informações fornecidas. Da mesma forma, o tratamento dos dados coletados seguirá as determinações da Lei Geral de Proteção de Dados (LGPD – Lei 13.709/18).

#### **4.9. LOCAL**

A aplicação do questionário ocorreu de maneira simultânea e virtual por meio de correio, mensagens eletrônicas e redes sociais, através do Google Forms® e as respostas salvas no Google Drive.

#### **4.10. AVALIAÇÃO QUALITATIVA**

Através da análise de conteúdo, os resultados foram apresentados em gráficos e elucidado nos resultados e discussão da pesquisa.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 COM RELAÇÃO A PADRONIZAÇÃO AO ELISA INDIRETO

Após realizar os ensaios e titular o antígeno, constatou-se o melhor resultado em uma diluição de 1:200 com intensidade da cor na estimada colorimétrica (Figura 11), utilizando 100  $\mu$ L por poço. No entanto, notou-se uma alteração na coloração dos soros teste na diluição 1:1600, possivelmente associada ao processo manual de lavagem ou a possível positividade na amostra. A definição dos critérios se deu considerando a coloração obtida e os valores de densidade ótica, sugerindo a viabilidade do uso do antígeno na realização de testes de ELISA indireto para detecção de *Burkholderia mallei*.

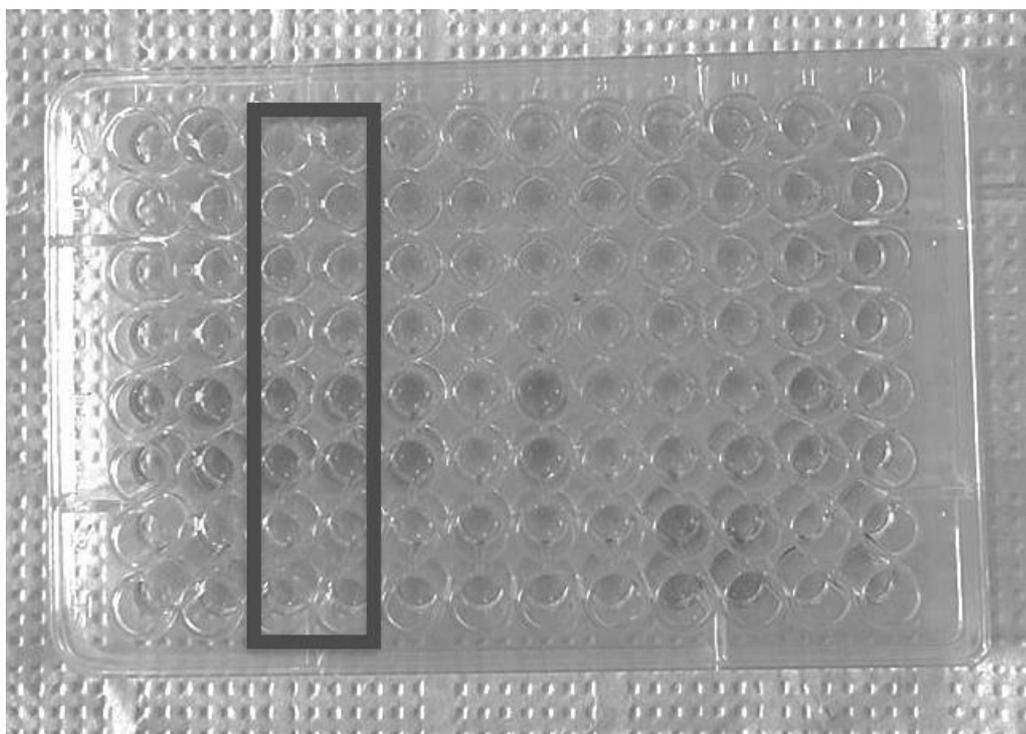
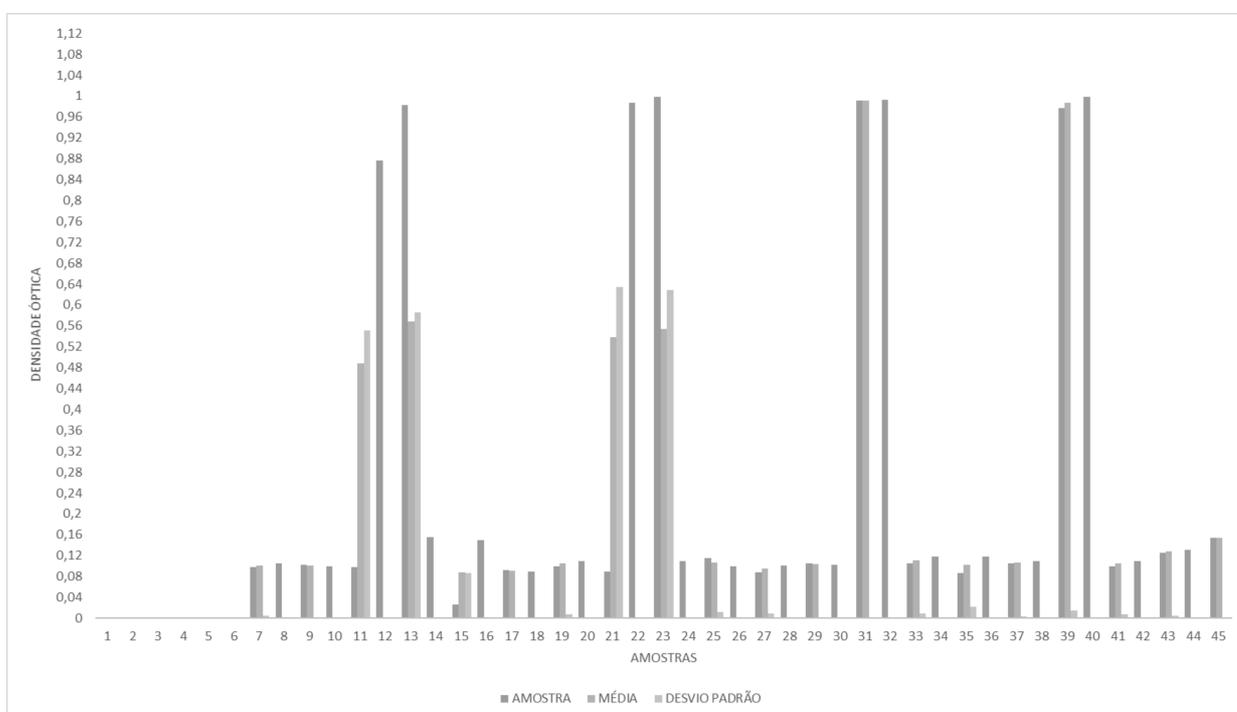


Figura 11 – Gradiente de cor referente ao resultado obtido do ELISA indireto para a titulação do antígeno (Arquivo pessoal).

Relativo a placa para padronização para titulação antigênica, obteve-se média geral entre as amostras de 0,273, Desvio Padrão (DP) de 0,058 e Coeficiente de Variação (CV) de 21%. No gráfico 1 podemos observar os valores médios de cada amostra analisada com seus respectivos DP. As amostras de número 1 ao 6 correspondem aos poços correspondentes as amostras positivas, negativas e branco e por isso não são contabilizados no gráfico 1.

Gráfico 1 - Padronização de ELISA indireto com amostras de soro equino para mormo.



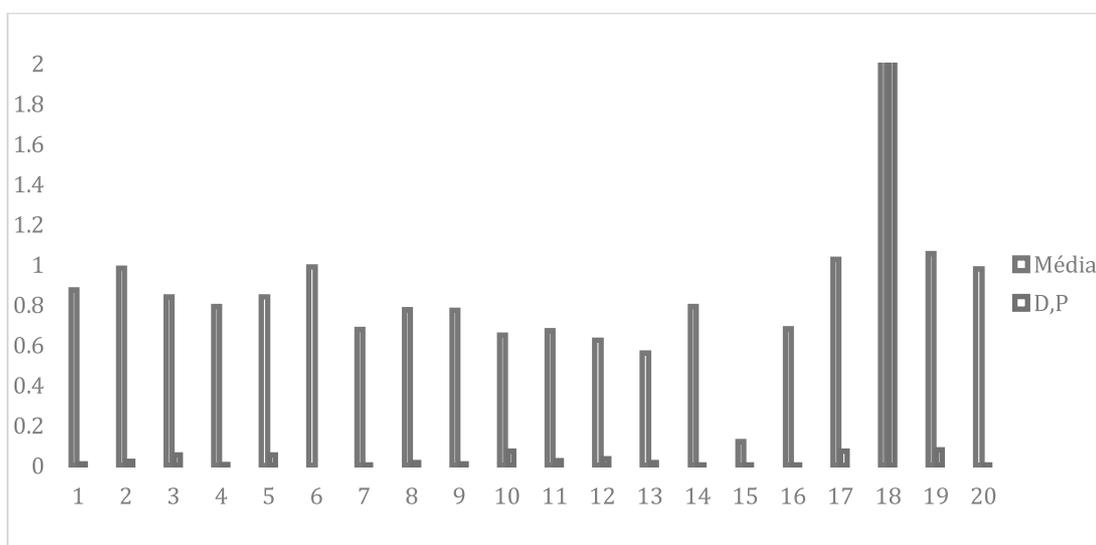
FONTE: Arquivo pessoal.

O cut-off (ponto de corte) foi estabelecido utilizando a média dos valores de densidade óptica de 44 amostras de soro equino todas negativas para Anemia Infecciosa Equina (AIE) e sem relato clínico de síndrome respiratórias ou outras patologias. O resultando no ponto de corte de 0,028.

Com a análise do ponto de corte foram utilizadas 20 amostras positivas (Gráfico 2) e 44 amostras negativas (Gráfico 3) para calcular a sensibilidade e a especificidade do teste padronizado.

Para as 20 amostras positivas no teste ELISA, 19 ficaram com valores de densidade óptica acima do ponto de corte (0,241), sendo considerada amostras positivas no teste padronizado e 1 amostra obteve valor menor que o cutt-off 0,028, sendo considerada amostra negativa (Gráfico 2).

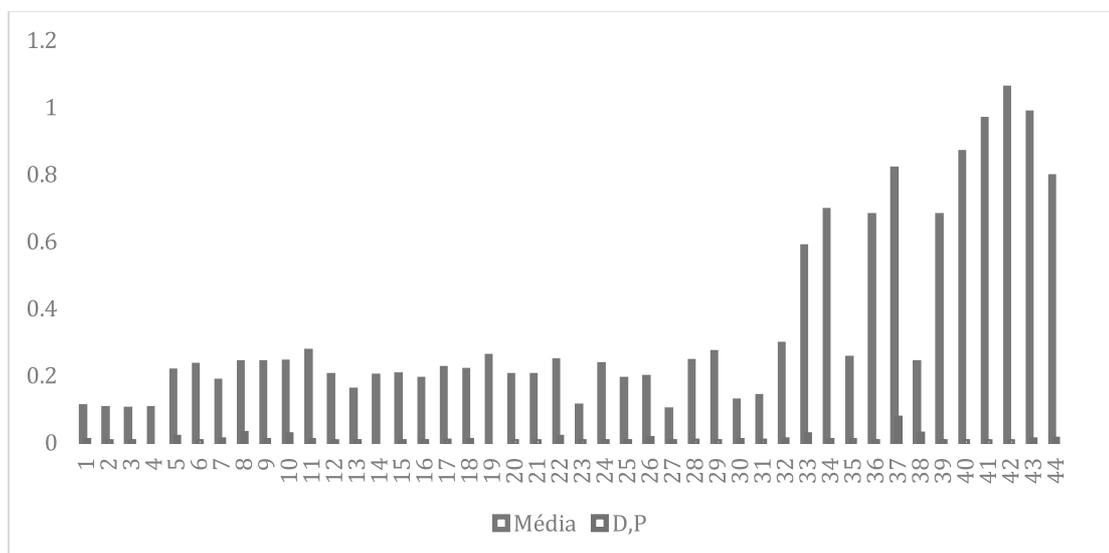
Gráfico 2 – Amostras comprovadamente positivas de soro equino para mormo.



FONTE: Arquivo pessoal.

Para as 44 amostras negativas no teste de ELISA, foram calculados a especificidade do teste, das 44 amostras: 22 amostras foram negativas e 22 amostras apresentaram-se como amostras falso-negativo (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Amostras de soro equino negativo para mormo.



FONTE: Arquivo pessoal.

Para o estudo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo foram calculados com as fórmulas preconizadas por Soares *et. al.*, (2012), exemplificados na tabela 4.

Tabela 4 – Valores para cálculo de sensibilidade e especificidade.

Condição do animal	Doente	Não-doente	Total
<b>Positivo</b>	A - 19	B - 22	19 + 22=41
<b>Negativo</b>	C - 1	D - 22	1+22=23
<b>Total</b>	19 + 1= 20	22 + 22 = 44	a+b+c+d (N) 64

FONTE: Arquivo pessoal.

**Fórmula Sensibilidade:  $a/(a+c) \times 100$** **SENSIBILIDADE:**  $(19/(19+1)) \times 100 = 95\%$ **Fórmula Especificidade:  $d/(b+d) \times 100$** **ESPECIFICIDADE:**  $22/(22+22) \times 100 = 50\%$ 

Quanto aos valores preditivos positivo e negativo obtemos:

**Preditivo positivo:**  $19/19+22 = 0,46$ **Preditivo negativo:**  $22/1+22 = 0,95$ 

Os resultados demonstram que, em uma amostra de 100 animais, o teste pode detectar corretamente 95% dos casos positivos, destacando um desempenho satisfatório. Além disso, o teste sorológico demonstrou a capacidade de confirmar 50% de casos negativos, o que representa um resultado promissor. Isso porque tal teste pode contribuir para a identificação precisa dos animais que tiveram contato com o patógeno, bem como aqueles que estão realmente infectados. No entanto, é necessário realizar novos estudos para aprimorar a especificidade do ELISA. Uma estratégia promissora seria a realização do teste em amostras que já foram confirmadas como negativas para *Burkholderia mallei* por meio de testes de triagem seguidos de Western Blotting. Essa abordagem poderia aumentar a especificidade do teste, reduzindo a suspeita de falsos-negativos nas amostras testadas.

Corroborando com estudos de Syed; Wooten (2021), bem como Eberl; Tümmler (2004) e Weaver; Kolter (2004) sobre a similaridade antigênica, nutricionais e bioquímicas da *Pseudomonas aeruginosa* com o gênero *Burkholderia* sp. visto que das 20 amostras comprovadamente positivas para *Burkholderia mallei*, 19 amostras foram detectadas no ELISA indireto utilizando um antígeno dialisado de *P. aeruginosa*. Características da modulação da resposta imune como a adaptação da LPS com o polissacarídeo O (LPS-O) da sua forma lisa para uma rugosa coincidindo com a cronicidade da doença reforça a capacidade de utilização do antígeno dialisado como alternativa de diagnóstico para o mormo (LOPES, 2012; SAIKH; MOTT, 2017).

PAL *et al.* (2012) na sua pesquisa utilizando o ELISA indireto com proteínas recombinantes 0375H e 0375TH mostraram 100% de sensibilidade e especificidade. Singha *et al.* (2014) com uso da proteína recombinante TssB apresentou sensibilidade diagnóstica de 99,7% e especificidade de 100%, Teles *et al.* (2012) no desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos com utilização de derivado proteico purificado de maleína constatou sensibilidade de 100% nas suas amostras. Chegando à conclusão que o ELISA indireto possui alta capacidade de detecção de animais verdadeiramente doentes.

Quando analisado o desempenho da especificidade do teste, vale ressaltar que as amostras utilizadas foram testadas e negativadas para Anemia Infecciosa Equina, não passando por testes de triagem ou confirmatório para mormo. Por mais que os animais estivessem sem sinais clínicos aparentes, assim como Radostits *et al.* (2002), Verma *et al.* (2014), Silva (2018) e Porto (2020), na fase crônica especialmente os equinos podem apresentar infecção sem sinais clínicos aparentes, não descartando desta maneira que as amostras selecionadas como negativas para AIE, possam ser positivas para *B. mallei*.

Outro ponto crucial é considerar a relação entre a intensidade da cor gerada e a leitura da densidade ótica. Valores próximos ao ponto de corte podem resultar em colorações semelhantes, tornando mais desafiadora a distinção entre resultados positivos e negativos. Além desses fatores, toda técnica foi realizada de maneira manual, podendo interferir no resultado final do teste.

## 5.2 COM RELAÇÃO AO QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO

No presente trabalho, todos os vinte e seis integrantes aceitaram participar da pesquisa cientes do Termo de Livre Consentimento e Esclarecimento (TLCE). Quanto ao estado de atuação profissional observamos na figura 12 que 56% dos participantes são do estado da Bahia, seguido dos estados de São Paulo e Rio Grande do Norte (8% em cada estado), Rio Grande do Sul, Paraná, Paraíba, Minas Gerais, Distrito Federal, Rio Grande do Norte, Santa Catarina e Pernambuco (4% em cada estado).

A intenção inicial era abranger o maior número possível de estados brasileiros na pesquisa. Embora tenham sido recebidas mais respostas de profissionais do estado da Bahia, a opção de realizar o questionário de forma eletrônica permitiu a obtenção de dados de outros estados que de outra forma não estariam acessíveis. No entanto, a expectativa de obter um número maior de respostas por meio eletrônico não foi atendida. Foi observado que, virtualmente, a possibilidade de resposta dependia da disposição do profissional em responder ao questionário, ao passo que, em entrevistas presenciais, o entrevistado dedicava um tempo para responder imediatamente às perguntas.

### 1º. Qual seu estado de atuação profissional?

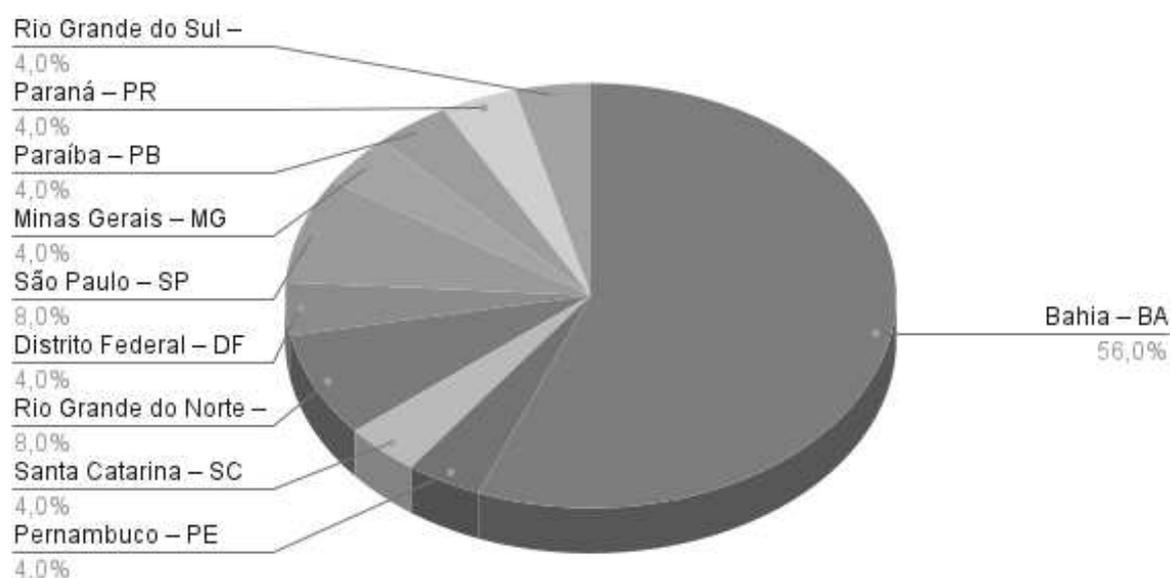


Figura 12 – Estado de atuação profissional.

Na rotina de atendimento (Figura 13), somente 8% dos participantes não tem na sua rotina o atendimento com equinos sendo estes profissionais: um médico veterinário recém-formado e outro participante com experiência profissional de até 3 anos. À medida que ambos trabalham com animais híbridos (mula e bardoto). A grande parte dos entrevistados (92% dos entrevistados) atuam com equinos, fato que corrobora com os dados da revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo que estimava em 2014 uma população de 5 milhões de equinos no país, divididos nas

atividades de esporte, lazer, criação e lida, associados a grande valor de mercado e requerendo cuidados intensivos relacionados à saúde (BRASIL, 2016). Os asininos e muares tem sua maior concentração no nordeste brasileiro e sua atividade está ligada a subsistência, condições mais intensas de trabalho e alimentação de baixa qualidade. Com o comercio de *eijao*, os jumentos estão sendo comercializados clandestinamente ou a preços irrisórios para abate (FALCÃO *et al.*, 2019; TATEMOTO; LIMA, 2020). Esses dados refletem na baixa de atendimento médico veterinário para tais espécies.

#### 4°. Qual animal de maior rotina no seu atendimento?

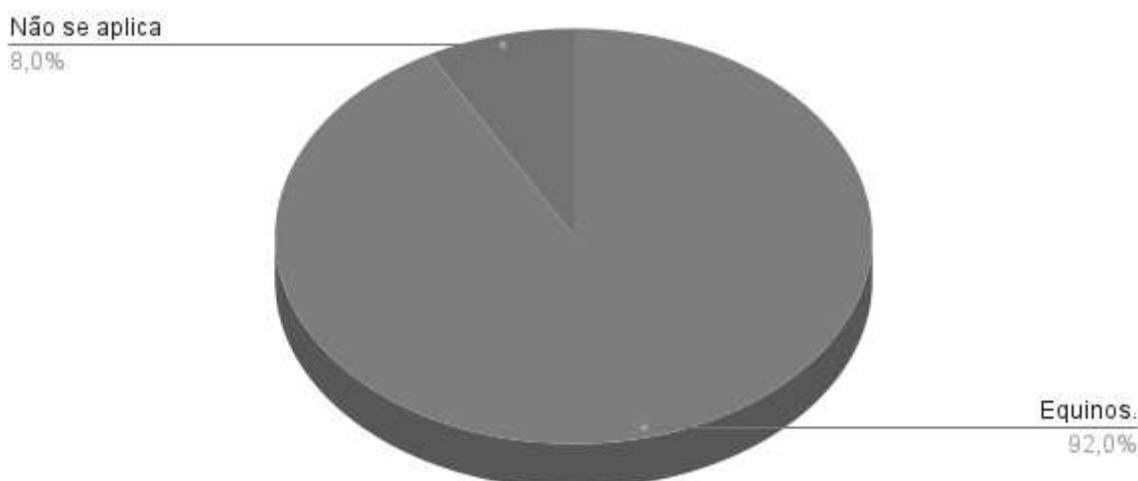


Figura 13 – Ocorrência de espécies atendidos.

Quanto ao tempo de formação como representado na figura 14, de maneira decrescente temos: 28% dos médicos veterinários tem de 1 a 3 anos de formado, seguido de 24% de 5 a 10 anos, empatados com 20% cada temos os grupos de 10 a 15 anos e com mais de 15 anos de experiência e, por fim, 8% correspondiam a profissionais recém-formados. Pesquisa semelhante foi desenvolvida por Santos; Martinez; Motta (2022) com aplicação de questionário sobre o conhecimento do mormo entre alunos do curso de medicina veterinária e profissionais do estado do Paraná, contudo o tempo de formação dos profissionais não foi avaliado.

## 2º. Há quanto tempo atua na área da medicina equina?

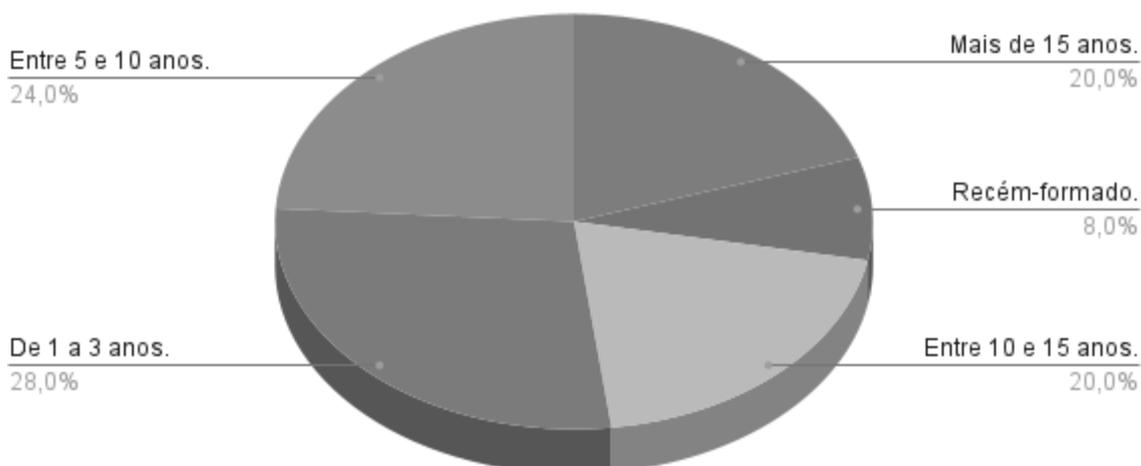


Figura 14 – Tempo de atuação na medicina equina.

Dos participantes do questionário (Figura 15) 68% dos veterinários referem ser cadastrados no Programa Nacional de Sanidade de Equídeos. Segundo dados do relatório do MAPA acessado no dia 11 de junho de 2023, o Brasil tem 11.568 médicos veterinários privados habilitados para a colheita de material e envio de amostras aos laboratórios credenciados para o diagnóstico de mormo. No estado da Bahia onde tivemos maior número de participantes, 690 profissionais são habilitados sendo que desse total 1,4% (10 pessoas) participaram do questionário, sendo a Bahia o 5º estado com mais médicos veterinários habilitados no país. Rio Grande do Sul lidera com 1.946 profissionais habilitados a nível nacional, seguido do estado de São Paulo com 1.672, Minas Gerais com 1.310 e Paraná com 901 médicos veterinários cadastrados no PNSE.

### 3º. Possui cadastro no PNSE – Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos?

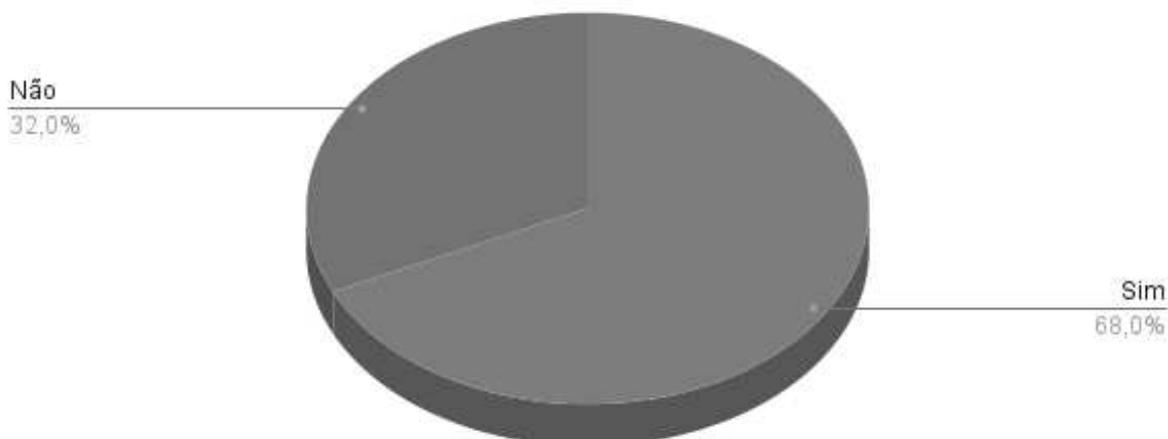


Figura 15 – Relação de médicos veterinários cadastrados no PNSE.

Conforme a Instrução Normativa nº 6 de 16 de janeiro de 2018, somente médicos veterinários habilitados poderão realizar a colheita e envio de amostras para testes laboratoriais de mormo. Para se habilitar, os médicos veterinários devem ser aprovados em capacitação específica sobre o PNSE e solicitar sua habilitação ao órgão de defesa agropecuária do seu estado. Nesse total, 24% responderam corretamente a IN 6 de 16 de janeiro de 2018, 64% assumiram não saber qual a legislação rege o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos. Dos 68% que possuem cadastro no PNSE, somente 26,3% responderam corretamente a IN nº 6, os demais responderam não saber ou marcaram as demais opções erradas. É esperado que os médicos veterinários soubessem qual a Instrução Normativa promove as diretrizes gerais para prevenção, controle e erradicação do mormo no território nacional devido a capacitação ofertada antes da habilitação (Figura 16). Isso leva a importância de reciclagem do conhecimento, atividades de pesquisa e extensão para estudantes e veterinários como sugere Brito *et al.* (2020) no inquérito realizado no estado do Paraná. Na representação da figura 16, consta a resposta de todos os participantes, com 24% respondendo corretamente (5 profissionais habilitados e 1 não habilitado ao programa), 64 % não sabiam, 8% responderam a IN nº 45 (Aprova as

normas para a prevenção e o controle da Anemia Infecciosa Equina - AIE) e 4% a IN nº 17 (Institui o programa Nacional de Sanidade dos Equídeos - PNSE).

### 9º. Qual a instrução normativa que promove as diretrizes gerais para prevenção, controle e erradicação do mormo

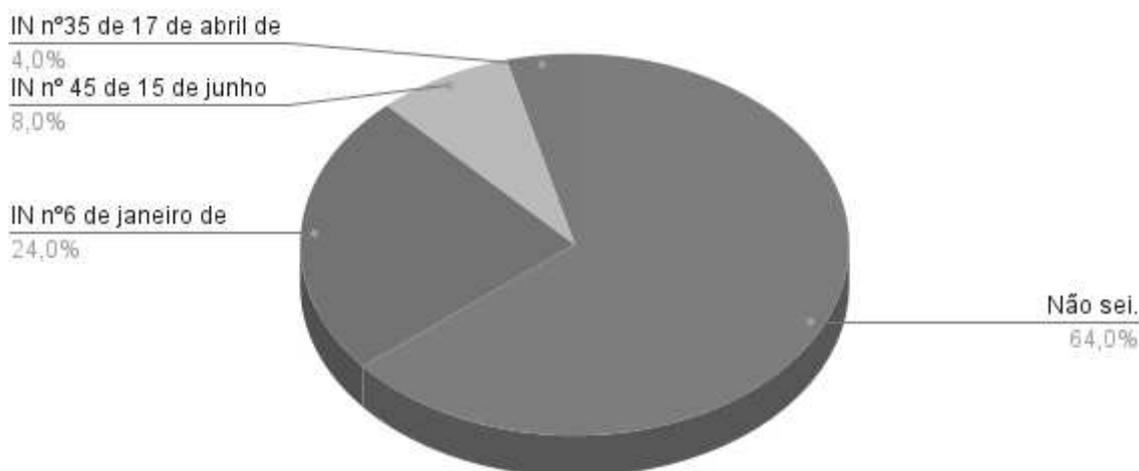


Figura 16 – Relação de conhecimento da IN 6 de 16 de janeiro de 2018.

Não que diz respeito ao conhecimento sobre os testes laboratoriais para o diagnóstico do mormo, o resultado foi mais favorável em relação ao número total de respostas corretas (Figura 17). 72% responderam o ELISA como única alternativa de exame laboratorial ou associado a outros testes e 20% das respostas seguiram com Western-Blotting, Fixação de Complemento, maleína, PCR e cultura bacteriana. Segundo a portaria Nº 35, de 17 de abril de 2018 definiu o ELISA como teste oficial de triagem no território nacional, Fixação de Complemento (FC) somente para trânsito internacional e como teste confirmatório o Western Blotting (WB).

As outras respostas como maleína, PCR e cultura bacteriana são testes que podem ser realizados como Mota (2006) e Silva (2018) relatam, contudo não são testes oficiais. Por fim, 4% das pessoas declararam não saber qual teste laboratorial utilizado para diagnóstico do mormo e mais 4% responderam Imunodifusão em Gel de Agarose

(IDGA) que é o teste utilizado no diagnóstico laboratorial para Anemia Infecciosa Equina (AIE) estando em desacordo com os testes laboratoriais para *B. mallei*.

### 10°. Quais os testes laboratoriais para diagnóstico do mormo? (Somente o nome ou sigla dos testes).

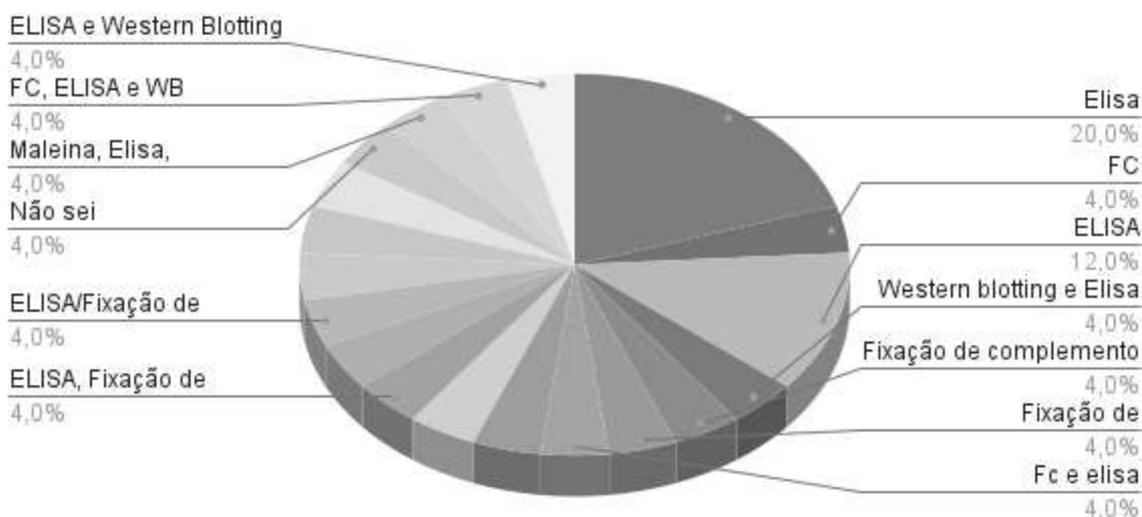


Figura 17 – Média de entendimento quanto aos exames laboratoriais para diagnóstico do mormo.

Ao conhecimento sobre medida de controle e prevenção do mormo, a ação mais assertiva é o manejo adequado dos animais, bem como o conhecimento quanto a resistência bacteriana. Saber que a *Burkholderia mallei* é sensível a ação da luz solar, calor (destruído em 10 minutos a 55°C), radiação ultravioleta, etanol 70% e desinfetantes comuns como o permanganato de potássio, hipoclorito de sódio na concentração de 500 p.p.m. faz toda diferença para o manejo dos animais e diminuição da carga infectante ambiental (RADOSTITS *et al.*, 2002; OIE, 2015). Na figura 18 representada a seguir, 48% responderam corretamente quanto a sobrevivência prolongada do patógeno em locais molhados ou úmidos, justamente devido à baixa ação da luz solar como descrito em literatura. Dos 52% restantes, 4% considera a *B.mallei* resistente ao hipoclorito de sódio (desinfetante comum), 32%

considera o patógeno extremamente resistente no ambiente enquanto 16% consideram ter sobrevivência prolongada em locais secos.

### 18. Em relação a *Burkholderia mallei*, patógeno causador do mormo e sua resistência ambiental

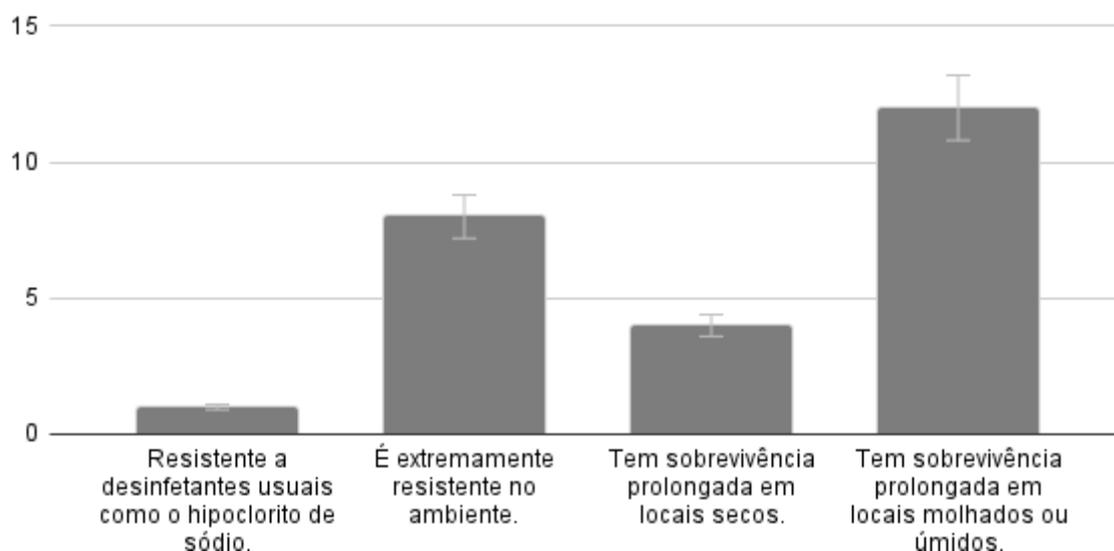


Figura 18 – Relação da *Burkholderia mallei* e resistência ambiental.

Correlacionando que a maioria dos entrevistados trabalham com equinos, podemos observar que o complexo do agronegócio do cavalo movimentava um grande mercado e um deles está ligado a sanidade equina com cuidados veterinários (BRASIL, 2016). Podemos observar que os equinos possuem cuidados mais intensos e melhor manejo de criação. No total, 60% da atuação profissional está em haras (Figura 19) seguido de atendimento clínico e reprodução equina.

### 5º. Qual sua área de atuação profissional? (pode marcar mais de uma opção).

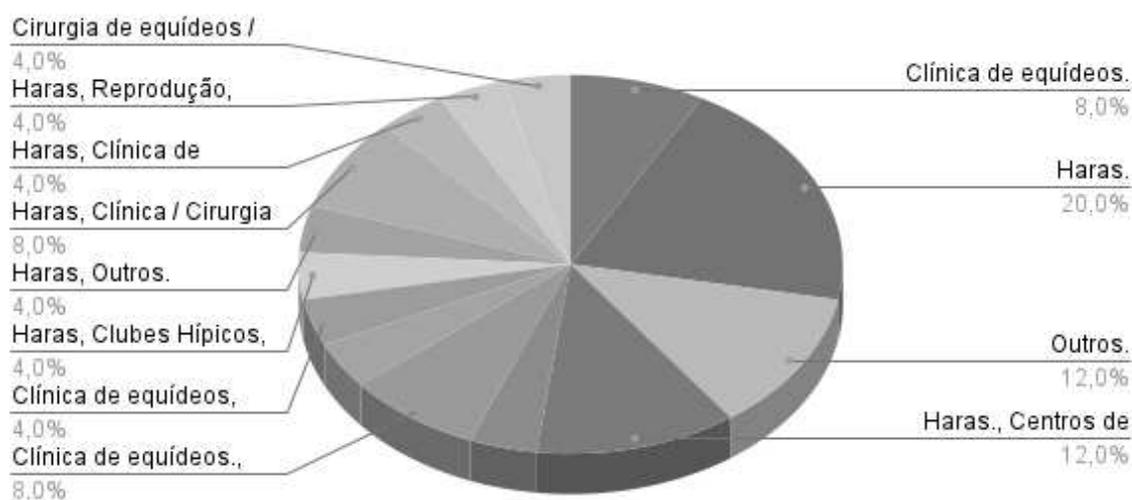


Figura 19 – Áreas de atuação profissional.

Observa-se ainda que as afecções mais atendidas na clínica de equídeos estão relacionados na ordem decrescente aos sistema locomotor, gastrointestinal reprodução e sistema respiratório (Figura 20).

## 6°. Quais afecções mais atendidas na sua rotina? (pode marcar mais de uma opção).

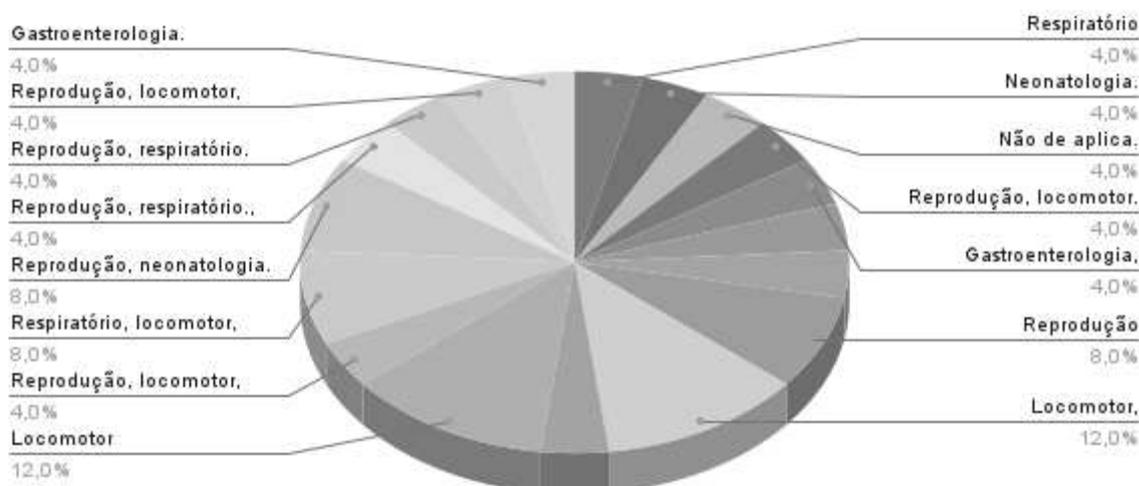


Figura 20 – Afecções clínicas da rotina de atendimento veterinário.

Na questão 16 quando perguntado quais sinais clínicos podem levar a suspeita de mormo, 60% dos participantes confirmaram o que Silva (2018), Silva *et al.* (2009) e Rosssdales (2015) destacaram que os sinais clínicos para mormo são inespecíficos sendo eles: febre, tosse, corrimento nasal, linfadenopatia, anorexia e sinais gastrointestinais. 32% responderam febre, tosse e corrimento nasal e por fim 8% responderam linfadenopatia (Figura 21).

## 16°. Quais sinais clínicos podem levar a suspeita de mormo?

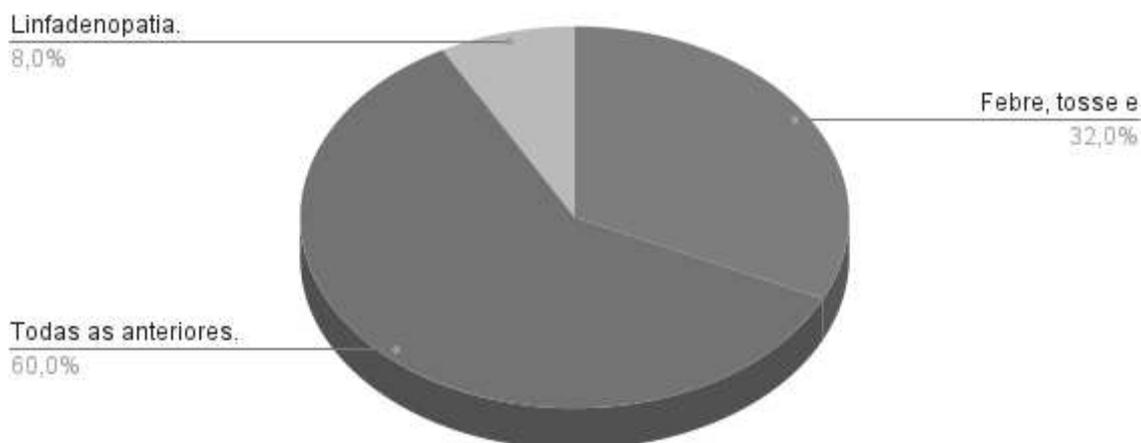


Figura 21 – Sinais clínicos para suspeita de mormo.

Doenças como esporotricose (*Sporotrichium spp.*), garrotilho (*Streptococcus equi*), pseudotuberculose (*Yersinia pseudotuberculosis*), linfangite ulcerativa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*) cursam com sinais clínicos semelhantes para o mormo (FALCÃO *et al.*, 2019). Neste item (Figura 22) houve um empate das respostas onde 48% dos entrevistados responderam que todas as enfermidades anteriores podem ser infecções diferenciais bem como somente o garrotilho; somente 4% consideraram apenas a pseudotuberculose como uma infecção diferencial.

#### 14°. Qual das infecções a seguir pode ser um diagnóstico diferencial para mormo?

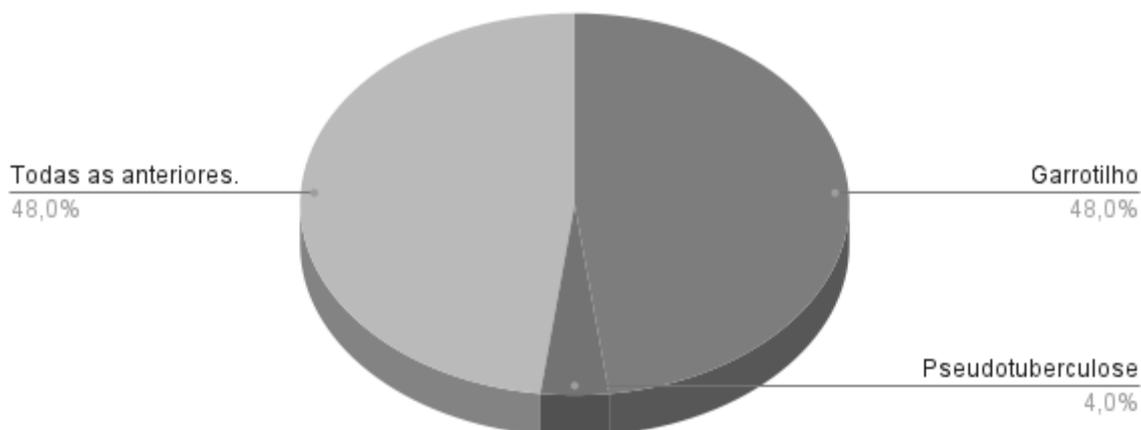


Figura 22 – Diagnóstico diferencial de mormo.

Quanto a casuística de doenças de notificação obrigatória: 48% responderam que não tem casuística de atendimentos, 40% responderam ter casuística de atendimentos de doenças de notificação obrigatória e 12% não souberam informar, sendo este último dado alarmante pois a falta de conhecimento das doenças de notificação obrigatória podem levar a falhas no controle e prevenção do mormo (Figura 23).

### 7°. Você tem casuística dos atendimentos com doenças de notificação obrigatória?

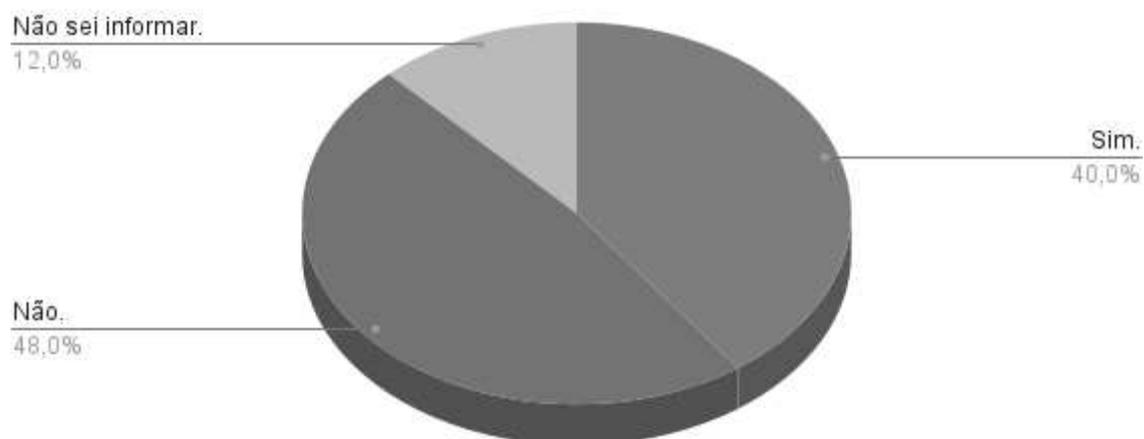


Figura 23 – Percentual de atendimentos para doenças de notificação obrigatória.

Na figura abaixo (Figura 24), quanto a suspeita ou confirmação de atendimentos de casos de mormo, 60% dos entrevistados não atenderam casos suspeitos ou confirmados de mormo, comparados aos 40% restantes que relatam já terem atendido.

**8º. Segundo definição do MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o mormo é uma doença contagiosa e geralmente fatal, causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, de curso agudo ou crônico, que acomete principalmente os equídeos, podendo ou não vir acompanhada por sintomas clínicos, e para qual não há tratamento eficaz para a eliminação do agente nos animais portadores. Você já atendeu algum caso suspeito ou confirmado de mormo?**

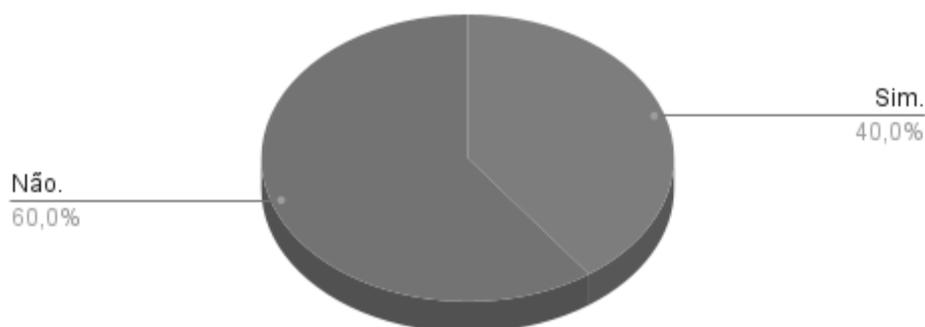


Figura 24 – Profissionais que atenderam casos suspeitos ou confirmados de mormo.

Quanto a forma de contaminação principal (Figura 25), 92% responderam que a principal via de contaminação é a via respiratória, contudo, segundo Souza (2012) a contaminação ocorre através da ingestão de alimentos e água contaminados, sendo a via digestiva a principal porta de entrada do mormo sendo a resposta correta respondida por 8% dos participantes. A principal via de transmissão da *B. mallei* é a via respiratória (MOREAES, 2011; MACHADO *et al.*, 2013).

### 11°. Baseado nos seus conhecimentos, qual a principal via de contaminação pela *Burkholderia mallei* em equídeos?

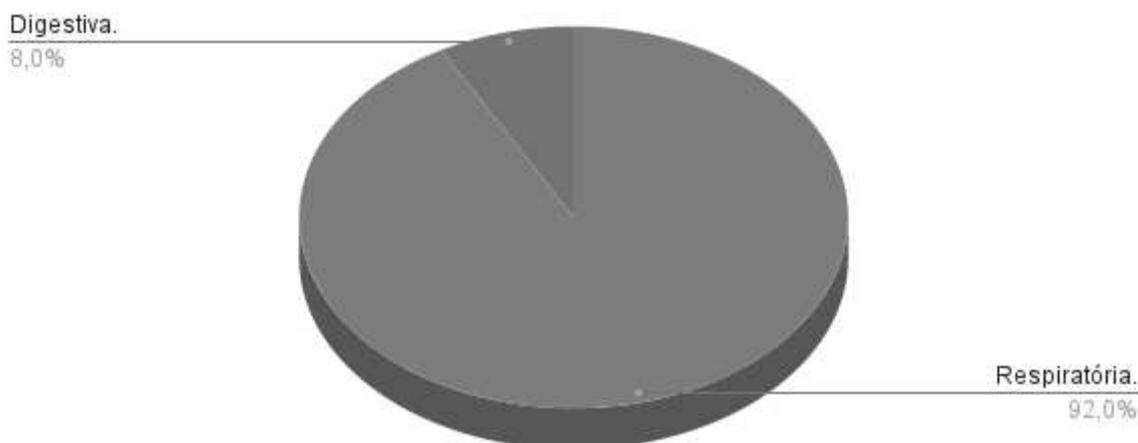


Figura 25 – Principal via de contaminação da *Burkholderia mallei* em equídeos.

Em humanos, o mormo é considerado uma doença ocupacional, e ocorre através do contato com material infectado, inalação de aerossóis em ambientes altamente contaminados, secreções do trato respiratório, infecções cutâneas de animais doentes e manipulação errada da bactéria em laboratório (SANTOS JUNIOR *et al.*, 2020).

A biossegurança abrange um conceito amplo e pode ser descrita como um conjunto de ações integradas para resguardar a equipe de profissionais, pacientes e proprietários em um contexto clínico. Na área da medicina veterinária, a aplicação de medidas de biossegurança busca identificar os riscos presentes em cenários variados, fornecendo orientações sobre sua detecção e prevenção (BRITO *et al.*, 2021).

Aos dados coletados na pesquisa, 24% afirmam sempre usar os equipamentos de proteção individual, contra 56% que usam com relativa frequência e por fim 20% que afirmaram nunca usar (Figura 26).

## 12°. Qual sua rotina do uso de EPI (equipamento de proteção individual)?

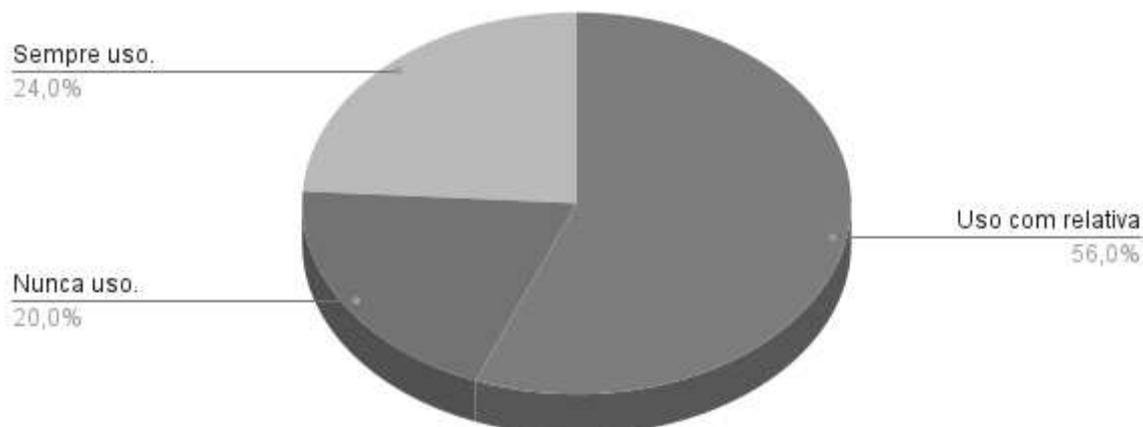


Figura 26 – Prática do uso de EPI entre médicos veterinários da medicina equina.

A abordagem do diagnóstico diferencial abre caminho para explorar novas opções de diagnóstico, compreender os diversos níveis de funcionamento e a natureza da patologia, o que, por sua vez, amplia as oportunidades para um tratamento mais eficaz. Segundo Santos Júnior *et al.* (2020) o conhecimento sobre o mormo é importante para o diagnóstico diferencial de outras doenças graves que causam pneumonia e abscessos múltiplos. Como resultado do questionário 16% dos participantes responderam sempre realizar diagnóstico diferencial para mormo, 44% raramente realizam enquanto 40% não realiza o diagnóstico diferencial (Figura 27).

A falta de diagnósticos pode subestimar a atual realidade do mormo no país. Com isso a conscientização constante especialmente para aqueles que fazem parte do grupo de risco é de suma importância.

### 13°. Na sua rotina de atendimentos, você realiza o diagnóstico diferencial para mormo?

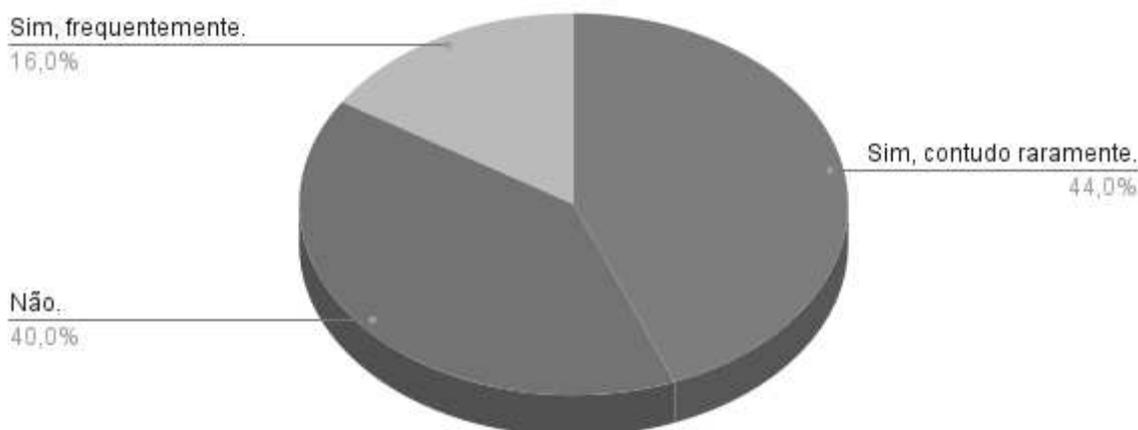


Figura 27 – Frequência de diagnóstico diferencial de mormo.

De acordo com a Instrução Normativa Nº 35, de 17 de abril de 2018, a maleinização intrapalpebral fica restrita como teste suplementar exclusivamente em equídeos com menos de seis meses potros de éguas positivas e com sintomas compatíveis com o mormo, desde que autorizada pelo DSA/SDA/MAPA. Essa informação é importante principalmente para os profissionais que em sua rotina atendam potros, como os veterinários que trabalham com neonatologia, reprodução, obstetrícia e clínica de equídeos. O teste da maleína já foi empregado como teste de triagem para mormo; no entanto, sua capacidade de detecção e especificidade são limitadas em animais com sinais clínicos avançados além de relatos com reações cruzadas entre *B. mallei* e *Streptococcus equi*, levando a resultados falsos-positivos (MOTA, 2006).

A figura 28 mostra o gráfico onde 48% acreditam que a maleína é o teste complementar utilizado em todos os animais, em segundo lugar como teste complementar exclusivamente em equídeos com menos de 6 (seis) meses de idade, potros de éguas positivas e que apresentem sintomatologia clínica compatível com o mormo, mediante autorização do DSA/SDA/MAPA, marcando a opção correta do questionário. Com 8% tivemos 3 respostas empatadas: Como teste de triagem em equídeos com menos de 6 (seis) meses de idade e que apresentem sintomatologia clínica compatível com o mormo, mediante autorização do DSA/SDA/MAPA, como

teste complementar em equídeos com menos de 6 (seis) meses de idade e que apresentem sintomatologia clínica compatível com o mormo, mediante autorização do DSA/SDA/MAPA e nenhuma das opções anteriores. Por fim para 4% a maleína é utilizada como teste complementar exclusivamente em equídeos com menos de 6 (seis) meses de idade e que apresentem sintomatologia clínica compatível com o mormo, mediante autorização do DSA/SDA/MAPA.

### 15. Em qual caso o teste de maleína é utilizado para diagnóstico de mormo?

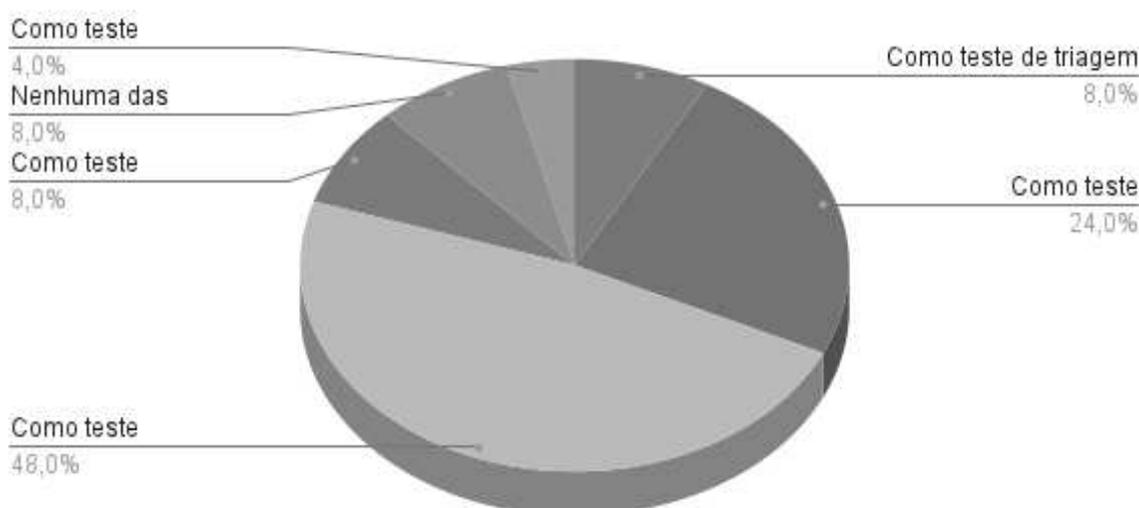


Figura 28 – Utilização do teste de maleína para diagnóstico de mormo.

Por fim, quando perguntados sobre o hábito de realização de necropsia (Figura 29), 52% informaram não ter o costume de realizar necropsia, seguidos de 30% que realizam. 8% preferiram não informar. Segundo Peixoto; Barros (1998) a necropsia é muito negligenciada, o que é lamentável já que sua prática é fundamental para confirmação ou correção do diagnóstico. Alguns achados de necropsia como ulceração do septo nasal acompanhando inicialmente a descarga mucopurulenta podendo evoluir para uma descarga hemorrágica é importante para aumentar a suspeita de mormo no paciente (SILVA, 2018).

**17. Em caso de óbito do paciente, você costuma realizar ou solicitar a necropsia do equídeo?**

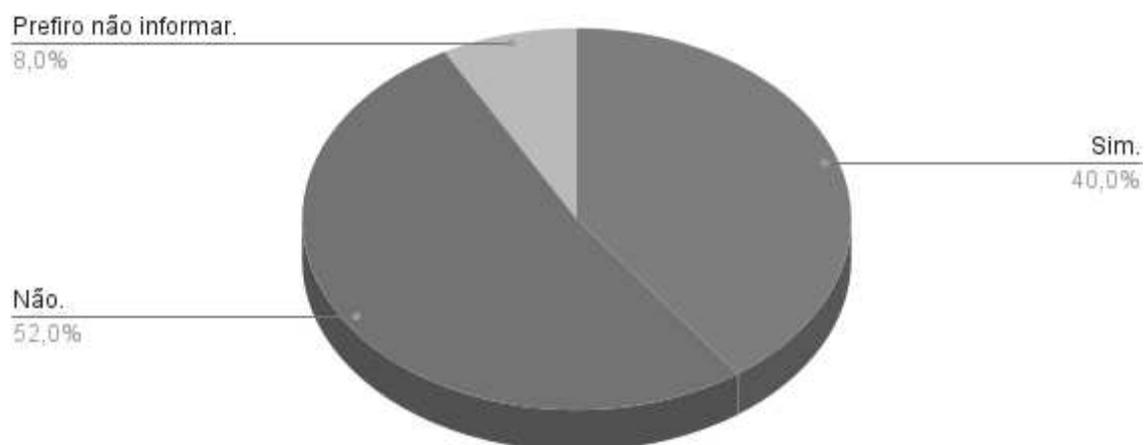


Figura 29 – Regularidade de necropsia nos atendimentos a equídeos.

## 6 CONCLUSÃO

Como conclusão, o antígeno desenvolvido demonstrou eficácia na indução de reações de cor e densidade óptica após a sensibilização das placas para testes de ELISA indireto. Após a padronização com amostras de soro equino, observou-se uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 50%. Apesar da sensibilidade satisfatória, recomenda-se a realização de novos testes utilizando amostras reconhecidamente negativas para *Burkholderia mallei* para acurácia da especificidade do teste reduzindo o risco de falsos negativos bem como sugere-se a realização de análises complementares, como Western Blotting, PCR ou eletroforese, para aprofundar o entendimento das características antigênicas da *Pseudomonas aeruginosa* e melhorar a precisão diagnóstica.

Em relação ao conhecimento sobre o mormo entre os médicos veterinários da medicina equina no Brasil, os resultados obtidos por meio do questionário eletrônico revelam um nível de abrangência de compreensão sobre exames laboratoriais, sinais clínicos e diagnóstico diferencial em relação à amostra total de respostas. No entanto, é imperativa uma maior divulgação do assunto, com dados atualizados, como os fornecidos pela Portaria Nº 593, de 30 de junho de 2023, que revogou importantes disposições da Instrução Normativa nº 6, de 16 de janeiro de 2018. Essa atualização é crucial para garantir que os profissionais estejam devidamente informados e preparados para lidar com os desafios relacionados ao mormo.

Além disso, é sugerido o emprego de outras estratégias em consonância com entidades como o Conselho Federal e Regional de Medicina Veterinária de cada unidade federativa para ampliar o alcance e a representatividade da pesquisa, especialmente associado ao conhecimento da doença entre os profissionais habilitados. Reconhecendo as limitações do estudo, é importante destacar a necessidade de futuros trabalhos que possam abordar essas lacunas e aprimorar a compreensão sobre o mormo, que incluam uma análise mais abrangente sobre biossegurança especialmente no contexto brasileiro, onde a doença é endêmica. Vale ressaltar que o mormo é uma doença por vezes assintomática em equinos, o que coloca os médicos veterinários em risco de infecção. Portanto, a biossegurança

durante todos os procedimentos gerais, de atendimento ao diagnóstico é fundamental para mitigar esse risco.

## REFERÊNCIAS

ADHIKARI, N.; ACHARYA, K.P.; WILSON, R.T. The potential for an outbreak of glanders in Nepal. **Tropical Medical Health**, 2019.

ADAB - AGÊNCIA ESTADUAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA DA BAHIA. **Portaria nº 013, de 16 de março de 2020**. Dispõe sobre normas gerais para a emissão de GTA - Guia de Trânsito Animal para o abate de equídeos no estado da Bahia e outras providências. Diário Oficial do Estado da Bahia. Salvador, 2020.

ALLEN, A. R.; SKUCE, R. A.; BYRNE, A. W. Bovine Tuberculosis in Britain and Ireland – A Perfect Storm? The Confluence of Potential Ecological and Epidemiological Impediments to Controlling a Chronic Infectious Disease. **Frontiers Veterinary Science Division**, v. 5, 2018.

AUGUSTINHO, J. F. M. **Abate de equídeos**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação), Instituto Federal de São Paulo, Barretos, 2016.

BRASIL. **Manual de boas práticas de manejo em equideocultura** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Mobilidade Social, do Produtor Rural e Cooperativismo. Brasília, 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 17, de 8 de maio de 2008**. Institui o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos - PNSE. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 6, de 16 de janeiro de 2018**. Dispõe sobre as Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE). Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa Nº 35, de 17 de abril de 2018**. Dispõe sobre definição dos testes laboratoriais para o diagnóstico do mormo. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria Nº 22, de 16 de março de 2018**. Dispõe sobre a autorização do uso da técnica ELISA para o diagnóstico laboratorial do mormo. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria MAPA Nº 593, de 30 de junho de 2023**. Altera a Instrução Normativa nº 6, de 16 de janeiro de 2018, que aprova as Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE) - Diário Oficial da União, DF, 2023.

BRITO, N. A.; FERREIRA, S. B.; TENÓRIO, T. G. S.; CRUZ, L. G. S.; LEAL, S. M. S.; FEITOSA, L. C. S. Uso de EPI's e principais agravos ocupacionais em discentes de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.15, 2021.

CAMPOS, M. C.; DA SILVA, F. A.; MAZZER, H. R.; VASCÃO, M. L.; VOLPI, P. C.; SHIMOKOMAKI, M. Carnes de equídeos: implementação de um programa de APPCC em frigorífico de exportação. **Revista Higiene Alimentar**. v. 24, 2010.

CARVALHO, J. C. S. **Frequência de casos de mormo em asininos no Brasil no período de janeiro de 2018 a abril de 2019**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação), Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

CARVALHO, J. C. S. **Identificação dos fatores de manejo associados à ocorrência no Mormo em equídeos no Nordeste do Brasil**. Dissertação (mestrado em biociência animal), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2022.

CFMV – CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINARIA. **Guia brasileiro de boas práticas em eutanásia em animais - conceitos e procedimentos recomendados**. Brasília: CFMV, 2012.

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretriz da Prática de Eutanásia do CONCEA**. Brasília, 2015.

DINIZ, M.C.; FARIAS, K. M.; PACHECO, A. C. L. P.; VIANA, D. A.; ARAÚJO-FILHO, R.; LIMA, A. P. S.; COSTA, R. B.; OLIVEIRA, D. M. Análise Genômica de *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*: dois Patógenos de Primeira Grandeza e de Genomas surpreendentemente complexos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**. v.2, n.1, 2008.

EBERL, L.; TÜMMLER, B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. **International Journal of Medical Microbiology**, 2004.

FALCÃO, M. V. D.; SILVA, J. G.; MOTA, R. A. Mormo: perguntas e respostas. Recife: **EDUFRPE**, 2019.

FRANCO, V. L. M.; MARQUES, L. O. C.; DINIZ, S. G. S.; ASSUNÇÃO, V. I. S.; NOGUEIRA, A. B. L.; BRAGAGNOLO, J. C. B.; BAREZANI, A. F. B.; PAIM, M. J. A. A técnica de ELISA e a sua importância para o diagnóstico clínico. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.7, n.9, 2021.

HOWE, C.; MILLER, W.R.: Human glanders; report of 6 cases. **Annals of Internal Medicine - ACP Journals**, v. 26, p 93-115, 1947.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **PPM - Pesquisa da Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro: IBGE, 2022.

LOPES, A. R. J. **Avaliação de mecanismo de escape imunológico do Complexo**

**Burkholderia cepacia**. Dissertação. FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

MACHADO, L. **Justiça suspende abate de jumentos no Brasil para exportação para a China**. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-60267352>. Acesso em: 17 Nov. 2022.

MACHADO, L.; LIMA, F. **'É como matar um cão': o dilema do abate de jegues no Nordeste para produção de remédio na China**. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/brasil-59572597>. Acesso em: 11 Nov. 2022.

MACHADO, M. B.; SILVEIRA, P. P. M.; BANDEIRA, J. T.; MORAIS, R. S. M. M.; SANTOS, F. L.; BARÇANTE, T. A. Prevalência de mormo no estado de Pernambuco no período de 2006 a 2011. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v. 16, n. 1/2/3, 2013.

MEDEIRO, C. **Abate em massa de jumentos para China ameaça espécie e saúde pública no Nordeste**. Disponível em: <https://noticias.uol.com.br/colunas/carlos-madeiro/2023/06/25/sob-maus-tratos-abate-sem-controle-ameaca-jumentos-e-saude-publica-no-ne.htm>. Acesso em: 3 Jul. 2023.

MEURER, I.R. Mormo, uma zoonose reemergente: aspectos gerais e principais ferramentas de diagnóstico. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v.4, n.6, 2021

MORAES, D. D. A. **Prevalência de mormo e anemia infecciosa equina em equídeos de tração do distrito federal**. Dissertação (mestrado em saúde animal), Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

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

NASIRI, M.; ZARRIN, A.; ROSHANKARRUDSARI, S.; KHODADADI, J. Glanders (*Burkholderia mallei* infection) in an Iranian man: A case report. **Journal homepage**, 2023.

OIE – WORLD ANIMAL HEALTH ORGANIZATION. **Glanders**. Terrestrial Animal Health Code 2015. Chapter 12. Disponível em: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-code/access-online/>. Acesso em: 19 Dez. 2021.

PAL, V.; KUMAR, S.; MALIK, P.; RAIA, G. P. Evaluation of Recombinant Proteins of *Burkholderia mallei* for Serodiagnosis of Glanders. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 19, n 8, 2012.

PEIXOTO, P. V.; BARROS, C. S. L. A importância da necropsia em medicina veterinária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 1998.

PEREIRA FILHO, A. A. **ELISA: definição, variações e protocolos práticos**. Campina Grande, Ampilla, 2023.

PORTO, M. B. R. **Estudo epidemiológico do mormo em Sergipe: 2019.** EMDAGRO, Aracaju, 2020.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G.; HOUSTON, D. M. **Exame Clínico e Diagnóstico em Veterinária.** Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2002.

**RIISPOA** - Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária dos Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, DF, 18 ago. 2020.

ROCHA, L. O. **Infecção por *Burkholderia mallei* em Equídeos e cobaios (*Cavia porcellus*): avaliação da resposta humoral e estudo clínico.** Dissertação (mestrado em inovação e tecnologia integradas a medicina veterinária), Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, 2018.

ROSSDALES. **Glanders.** 2015. Disponível em: <https://www.rossdales.com/assets/files/Glanders.pdf>. Acessado em: 15 Dez 2021.

SAIKH, K. U; MOTT, T. M. Innate immune response to *Burkholderia mallei*, Current Opinion in Infectious Diseases. **Journal Infectious Diseases.** v 30, n 3, 2017.

SANTOS JÚNIOR, E. L.; MOURA, J. C. R.; PROTÁSIO, B. K. P. F.; PARENTE, V. A. S.; VEIGA, M. H. N. D. Clinical repercussions of Glanders (*Burkholderia mallei* infection) in a Brazilian child: a case report. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** v. 53, 2020.

SANTOS, A. S.; MARTINEZ, A. C.; MOTTA, R. G. **Levantamento epidemiológico dos casos de mormo em equídeos no estado do Paraná (2010 a 2019) e o nível de conhecimento da doença entre alunos do curso de medicina veterinária e profissionais do estado.** In: 31º ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA / 11º ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA JÚNIOR. Universidade Estadual de Maringá, Umuarama, 2022.

SILVA, C. M. S. L. **Avaliação da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e ELISA indireto como método de diagnóstico da *Burkholderia mallei* (mormo).** Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVA, C. M. S. L. **Avaliação do diagnóstico do mormo.** Tese (doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

SILVA, E. B.; DOW, S. W. Development of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* vaccines. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.** v. 3, 2013.

SILVA, K. P. C.; MOTA, R. A.; CUNHA, A. P.; SILVA, L. B. G.; LEAL, N. C.; CAVALVANTE, Y. V. N.; TELES, J. A. A.; PEREIRA, M. C. C.; FREITAS, N. S. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na região nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira.** 2009.

SINGHA, H.; MALIK, P.; GOYAL, S. K.; KHURANA, S. K.; MUKHOPADHYAY, C.; ESHWARA, V. K.; SINGH, R. K. Optimization and Validation of Indirect ELISA Using Truncated TssB Protein for the Serodiagnosis of Glanders amongst Equines. **The**

Scientific World Journal, 2014.

SOARES, A. N.; BRANDÃO, E. C.; CUNHA, G. F.; SCHERRER, L. R.; PRECIVALE, M.; STRASSMANN, P. G.; ASSIS, S. R. L. **MANUAL DE CONDUTAS SBOC - Artigos sobre Testes Diagnósticos** (Direitos reservados SBOC). Cap. 5, 2012.

SOUZA, M. M. A. **Diagnóstico do mormo através da técnica de Fixação de Complemento utilizando-se diferentes antígenos e métodos de incubação**. Dissertação (Programa de pós-graduação em ciência veterinária), Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

SYED, I.; WOOTEN, R.M. Interactions Between Pathogenic Burkholderia and the Complement System: A Review of Potential Immune Evasion Mechanisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 11, 2021.

TATEMOTO, P; LIMA, Y. F. Abate de jumentos: da biossegurança ao arcabouço dela. **Revista Justiça e Sociedade**. v. 8, 2023.

TELES, J. A. A.; CAMPOS, A. C.; DA SILVA, K. P. C.; SANTOS, A. S.; SANTANA, V. L. A.; DE CASTRO, R. S.; MOTA, R. A. Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2012.

TITBALL, R. R.; BURTNICK, M. N.; BANCROFT, G. J.; BRETT, P. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* vaccines: Are we close to clinical trials? **Vaccine**. v. 35, 2017.

VERMA, A. K.; SAMINATHAN, M.; NEHA; TIWARI, R.; DHAMA, K.; SINGH, S. V. Glanders - A Reemerge Zoonotic Disease: A Review. **Journal of Biological Sciences**, 2014.

VIEIRA, R. C. **Avaliação da interação entre *Burkholderia cenocepacia* e macrófagos alveolares in vitro e da infecção de modelos murinos**. Dissertação (mestrado). INSTITUTO OSWALDO CRUZ - Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro, 2016.

WEAVER, V.; KOLTER, R. Burkholderia spp. alter *Pseudomonas aeruginosa* physiology through iron sequestration. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n 8, 2004.

## 7 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo a ser enviado para a Revista Brasileira de Ciência Veterinária, cujas orientações encontram-se disponíveis em: <https://periodicos.uff.br/rbcv>

**PADRONIZAÇÃO DE TESTE DE ELISA INDIRETO PARA DIAGNÓSTICO DE  
MORMO UTILIZANDO ANTÍGENO DIALISADO DE PSEUDOMONAS  
AERUGINOSA<sup>1</sup>**

**STANDARDIZATION OF INDIRECT ELISA TEST FOR DIAGNOSIS OF GLANDERS  
USING DIALYZED ANTIGEN OF PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

CAROLINE PEREIRA CORREIA<sup>2\*</sup>, ROBSON B. CERQUEIRA<sup>3\*</sup>

**RESUMO:**

O mormo é uma doença grave e altamente contagiosa, causada pela bactéria gram-negativa *Burkholderia mallei*, afetando diversos mamíferos, principalmente equídeos, com implicações significativas na saúde animal e humana. Reconhecida pela Organização Mundial para a Saúde Animal (OMSA) como uma zoonose e possível arma biológica, o mormo é uma preocupação global. No Brasil, é uma doença de notificação obrigatória, conforme a Instrução Normativa 50 de 24 de setembro de 2013 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), sendo transmitida principalmente por água, alimentos e fômites contaminados. Com o maior rebanho equino da América Latina, o Brasil enfrenta desafios econômicos consideráveis devido aos impactos do mormo na indústria de esportes, lazer, exportação de animais e produção de carne. Após um longo período sem registros, novos casos surgiram no país no início do século XXI, gerando preocupações crescentes em todos os estados brasileiros.

---

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

Aceito para publicação em .....

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação de Mestrado em Defesa Agropecuária, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Rua Rui Barbosa, n. 710, Centro, Cruz das Almas, Bahia 44.380-000, Brasil. \*Autor para correspondência: [caroliinecorreia@gmail.com](mailto:caroliinecorreia@gmail.com)

<sup>3</sup> Curso de Medicina Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB), Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Rua Rui Barbosa, n. 710, Centro, Cruz das Almas, Bahia 44.380-000, Brasil.

Diante desse cenário, pesquisas e padronização de novos testes diagnósticos são de suma importância na saúde única para contribuir na identificação, controle e erradicação da doença no país. Este estudo teve como objetivo a padronização de um teste imunoenzimático indireto utilizando o antígeno dialisado de *Pseudomonas aeruginosa* para detecção de infecção por *B. mallei*. Inicialmente, cultivou-se *P. aeruginosa* para produção do antígeno dialisado, seguido pela realização do ELISA indireto com amostras negativas e positivas para mormo, permitindo definir a sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo. Os resultados demonstraram uma sensibilidade de 95% e especificidade de 50%, indicando a possibilidade no uso diagnóstico. Assim, o ELISA indireto padronizado com antígeno dialisado de *Pseudomonas aeruginosa* pode ser considerado uma ferramenta eficaz na identificação de casos de mormo.

**Palavras-chave:** *Burkholderia mallei*, sorodiagnóstico, saúde única.

#### **ABSTRACT:**

Glanders is a serious and highly contagious disease, caused by the gram-negative bacterium *Burkholderia mallei*, affecting several mammals, mainly equids, with significant implications for animal and human health. Recognized by the World Organization for Animal Health (WOAH) as a zoonosis and possible biological weapon, glanders has become a global concern. In Brazil, it is a notifiable disease, according to Normative Instruction 50 of September 24, 2013 of the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MALS), being transmitted mainly by contaminated water, food and fomites. With the largest equine herd in Latin America, the country faces considerable economic challenges due to the impacts of glanders on the sports industry, leisure, animal exports and meat production. After a long period without records, new cases emerged in the country at the beginning of the 21st century, generating growing concerns in all Brazilian states. Given this scenario, research and standardization of new diagnostic tests are of paramount importance in single health to contribute to the identification, control and eradication of the disease in the country. This study aimed to standardize an indirect immunoenzymatic test using dialyzed *Pseudomonas aeruginosa* antigen to detect *B. mallei* infection. Initially, *P. aeruginosa*

was cultivated to produce dialyzed antigen, followed by indirect ELISA with negative and positive samples for glanders, allowing sensitivity, specificity, negative and positive predictive values to be defined. The results demonstrated a sensitivity of 95% and specificity of 50%, indicating the possibility of diagnostic use. Thus, the standardized indirect ELISA with dialyzed *Pseudomonas aeruginosa* antigen can be considered an effective tool in identifying glanders cases.

**Keywords:** *Burkholderia mallei*, serodiagnosis, one health.

## INTRODUÇÃO:

O mormo é uma doença conhecida desde a antiguidade e representa uma ameaça significativa a saúde, causando prejuízos sociais, econômicos e sanitários. Sua prevalência entre as espécies animais é mais proeminente em equídeos, embora também possa afetar acidentalmente outros animais, incluindo carnívoros, pequenos ruminantes e seres humanos, principalmente através do contato com água, alimentos e objetos contaminados (ROCHA, 2018).

No Brasil a doença é conhecida por vários nomes regionais como lamparão, garrotilho atípico e catarro-de-mormo, cujo agente etiológico é a bactéria gram-negativa *Burkholderia mallei* (SILVA, 2014; CARVALHO, 2019).

As manifestações clínicas do mormo podem variar, apresentando-se isoladamente ou em conjunto e envolvendo alterações respiratórias, linfáticas e cutâneas. A forma da doença geralmente difere entre asininos, muares e equinos, sendo aguda nos primeiros e crônica nos últimos. Apesar dos avanços na pesquisa, as vacinas desenvolvidas mostraram-se ineficazes para os animais suscetíveis, e nenhum tratamento específico está disponível (RADOSTITS *et al.*, 2002; VERMA *et al.*, 2014; TITBALL *et al.*, 2017; PORTO, 2020).

No contexto regulatório, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem desempenhado um papel importante no estabelecimento de diretrizes para prevenção, controle e erradicação do mormo no país. Entretanto, a mudança recente

na legislação com a Portaria Nº 593 de 30 de junho de 2023, podem ter impactos significativos nos esforços de controle da doença.

A interação entre animais e seres humanos é um fator agravante, uma vez que o mormo é uma zoonose, o que significa que há potencial de disseminação do microrganismo pelo contato entre espécies (SILVA, 2014; CARVALHO, 2019). Isso ressalta a importância da intervenção e responsabilidade do médico veterinário não apenas na gestão, mas também na promoção da saúde coletiva.

Salientando seu caráter zoonótico e as exigências laboratoriais nível NB-3 para manipulação da *Burkholderia mallei*, a intenção de desenvolver testes com antígenos de similaridade antigênica, fenotípica, nutricionais e bioquímicas nas análises laboratoriais representam uma nova possibilidade na abordagem diagnóstica (EBERL; TÜMMLER, 2004; SILVA, 2018).

Nesse contexto, novos métodos diagnósticos são essenciais para fortalecer as medidas de controle, prevenção e vigilância epidemiológica do mormo. O presente trabalho teve como objetivo padronizar um teste de ELISA indireto utilizando um antígeno dialisado de *Pseudomonas aeruginosa* para detecção de mormo.

## **MATERIAL E MÉTODOS:**

**Local do experimento:** O experimento foi realizado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), no Hospital Universitário de Medicina Veterinária (HUMV), Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI), localizado no município de Cruz das Almas – Bahia (12°39'35.755"S 39°5'26.023"W).

**Amostras:** As 44 amostras de soros negativas utilizadas foram adquiridas através de banco de soro sanguíneo de equídeos negativas para Anemia Infecciosa Equina (AIE) e sem relato clínico de síndrome respiratórias ou outras patologias no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2013, oriundos da região de Bom Jesus da Lapa - Bahia.

As 20 amostras de soro positivas foram obtidas por doação por um laboratório privado que realiza sorologia oficial para mormo com o teste de ELISA indireto recomendado

pelo MAPA. As alíquotas foram fornecidas sem identificação por se tratar de uma doença de notificação e necessidade de manutenção do sigilo pelo o laboratório que oferece o serviço. Os animais apresentaram sinais clínicos respiratórios, emagrecimento, febre alta, hiporexia, emagrecimento progressivo e ulceração do septo nasal com aparecimento inicial de descarga mucopurulenta, linfadenopatia de linfonodos submandibulares e alguns animais apresentaram sinais clínicos como lesões no septo nasal que evoluíram para úlceras que cicatrizam em formato de “estrela”, considerado lesão sugestiva para mormo.

**Produção do antígeno:** A *Burkholderia mallei* apresenta riscos significativos para a saúde humana e animal, sendo permitida sua manipulação apenas em laboratórios com nível de segurança 3 (NB3) (SILVA, 2018). No entanto, o Laboratório de Doenças Infeciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (LDI-HUMV) não possui essa classificação, o que limita a utilização da *Burkholderia* sp. em projetos de pesquisa. A revisão bibliográfica revelou similaridades nutricionais, bioquímicas e na interação patógeno-hospedeiro entre *B. mallei* e *Pseudomonas aeruginosa* (WEAVER; KOLTER, 2004; SYED; WOOTEN, 2021). Com base nessas semelhanças, foi desenvolvido um antígeno para a standardização do ELISA indireto para *Burkholderia mallei*, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* como bactéria para a produção do antígeno.

**Expansão bacteriana:** Encontrava-se no acervo interno do laboratório um cultivo de *P. aeruginosa* em placa de Petri, cultivado em meio ágar nutriente. Amostras das colônias foram transferidas para tubos de 15 ml contendo meio ágar BHI (Brain Heart Infusion Broth) e colocadas em estufa a 37°C para crescimento subsequente. Após 48 horas de crescimento, o conteúdo total foi transferido para um erlenmeyer contendo aproximadamente 500 ml de caldo BHI para expansão da massa bacteriana.

**Obtenção do antígeno:** Após expansão da massa bacteriana em meio BHI por 48 horas a 37°C, o conteúdo foi centrifugado para separar a massa bacteriana do sobrenadante. Em seguida, a massa foi lavada com solução salina para purificação do antígeno, realizando-se a diluição e centrifugação subsequente. Para inativação bacteriana e posterior dialise, a massa foi submetida a banhos-maria a 60°C durante três horas, alternados com períodos de congelamento, durante três dias consecutivos. Após esse processo, o sobrenadante foi coletado e a massa bacteriana descartada.

**Diálise:** Foram esterilizados em fluxo laminar com luz UV durante dez minutos ponteiras, Becker de 25 ml, suporte, pipeta de vidro de 10 ml, barbante, luvas de procedimento e membrana de diálise de 10 micrômetros. A membrana foi acondicionada no Becker de 25 ml e preenchida com o último sobrenadante da etapa anterior, sendo amarrada com o barbante. Em seguida, o saco resultante foi amarrado a uma pipeta de vidro e mergulhado em um Becker de 1000 ml preenchido com PBS, contendo uma barra magnética, sobre um agitador magnético. O PBS foi trocado a cada 12 horas durante três dias, resultando no antígeno dialisado armazenado em seis tubos Eppendorf (Figura 1).



Figura 1 – Diálise do antígeno em meio PBS.

**Protocolo do ELISA indireto:** Na fase inicial, realizou-se diluições do antígeno para identificar a titulação mais adequada na padronização do ELISA indireto. Para isso, foi utilizada uma placa de polietileno de 96 poços, que foi sensibilizada utilizando 50 e 100  $\mu$ L por poço do antígeno diluído em tampão carbonato bicarbonato nas diluições de 1 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200 (Tabela 1).

Tabela 1 – Mapa referente a padronização para titulação do teste ELISA indireto no diagnóstico de *Burkholderia mallei*.

	1:100		1:200		1:400		1:800		1:1600		1:3200	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Branco 50 µL	Branco 100 µL										
<b>B</b>	Branco 50 µL	Branco 100 µL										
<b>C</b>	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL										
<b>D</b>	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL										
<b>E</b>	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL										
<b>F</b>	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL										
<b>G</b>	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL										
<b>H</b>	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL										

Após sensibilização a placa foi mantida overnight durante 24 horas em câmara úmida na geladeira. Em seguida a placa foi lavada duas vezes com tampão fosfato salino (Phosphate Buffer Saline) acrescido de 0,05% de Tween-20 (PBS-T). O próximo passo foi bloquear as reações na placa (Figura 2) usando solução de PBS-T com 5% de leite em pó desnatado (LPD) utilizando 200µl por poço e colocado na estufa a 37°C por 2 horas, após a retirada a placa foi lavada 1 vez com PBS-T e mantida armazenada na câmara úmida em geladeira.

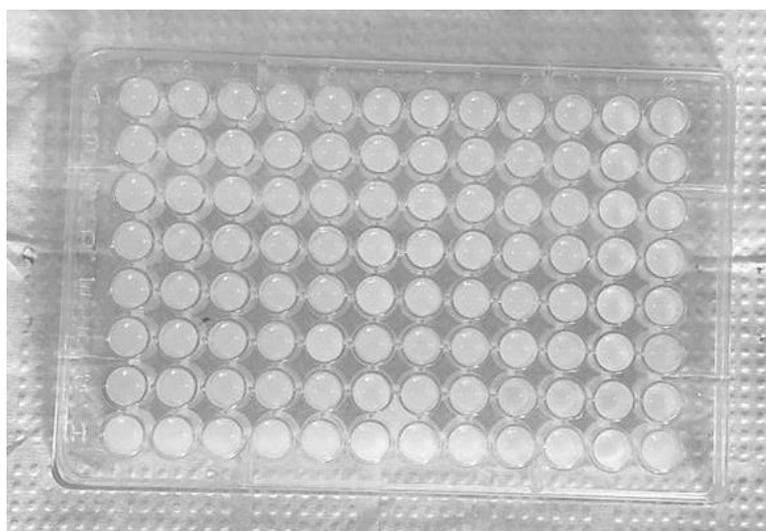


Figura 2 – Bloqueio das reações em placa de ELISA com PBS+LPD.

Para diluição dos soros positivo e negativo utilizou-se 0,1 gramas de LPD a 2%, 5 ml de PBS-T com 12 µL da alíquota positiva e negativa em duplicata separadamente em

cada placa. Desta solução, 50  $\mu$ L poços foram preenchidos nos poços ímpares e 100  $\mu$ L foram preenchidos nos poços pares e os poços branco preenchidos apenas com a solução PBS-T+LPD. A placa foi incubada em câmara úmida e, em seguida, transferida para uma estufa a 37 °C por 1 hora e 30 minutos. Na fase posterior, 50  $\mu$ L de conjugado foi distribuído em todos os poços e novamente inserido em câmara úmida e incubada na estufa por uma hora a 37 °C. Ao fim do tempo acrescentou-se 50  $\mu$ L da solução reveladora (4,16 gramas de OPD + 10 ml de tampão cítrico + 60  $\mu$ L de água oxigenada a 30%) em todos os poços da placa. Após duas horas a reação foi interrompida com 25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Figura 3). A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em leitor de microplacas com filtro ajustado.

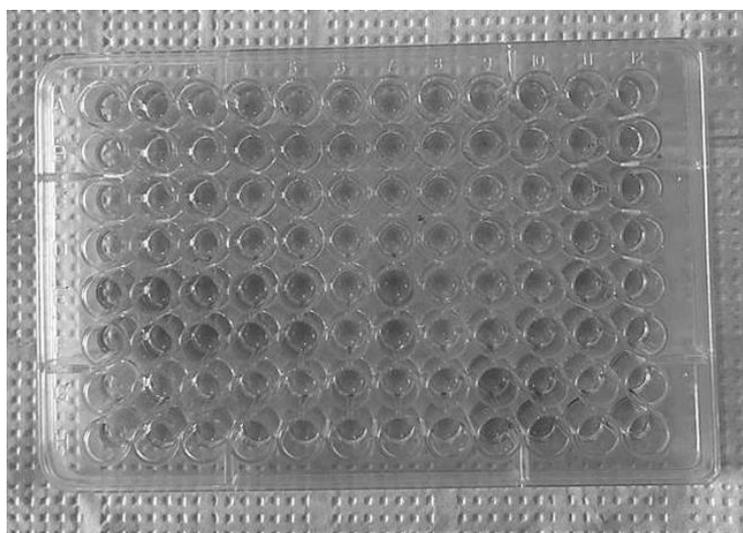


Figura 3 – Imagem da placa de padronização do ELISA.

Em seguida, os soros comprovadamente positivos (20 amostras) e negativos (44 amostras) foram testados com 12  $\mu$ L do Ag na diluição de 1:200, que proporcionou a melhor escala de colorimetria na placa de padronização. Todas as etapas descritas anteriormente foram realizadas em ambas as placas, tanto negativas quanto positivas, desde a sensibilização até a revelação e leitura da densidade óptica (DO).

**Análise estatística:** As análises das placas de titulação das amostras positivas e negativas foram efetuadas no Excel®, através dos valores obtidos pela avaliação da densidade óptica e aplicação de fórmulas.

**Estudo da sensibilidade, especificidade, cut-off e valores preditivos negativo e positivo:** Os testes estatísticos seguiram as diretrizes de Soares *et al.* (2012),

analisando sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. A sensibilidade e a especificidade foram calculadas como porcentagens, representando a probabilidade de indivíduos doentes testarem positivo e de não doentes testarem negativo, respectivamente. Os valores preditivos positivo e negativo foram calculados como a probabilidade da presença ou ausência da doença quando o teste é positivo ou negativo. O cut-off foi determinado através do cálculo da média de animais não reagente acrescido de quatro vezes o desvio padrão populacional.

A tabela 2 facilita a compreensão desses conceitos.

Tabela 2 – Esquematização dos cálculos de sensibilidade e especificidade.

Condição do animal	Doente	Não-doente	Total
Positivo	A	B	A+B
Negativo	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D(N)

FONTE: Soares *et al.*, 2012.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização dos ensaios e a titulação do antígeno, verificou-se que o melhor resultado foi obtido com uma diluição de 1:200, onde a intensidade da cor foi avaliada colorimetricamente (Figura 4), utilizando 100 µL de antígeno por poço. Entretanto, observou-se uma alteração na coloração dos soros na diluição 1:1600, possivelmente devido ao processo manual de lavagem ou à possível positividade na amostra. A definição dos critérios considerou a coloração obtida e os valores de densidade ótica, indicando a viabilidade do uso do antígeno em testes de ELISA indireto para detecção de *Burkholderia mallei*.

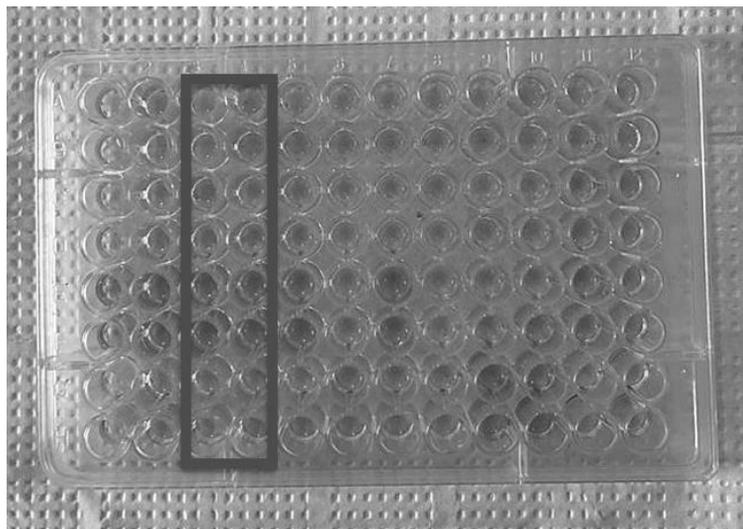
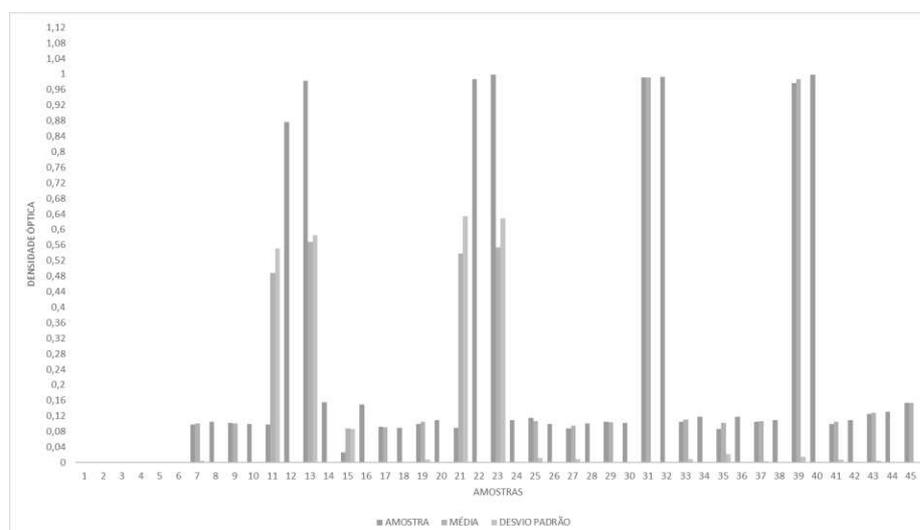


Figura 4 – Gradiente de cor referente ao resultado obtido do ELISA indireto para a titulação do antígeno.

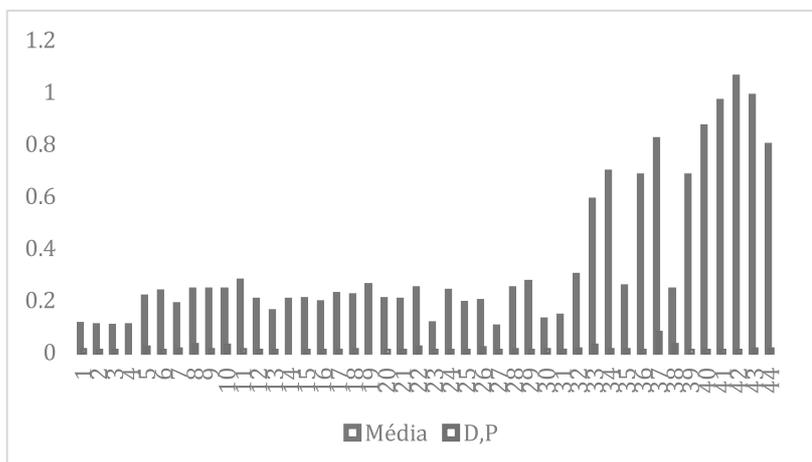
Quanto à placa de padronização para a titulação antigênica, a média geral das amostras foi de 0,273, com um Desvio Padrão (DP) de 0,058 e um Coeficiente de Variação (CV) de 21%. No Gráfico 1, são apresentados os valores médios de cada amostra analisada juntamente com seus respectivos DP. As amostras numeradas de 1 a 6 correspondem aos poços associados às amostras positivas, negativas e controle branco, portanto, não são incluídas nos cálculos do Gráfico 1.

Gráfico 1 - Padronização de ELISA indireto com amostras de soro equino para mormo.



O cut-off foi determinado pela média dos valores de densidade ótica de 44 amostras de soro equino negativas para Anemia Infecciosa Equina (AIE), resultando em um ponto de corte de 0,028 (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Amostras de soro equino negativo para mormo.



Em seguida, 20 amostras positivas e 44 amostras negativas foram analisadas para calcular a sensibilidade e a especificidade do teste. Das 20 amostras positivas, 19 apresentaram valores de densidade ótica acima do ponto de corte (0,241), sendo consideradas positivas no teste, enquanto 1 amostra teve um valor inferior a 0,028, classificada como negativa. Das 44 amostras negativas no teste ELISA, a especificidade do teste foi calculada, revelando que 22 amostras foram corretamente classificadas como negativas, enquanto 22 amostras foram classificadas como falso-negativas.

FÓRMULA SENSIBILIDADE:  $a/(a+c) \times 100$

Sensibilidade:  $(19/(19+1)) \times 100 = 95\%$

FÓRMULA ESPECIFICIDADE:  $d/(b+d) \times 100$

Especificidade:  $22/(22+22) \times 100 = 50\%$

Quanto aos valores preditivos positivo e negativo obtemos:

Preditivo positivo:  $19/19+22 = 0,46$

Preditivo negativo:  $22/1+22 = 0,95$

Os achados revelam que, em uma amostra de 100 animais, o teste apresentou uma taxa de detecção correta de 95% para casos positivos, demonstrando um desempenho satisfatório. Adicionalmente, o teste sorológico confirmou corretamente 50% dos casos negativos, indicando uma promissora capacidade de identificação precisa dos animais expostos ao patógeno e daqueles verdadeiramente infectados. No entanto, é essencial conduzir novas investigações para aprimorar a especificidade do ELISA. Uma estratégia promissora seria aplicar o teste em amostras previamente confirmadas como negativas para *Burkholderia mallei*, por meio de testes de triagem seguidos de Western Blotting, visando reduzir a ocorrência de falsos-negativos.

Em concordância com os estudos de Syed; Wooten (2021), Eberl; Tümmler (2004), e Weaver; Kolter (2004), que abordaram à similaridade antigênica, nutricional e bioquímica entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia* sp., observou-se que 19 das 20 amostras positivas para *Burkholderia mallei* foram detectadas no ELISA indireto usando um antígeno de *P. aeruginosa*. Essas descobertas sugerem a viabilidade do antígeno dialisado como uma alternativa diagnóstica para o mormo, destacando características como a modulação da resposta imune, como a adaptação da LPS com o polissacarídeo O (LPS-O), que coincide com a cronicidade da doença (LOPES, 2012; SAIKH; MOTT, 2017).

Estudos anteriores, como o de PAL *et al.* (2012), que utilizou proteínas recombinantes 0375H e 0375TH, demonstraram uma sensibilidade e especificidade de 100% no ELISA indireto. Singha *et al.* (2014), ao empregar a proteína recombinante TssB, alcançaram uma sensibilidade diagnóstica de 99,7% e uma especificidade de 100%. Da mesma forma, Teles *et al.* (2012), ao desenvolverem e avaliarem um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos com a utilização de derivado proteico purificado de maleína, constataram uma sensibilidade de 100% em suas amostras. Esses estudos convergem para a alta capacidade de detecção de animais realmente doentes pelo ELISA indireto.

Ao avaliar o desempenho da especificidade do teste, é importante ressaltar que as amostras foram negativadas para Anemia Infecciosa Equina, sem passar por testes de triagem ou confirmatórios para mormo. Entretanto, é relevante considerar que, na fase crônica, os equinos podem estar infectados sem apresentar sinais clínicos aparentes, o que levanta a possibilidade de que amostras negativas para AIE possam

ser positivas para *B. mallei* (Radostits *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2014; Silva, 2018; Porto, 2020). A relação entre a intensidade da cor gerada e a leitura da densidade óptica também deve ser considerada, pois valores próximos ao ponto de corte podem resultar em colorações semelhantes, dificultando a distinção entre resultados positivos e negativos. Adicionalmente, o fato da técnica ter sido realizada manualmente pode interferir no resultado final do teste.

## CONCLUSÃO

Como conclusão, o antígeno desenvolvido demonstrou eficácia na indução de reações de cor e densidade óptica após a sensibilização das placas para testes de ELISA indireto. Os resultados revelaram uma sensibilidade de 95% e uma especificidade de 50% após a padronização com amostras de soro equino. Apesar da sensibilidade satisfatória, recomenda-se a realização de novos testes utilizando amostras reconhecidamente negativas para *Burkholderia mallei*, a fim de aprimorar a especificidade do teste e reduzir o risco de falsos negativos. Além disso, sugere-se a realização de análises complementares, como Western Blotting, PCR ou eletroforese para aprofundar o entendimento das características antigênicas da *Pseudomonas aeruginosa* e melhorar a precisão diagnóstica.

## REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Portaria MAPA Nº 593, de 30 de junho de 2023**. Altera a Instrução Normativa nº 6, de 16 de janeiro de 2018, que aprova as Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE) - Diário Oficial da União, DF, 2023.

CARVALHO, J. C. S. **Frequência de casos de mormo em asininos no Brasil no período de janeiro de 2018 a abril de 2019**. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação), Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

EBERL, L.; TÜMMLER, B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. **Journal of Medical Microbiology**, 2004.

LOPES, A. R. J. **Avaliação de mecanismo de escape imunológico do Complexo *Burkholderia cepacia***. Dissertação. FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

PAL, V.; KUMAR, S.; MALIK, P.; RAI, G. P. Evaluation of Recombinant Proteins of

*Burkholderia mallei* for Serodiagnosis of Glanders. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 19, n 8, 2012.

PORTO, M. B. R. **Estudo epidemiológico do mormo em Sergipe: 2019**. EMDAGRO, Aracaju, 2020.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G.; HOUSTON, D. M. **Exame Clínico e Diagnóstico em Veterinária**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2002.

ROCHA, L. O. **Infecção por *Burkholderia mallei* em Equídeos e cobaios (*Cavia porcellus*): avaliação da resposta humoral e estudo clínico**. Dissertação (mestrado em inovação e tecnologia integradas a medicina veterinária), Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, 2018.

SAIKH, K. U; MOTT, T. M. Innate immune response to *Burkholderia mallei*, Current Opinion in Infectious Diseases. **Journal Infectious Diseases**. v 30, n 3, 2017.

SILVA, C. M. S. L. **Avaliação da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e ELISA indireto como método de diagnóstico da *Burkholderia mallei* (mormo)**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVA, C. M. S. L. **Avaliação do diagnóstico do mormo**. Tese (doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

SINGHA, H.; MALIK, P.; GOYAL, S. K.; KHURANA, S. K.; MUKHOPADHYAY, C.; ESHWARA, V. K.; SINGH, R. K. Optimization and Validation of Indirect ELISA Using Truncated TssB Protein for the Serodiagnosis of Glanders amongst Equines. **The Scientific World Journal**, 2014.

SYED, I.; WOOTEN, R.M. Interactions Between Pathogenic Burkholderia and the Complement System: A Review of Potential Immune Evasion Mechanisms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. v. 11, 2021.

TELES, J. A. A.; CAMPOS, A. C.; DA SILVA, K. P. C.; SANTOS, A. S.; SANTANA, V. L. A.; DE CASTRO, R. S.; MOTA, R. A. Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2012.

TITBALL, R. R.; BURTNICK, M. N.; BANCROFT, G. J.; BRETT, P. Burkholderia pseudomallei and Burkholderia mallei vaccines: Are we close to clinical trials? **Vaccine**. v. 35, 2017.

VERMA, A. K.; SAMINATHAN, M.; NEHA; TIWARI, R.; DHAMA, K.; SINGH, S. V. Glanders - A Reemerge Zoonotic Disease: A Review. **Journal of Biological Sciences**, 2014.

WEAVER, V.; KOLTER, R. Burkholderia spp. alter Pseudomonas aeruginosa physiology through iron sequestration. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n 8, 2004.

## APÊNDICE

Inquérito epidemiológico: Avaliação do conhecimento sobre o mormo entre os médicos veterinários hipiatras do Brasil.

Sou Caroline Pereira Correia, médica veterinária e mestranda do curso de Defesa Agropecuária na UFRB - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia. Meu projeto de pesquisa refere-se ao estudo epidemiológico do mormo no estado da Bahia entre os anos 2000 e 2022, com ênfase na resposta imune e etiopatogenia. Estou realizando esse inquérito como forma de avaliar o conhecimento sobre o mormo entre os médicos veterinários hipiatras em todo país.

É rápido de responder, com perguntas simples e objetivas.

Peço por gentileza que leiam atentamente o termo a seguir e as perguntas do questionário, suas respostas são de extrema importância para os dados do meu projeto de pesquisa.

Desde já agradeço a sua participação.

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário (a), em uma pesquisa científica. Caso você não queira participar, não há problema algum. Você não precisa me explicar porque, e não haverá nenhum tipo de punição por isso. Você tem todo o direito de não querer participar do estudo, basta selecionar a opção correspondente no final desta página.

Para confirmar sua participação você precisará ler todo este documento e depois selecionar a opção correspondente no final dele. Este documento se chama TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). Nele estão contidas as principais informações sobre o estudo, objetivos, metodologias, riscos e benefícios, dentre outras informações.

Este TCLE se refere ao projeto de pesquisa “Estudo epidemiológico do mormo na Bahia entre os anos 2000 e 2022”, cujo objetivo é “Analisar a evolução do mormo no estado da Bahia, abordando os aspectos da etiopatogenia e resposta imunológica no hospedeiro”. Para ter uma cópia deste TCLE você deverá imprimi-lo, ou deverá gerar uma cópia em formato "pdf" para guarda-lo em seu computador. Você também poderá solicitar aos pesquisadores do estudo uma versão deste documento a qualquer momento por um dos e-mails registrados no final deste termo.

A pesquisa será realizada por meio de um questionário online, constituído por dezoito perguntas. Estima-se que você precisará de aproximadamente 15 minutos. A precisão de suas respostas é determinante para a qualidade da pesquisa.

O questionário estará disponível para ser respondido entre os dias 06 / 12 / 2022 a 15 / 01 / 2023.

Você não será remunerado, visto que sua participação nesta pesquisa é de caráter voluntário. Caso decida desistir da pesquisa você poderá interromper o questionário e sair do estudo a qualquer momento, sem nenhuma restrição ou punição.

**BENEFÍCIOS DO ESTUDO:** Tendo em vista o aumento de diagnósticos de mormo no Brasil nos últimos 22 anos, e o risco da doença na saúde única – animal, humana e ambiental, a realização do estudo epidemiológico trará melhor elucidação da doença ao longo desses anos, sua etiopatogenia e resposta imune do hospedeiro.

**RETORNO ACADÊMICO E SOCIAL:** O estudo terá valor acadêmico, podendo servir de embasamento para posteriores estudos na área. Seu retorno social visa elucidar a evolução epidemiológica da enfermidade, ajudando a realizar medidas de controle, prevenção e erradicação do mormo.

Os pesquisadores garantem e se comprometem com o sigilo e a confidencialidade de todas as informações fornecidas por você para este estudo. Da mesma forma, o tratamento dos dados coletados seguirá as determinações da Lei Geral de Proteção de Dados (LGPD – Lei 13.709/18).

Caso persistam dúvidas sobre o estudo, você poderá entrar em contato através do e-mail da pesquisadora:

Médica veterinária: Caroline Pereira Correia.

E-mail: carolinecorreia@aluno.ufrb.edu.br

### CONSENTIMENTO DE PARTICIPAÇÃO

Eu concordo em participar voluntariamente do presente estudo como participante. O pesquisador me informou sobre tudo o que vai acontecer na pesquisa, o que terei que fazer, inclusive sobre os possíveis riscos e benefícios envolvidos na minha participação. O pesquisador me garantiu que eu poderei sair da pesquisa a qualquer momento, sem dar nenhuma explicação, e que esta decisão não me trará nenhum tipo de penalidade ou interrupção de meu tratamento.

Fui informado também que devo imprimir ou gerar um pdf do TCLE para ter a minha cópia do TCLE e que posso solicitar uma versão dele via e-mail para os pesquisadores.

E-mail: \_\_\_\_\_

Aceito participar?

(     ) Sim.

(     ) Não.

Qual seu estado de atuação profissional?

(     ) Acre (AC)

(     ) Alagoas (AL)

(     ) Amapá (AP)

(     ) Amazonas (AM)

(     ) Bahia (BA)

- (     ) Ceará (CE)
- (     ) Distrito Federal (DF)
- (     ) Espírito Santo (ES)
- (     ) Goiás (GO)
- (     ) Maranhão (MA)
- (     ) Mato Grosso (MT)
- (     ) Mato Grosso do Sul (MS)
- (     ) Minas Gerais (MG)
- (     ) Pará (PA)
- (     ) Paraíba (PB)
- (     ) Paraná (PR)
- (     ) Pernambuco (PE)
- (     ) Piauí (PI)
- (     ) Rio de Janeiro (RJ)
- (     ) Rio Grande do Norte (RN)
- (     ) Rio Grande do Sul (RS)
- (     ) Rondônia (RO)
- (     ) Roraima (RR)
- (     ) Santa Catarina (SC)
- (     ) São Paulo (SP)
- (     ) Sergipe (SE)

(      ) Tocantins (TO)

Há quanto tempo atua na área da medicina equina?

(      ) Recém-formado.

(      ) De 1 a 3 anos.

(      ) Entre 3 e 5 anos.

(      ) Entre 5 e 10 anos.

(      ) Entre 10 e 15 anos.

(      ) Mais de 15 anos.

Possui cadastro no PNSE – Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos?

(      ) Sim.

(      ) Não.

Qual animal de maior rotina no seu atendimento?

(      ) Equinos.

(      ) Asininos.

(      ) Muare.

(      ) Não se aplica (animais híbridos).

Qual sua área de atuação profissional? (Pode marcar mais de uma opção).

- Haras.
- Clubes Hípicos.
- Jockeys Clubes.
- Centros de Reprodução.
- Clínica de equídeos.
- Cirurgia de equídeos / cirurgia de grandes animais.
- Docência.
- Outros.

Quais afecções mais atendidas na sua rotina? (Pode marcar mais de uma opção).

- Sistema reprodutivo.
- Sistema respiratório.
- Sistema locomotor.
- Gastroenterologia.
- Neonatologia.
- Neurologia.
- Não de aplica.

07. Você tem casuística dos atendimentos com doenças de notificação obrigatória?

- Sim.

(     ) Não.

(     ) Não sei informar.

08. Segundo definição do MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, o mormo é uma doença contagiosa e geralmente fatal, causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, de curso agudo ou crônico, que acomete principalmente os equídeos, podendo ou não vir acompanhada por sintomas clínicos, e para qual não há tratamento eficaz para a eliminação do agente nos animais portadores. Você já atendeu algum caso suspeito ou confirmado de mormo?

(     ) Sim.

(     ) Não.

(     ) Não sei informar.

09. Qual a instrução normativa que promove as diretrizes gerais para prevenção, controle e erradicação do mormo no território nacional?

(     ) IN nº35 de 17 de abril de 2018.

(     ) IN nº 45 de 15 de junho de 2004.

(     ) IN nº6 de janeiro de 2018.

(     ) IN nº12 de 29 de janeiro de 2004.

(     ) Não sei.

10. Quais os testes laboratoriais para diagnóstico do mormo? (Somente o nome ou sigla dos testes).

R: \_\_\_\_\_

11. Baseado nos seus conhecimentos, qual a principal via de contaminação pela *Burkholderia mallei* em equídeos?

(     ) Respiratória.

(     ) Digestiva.

(     ) Cutânea.

(     ) Reprodutiva.

(     ) Não sei.

12. Qual sua rotina do uso de EPI (equipamento de proteção individual) como luvas de procedimento não cirúrgico, máscaras, touca, óculos, avental, calçados apropriados?

(     ) Sempre uso.

(     ) Uso com relativa frequência.

(     ) Nunca uso.

(     ) Prefiro não informar.

13. Na sua rotina de atendimentos, você realiza o diagnóstico diferencial para mormo?

(     ) Sim, frequentemente.

(     ) Sim, contudo raramente.

(     ) Não.

(     ) Prefiro não informar.

14. Qual das infecções a seguir pode ser um diagnóstico diferencial para mormo?

- ) Esporotricose (*Sporotrichium* spp.).
- ) Garrotilho (*Streptococcus equi*).
- ) Pseudotuberculose (*Yersinia pseudotuberculosis*).
- ) Linfangite Ulcerativa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*).
- ) Todas as anteriores.
- ) Nenhuma das anteriores.

15. Em qual caso o teste de maleína é utilizado para diagnóstico de mormo?

- ) Como teste complementar em todos os animais.
- ) Como teste de triagem em equídeos com menos de 6 (seis) meses de idade e que apresentem sintomatologia clínica compatível com o mormo, mediante autorização do DSA/SDA/MAPA.
- ) Como teste complementar em equídeos com menos de 6 (seis) meses de idade e que apresentem sintomatologia clínica compatível com o mormo, mediante autorização do DSA/SDA/MAPA.
- ) Como teste complementar exclusivamente em equídeos com menos de 6 (seis) meses de idade e que apresentem sintomatologia clínica compatível com o mormo, mediante autorização do DSA/SDA/MAPA.
- ) Como teste complementar exclusivamente em equídeos com menos de 6 (seis) meses de idade, potros de éguas positivas e que apresentem sintomatologia clínica compatível com o mormo, mediante autorização do DSA/SDA/MAPA.
- ) Nenhuma das anteriores.

16. Quais sinais clínicos podem levar a suspeita de mormo?

- ) Febre, tosse e corrimento nasal.
- ) Linfadenopatia.
- ) Anorexia e sinais gastrointestinais.
- ) Os sinais clínicos apresentados pelo animal infectado são inespecíficos.
- ) Todas as anteriores.
- ) Nenhuma das anteriores.

17. Em caso de óbito do paciente, você costuma realizar ou solicitar a necropsia do equídeo?

- ) Sim.
- ) Não.
- ) Prefiro não informar.

18. Em relação a *Burkholderia mallei*, patógeno causador do mormo e sua resistência ambiental

- ) É extremamente resistente no ambiente.
- ) Tem sobrevivência prolongada em locais molhados ou úmidos.
- ) Resistente a desinfetantes usuais como o hipoclorito de sódio.
- ) Tem sobrevivência prolongada em locais secos.