



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)**  
**REALIZADO NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA EM**  
**PERNAMBUCO (LFDA/PE), BRASIL**

**FREQUÊNCIA DE CASOS DE MORMO EM ASININOS NO BRASIL NO PERÍODO**  
**DE JANEIRO DE 2018 A ABRIL DE 2019**

**JÉSSICA DE CRASTO SOUZA CARVALHO**

**RECIFE, 2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)  
REALIZADO NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA EM  
PERNAMBUCO (LFDA/PE), BRASIL**

**FREQUÊNCIA DE CASOS DE MORMO EM ASININOS NO BRASIL NO PERÍODO  
DE JANEIRO DE 2018 A ABRIL DE 2019**

**Trabalho realizado como exigência parcial  
para a obtenção do grau de Bacharela em  
Medicina Veterinária, sob orientação do  
Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota.**

**JÉSSICA DE CRASTO SOUZA CARVALHO**

**RECIFE, 2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**RELATÓRIO DO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO),  
REALIZADO NO LABORATÓRIO FEDERAL DE DEFESA AGROPECUÁRIA EM  
PERNAMBUCO (LFDA/PE), BRASIL**

**FREQUÊNCIA DE CASOS DE MORMO EM ASININOS NO BRASIL NO PERÍODO  
DE JANEIRO DE 2018 A ABRIL DE 2019**

Relatório elaborado por

**JÉSSICA DE CRASTO SOUZA CARVALHO**

Aprovado em \_\_/\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota**  
**Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE**

---

**Msc. Marcus Vinícius Dias Falcão**  
**Universidade Federal Rural de Pernambuco**

---

**Dr. Jonh Aldson Bezerra Tenório**  
**Laboratório Federal de Defesa Agropecuária**

Dedico este trabalho aos meus pais, Fernanda Elizabeth de Crasto Souza Carvalho e Clevio Marcio Pessôa de Carvalho. Aos meus avós, Aleir Pessôa de Carvalho e Fernando Pereira de Souza e, em especial, Marília de Crasto Souza (*in memoriam*)

## AGRADECIMENTOS

Ao DEUS, Yeshua, agradeço infinitamente o sopro de vida, agradeço por cada direcionamento que deste em minha jornada, por toda providência que fazes e fizestes no meu caminho para que hoje mais uma etapa fosse concluída.

Agradeço aos meus pais, Fernanda e Clevio, por TUDO, pois nada disso seria possível se eu não tivesse o amor e a dedicação de vocês que são a minha maior inspiração. Agradeço a minha avó Marília, voinha; teu colo foi refúgio, tuas palavras tinham sabedoria, teu abraço confortava e teu altruísmo me inspirava, obrigada. Ao meu avô Fernando Pereira que é um exemplo de humildade, te agradeço por todo amor e carinho. Aleir Pêssoa, vó, aprendi um dos valores mais lindos da minha vida com a senhora, que é fazer o bem ao próximo, obrigada por tornar a finalização de mais uma etapa. Agradeço a Taciana Carvalho, Caio Lapa, Socorro Rangel, Cattarina de Crasto, Clecio Carvalho e Clelio Carvalho por estarem sempre presente e auxiliando em cada etapa da minha vida. Agradeço a todos meus familiares que direta ou indiretamente ajudaram no meu caminho e que dão forma a tão bela palavra chamada família.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Rinaldo Aparecido Mota, pela oportunidade ao longo do curso de inserção em uma equipe que agregou tanto profissional como pessoalmente e por toda paciência, dedicação e conhecimento transmitido.

Ao grupo LDIC, Professor Wilton Junior, Professora Erika Samico, Renata, Renato, Jonatas, Muller, Pomy, Nazaré, Marcus, Débora, Gabi Silva, Amanda Noronha, Polly, Allison, Elaine, Jéssica Dantas, Amanda Silva, Ceça, Giva, Raylson, André, Breno, Bruno, Cinthia, Tay, Érica, Glauci, Pedro Paulo, Tânia, Gabi Moura, Samuel, Junior Mário, Amanda Silva, Drika, Grasi e Manu, obrigada por contribuírem com toda ciência e por dividirem boa parte das minhas melhores risadas, vocês foram uma família na rural. Em especial Renata Pimentel (a chefe), Muller Ribeiro, Jonatas Campos, Renato Amorim, Nazaré Santos e Gabriela Silva pela enorme paciência e disponibilidade em me ensinar, pela amizade e por me acolherem tão bem no laboratório.

Agradeço a Universidade Federal Rural de Pernambuco e ao Departamento de Medicina Veterinária. Agradeço a todos os professores ao longo do curso pela contribuição na minha formação, em especial aos professores: Glória Potier, Lílian Andrade, Andrea Alice, Anna Carolina, Evilda, Edvaldo, Rosilda, Fernando Leandro, Betânia e Andrea Paiva.

Agradeço aos colegas da turma SV1: Carol, Burgos, Line, Melo, Gi, Betinho, Camila, Lucas, Débora, Natália, Gabi, Sílvio, Michel, Ana, Sarah, Ana Cris, Lucelena, Marina, Maysa, Douglas (agregado SV3), tive o privilégio de compartilhar quase 6 anos da minha vida com vocês, me considero de uma sorte imensa por ter conhecido pessoas que me ensinaram tanto e levarei grandes amigos dessa jornada, “Sejam bem-vindos ao Rovet”. Em especial Caroline Leite, Bárbara Burgos, Lucas Melo, Alline Priscila, Gislaine Mariel e Sarah Oliveira por dividirem sorrisos e choros nesse caminho, a amizade de vocês foi um presente lindo da Veterinária; Alberto Amaral, obrigada por me suportar nos melhores e piores dias ao longo da construção desse trabalho e obrigada por me ensinar que a ciência também pede uma pausa.

Agradeço a todos da veterinária que fizeram parte do meu caminho, em especial Otávio Bezerra, Thomás Souza, Philipe Ribeiro e Felipe Bezerra. Agradeço a Bárbara Nogueira, por ter me dado a primeira oportunidade de estágio e por todo conhecimento transmitido. Agradeço a todos do Hospital Veterinário, em especial a Fausto, Sandrinha, Edleide, Dona Guiomar, Cleide, Renata, Japa, Claudinha, Seu Ricardo e Anderson.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Defesa Agropecuário de Pernambuco (LFDA/PE) nas pessoas de Jonh, Marcília, Marcele, Cid, Diego, Ilde, Rômulo, Fábio, Marta, Gleyce, André, Sérgio, Burgo, Henrique, Dete, Adriano, Paulo e Cláudia pela oportunidade de aprendizado profissional, pela recepção e convivência maravilhosa ao longo do ESO.

Agradeço aos meus dogs jujuba, estrela, Zipo, minha gata Mimi e, *in memoriam*, Pilar, Bela, Sadate por todo carinho, amor e pureza e por despertarem em mim o amor pelos animais.

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

(1 Coríntios 13:2)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO I

- Gráfico 1** Amostras recebidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco para o diagnóstico de mormo pela técnica de Fixação de Complemento, ELISA e *Western blotting*, no período de março a maio de 2019. 21
- Gráfico 2** Amostras recebidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco para o diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina pela técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar, no período de março a maio de 2019. 22

### CAPÍTULO II

- Figura 1** Achado de Necropsia - Pulmão de asinino positivo para mormo no estado da Bahia. Congestão e consolidação pulmonar destacada no círculo amarelo (LFDA/PE, 2019). 39

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

- Tabela 1** Distribuição geográfica no Brasil das amostras recebidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco para diagnóstico de mormo pelas técnicas sorológicas de Fixação de Complemento, ELISA e *Western blotting*, no período de março a maio de 2019. 21
- Tabela 2** Distribuição geográfica no Brasil das amostras recebidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco para diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina pela técnica sorológica de Imunodifusão em Gel de Ágar, no período de março a maio de 2019. 23
- Tabela 3** Distribuição geográfica no Brasil das amostras recebidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco para diagnóstico de Peste Suína Clássica pela técnica sorológica de Vírusneutralização, no período de março a maio de 2019. 23

### CAPÍTULO II

- Tabela 1** Frequência de casos de mormo em amostras de soro de asininos encaminhadas para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco, no período de janeiro de 2018 a maio de 2019. 38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Ac</b>	Anticorpo
<b>ADAGRO</b>	Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco
<b>Ag</b>	Antígeno
<b>AIE</b>	Anemia Infecciosa Equina
<b>BA</b>	Bahia
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato
<b>BVD</b>	Diarreia Viral Bovina
<b>C.C.PRO</b>	Antígeno alemão
<b>CGAL</b>	Coordenação Geral de Laboratórios Agropecuários
<b>CIDC</b>	Antígeno alemão
<b>GTA</b>	Guia de Transporte Animal
<b>DF</b>	Distrito Federal
<b>DFA</b>	Delegacia Federal de Agricultura
<b>ECP</b>	Efeito Citopático
<b>ELISA</b>	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
<b>EPI</b>	Equipamento de Proteção Individual
<b>ESO</b>	Estágio Supervisionado Obrigatório
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>FC</b>	Fixação de Complemento
<b>GO</b>	Goiás
<b>GTA</b>	Guia de transporte animal
<b>IDGA</b>	Imunodifusão em Gel de Ágar
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IgG</b>	Imunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IN</b>	Instrução Normativa
<b>IP</b>	Imunoperoxidase
<b>LFDA</b>	Laboratório Federal de Defesa Agropecuária
<b>MAPA</b>	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotática de monócitos 1
<b>MG</b>	Minas Gerais
<b>NBT</b>	Nitroblue tetrazolium
<b>NB</b>	Nível de Biossegurança
<b>OESA</b>	Órgãos Executores de Sanidade Agropecuária
<b>OIE</b>	Organização Mundial da Saúde Animal
<b>PA</b>	Pará
<b>PANAFTOSA</b>	Centro Pan-Americano de Febre Aftosa
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase
<b>PE</b>	Pernambuco
<b>PNSE</b>	Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos
<b>PSC</b>	Peste Suína Clássica

<b>RS</b>	Rio Grande do Sul
<b>SC</b>	Santa Catarina
<b>SCP</b>	Soro Controle Positivo
<b>SFA/PE</b>	Superintendência Federal de Agricultura em Pernambuco
<b>SP</b>	São Paulo
<b>SST</b>	Sistema de Secreção Tipo III
<b>SUASA</b>	Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária
<b>UF</b>	Unidade Federativa
<b>UFRPE</b>	Universidade Federal Rural de Pernambuco
<b>UNI/DIA</b>	Unidade de Diagnóstico Animal
<b>VM</b>	Vermelho de Metila
<b>VN</b>	Vírusneutralização
<b>VP</b>	Voges Proskauer
<b>WB</b>	<i>Western blotting</i>
<b>°C</b>	Graus Celsius

## RESUMO

Dentre as atribuições dos Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDAs) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento estão a de realizar análises oficiais e atuar como referência nacional em assuntos laboratoriais. O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado no setor de Unidade de Diagnóstico Animal (UNI/DIA) do LFDA/PE, no período de 12 de março de 2019 a 31 de maio de 2019. O referido estágio objetivou aperfeiçoar os conhecimentos em atividades direcionadas a Medicina Veterinária Preventiva, mais especificamente no âmbito do diagnóstico animal e adquirir conhecimentos técnicos para a conclusão do curso e obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária. Na vivência foram desenvolvidas atividades nas áreas de diagnóstico sorológico de mormo, Anemia Infecciosa Equina (AIE) e Peste Suína Clássica (PSC), isolamento do Vírus da Peste Suína Clássica (PSC), diagnóstico molecular de mormo e PSC bem como diagnóstico sorológico de Leptospirose. A realização do estágio possibilitou o desenvolvimento do trabalho intitulado: **“Frequência de casos de mormo em asininos no Brasil no período de janeiro de 2018 a abril de 2019”**.

**Palavras-chaves:** *Burkholderia mallei*, zoonose, diagnóstico sorológico.

## ABSTRACT

Among the assignments of Federal Laboratories of Agricultural Defense (LFDAs) of Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA) are to carry out official laboratory evaluations and act as a national reference in laboratory subjects. The mandatory supervised internship was conducted at Animal Diagnosis Unity (UNI/DIA) of LFDA/PE, in the period between March, 12th and May, 31th of 2019. This internship aimed to improve knowledge in activities related to Preventive Veterinary Medicine, specifically in the scope of animal diagnosis, in order to acquire new technical knowledge which contribute to course conclusion and to obtain the Bachelor's degree in Veterinary Medicine. In this period, activities were developed in areas of serological diagnosis of glanders, Equine Infectious Anemia (EIA) and Classical Swine Fever (CSF); isolation of Classical Swine Fever Virus (CSF); molecular diagnosis of glanders and CFS; as well as leptospirosis serological diagnosis. The internship accomplishment allowed the development of the entitled work **“Frequency of glanders in asinines from Brazil in the period from january 2018 to april 2019”**.

**Key-Words:** *Burkholderia mallei*, zoonosis, serological diagnosis.

## SUMÁRIO

<b>1. CAPÍTULO I</b>	<b>14</b>
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO	14
1.3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	15
1.3.1 Recebimento e Identificação das amostras	16
1.3.2 Fixação de Complemento, ELISA e <i>Western blotting</i> para o diagnóstico de Mormo	16
1.3.3 Imunodifusão em Gel de Ágar para o diagnóstico de Peste Suína Clássica	19
1.3.4 Vírusneutralização para o diagnóstico de Peste Suína Clássica	20
1.4 DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES	21
1.4.1 Diagnóstico Sorológico de Mormo	21
1.4.2 Diagnóstico Sorológico de Anemia Infecciosa Equina	22
1.4.3 Diagnóstico Sorológico de Peste Suína Clássica	23
1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
1.6 REFERÊNCIAS	24
<b>2. CAPÍTULO II</b>	<b>28</b>
RESUMO	28
2.1 INTRODUÇÃO	28
2.2 REVISÃO DE LITERATURA	29
2.2.1 Etiologia	30
2.2.2 Epidemiologia	30
2.2.3 Patogenia	31
2.2.4 Sinais Clínicos	32
2.2.5 Diagnóstico	33
2.2.5.1 Exame clínico	33
2.2.5.2 Detecção microbiológica	34
2.2.5.3 Detecção molecular	35
2.2.5.4 Testes sorológicos	35

2.2.5.5	Reação imunoalérgica	35
2.2.6	Tratamento	36
2.2.7	Controle e Prevenção	36
2.3	OBJETIVOS	37
2.3.1	Objetivo geral	37
2.4	MATERIAL E MÉTODOS	37
2.4.1	Análise dos resultados de exames para diagnóstico de Mormo	37
2.4.2	Determinação da frequência de casos de Mormo	37
2.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
2.6	CONCLUSÃO	40
2.7	REFERÊNCIAS	40

## **1. CAPÍTULO I**

Relatório do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) realizado no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco (LFDA/PE), Brasil.

### **1.1 INTRODUÇÃO**

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado pela discente Jéssica de Crasto Souza Carvalho do curso de Medicina Veterinária da UFRPE/sede, no setor de Unidade de Diagnóstico Animal (UNI/DIA) do Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco (LFDA/PE), no período de 12 de março de 2019 a 31 de maio de 2019, totalizando uma carga horária de 420 horas, sob supervisão do Médico Veterinário e Auditor Fiscal Federal Agropecuário, Cid Aristóteles de Siqueira Alencar. O referido estágio objetivou inserir a discente no campo de atividades direcionadas à Medicina Veterinária Preventiva, mais especificamente no âmbito do diagnóstico animal para aprimorar os conhecimentos e reunir novas habilidades técnicas para a conclusão do curso e obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

### **1.2 DESCRIÇÃO DO LOCAL**

Os Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária (LFDAs) são os laboratórios oficiais do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, cujas unidades estão localizadas na região Norte, Belém/PA; Nordeste, Recife/PE; Centro-Oeste, Goiânia/GO; Sudeste, Pedro Leopoldo/MG, com unidades avançadas em Belo Horizonte, Andradas e Varginha, em Campinas/SP com unidade avançada em Jundiá; e na região Sul em Porto Alegre/RS, com unidade avançada em São José/SC. O LFDA/PE localiza-se na Rua Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos, CEP: 52171-030 – Recife/PE, regido atualmente pela coordenação da Médica Veterinária Cláudia de Farias Cordeiro e, assim como as demais unidades, é subordinado à Coordenação Geral de Laboratórios Agropecuários – CGAL, em Brasília/DF.

Os LFDAs possuem as seguintes atribuições: realizar análises oficiais; atuar como referência nacional em assuntos laboratoriais; realizar auditorias em laboratórios credenciados; realizar ações de pesquisa, desenvolvimento e inovação em métodos analíticos; atuar como centro regional de difusão de tecnologia e expertise; realizar estudos; bem como manter banco de material de referência. Possuem ação direta no monitoramento, controle e fiscalização de alimentos, bebidas e insumos produzidos e comercializados no Brasil. Fornecem informações para os serviços de inspeção e fiscalização no âmbito analítico, bem como em cooperações,

estudos e projetos de pesquisa voltados para segurança do alimento e a detecção de fraudes econômicas (BRASIL, 2016).

O LFDA/PE é formado por vários setores como a Unidade de Diagnóstico Animal; Laboratório de Microbiologia dos Alimentos e da Água; Laboratório de Resíduos e Contaminantes Orgânicos e Inorgânicos em Alimentos; Laboratório de Análise Físico Química dos Alimentos e Laboratório de Encefalopatias. Além dos setores mencionados, a rede LFDA/PE também é composta pela instalação na Superintendência Federal de Agricultura em Pernambuco (SFA/PE), na qual atuam os Laboratórios de Sementes, Fertilizantes e Bebidas.

A Unidade de Diagnóstico Animal é formada pelos Laboratórios de Bacteriologia, Virologia, Cultivo Celular e Biologia Molecular, que atuam no diagnóstico sorológico do mormo, peste suína clássica (PSC), anemia infecciosa equina (AIE), febre aftosa e leptospirose; isolamento do vírus da PSC e técnicas para diagnóstico diferencial desta enfermidade; isolamento de *Burkholderia mallei*; e diagnóstico molecular do mormo e PSC. Tal unidade possui uma equipe formada por um Auditor Fiscal Federal Agropecuário, cinco técnicos em fiscalização agropecuária, dois auxiliares em fiscalização agropecuária, dois digitadores, um arquivista, três auxiliares em serviços gerais e duas fiscais estaduais agropecuárias.

### **1.3 DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

Primariamente, antes da inserção nas atividades do laboratório, ocorreu a assinatura dos termos de sigilo e confidencialidade, no intuito de firmar o compromisso da discente em não divulgar as informações de procedência e resultados conduzidos dentro do setor, assim como se registrou a assinatura da mesma, visando perfazer as normas estabelecidas no LFDA/PE e, por fim, foram apresentadas as Legislações e Procedimentos de biossegurança necessários para execução das técnicas trabalhadas no local. Desta forma, finalizou-se o treinamento inicial para posterior inserção nas instalações de análise.

Durante a vigência do estágio, as atividades foram desenvolvidas nos seguintes campos abordados pela Unidade de Diagnóstico Animal: diagnóstico sorológico do mormo, AIE, PSC e leptospirose; e diagnóstico molecular do mormo e PSC.

Considerando a rotina vivenciada no decorrer do ESO, o maior vínculo de atividades foi desenvolvido no diagnóstico sorológico do Mormo, cujas técnicas executadas foram Fixação de Complemento (FC), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), *Western blotting* (WB); diagnóstico de AIE por meio de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA). Além destas técnicas,

também acompanhou a realização da técnica de vírusneutralização para diagnóstico de PSC, bem como as técnicas para diagnóstico diferencial para esta enfermidade; diagnóstico molecular para mormo; manutenção de cepas do gênero *Leptospira*; coleta de sangue de carneiro para preparação de hemácias a 2%; processo de triagem no recebimento de amostras, identificação das mesmas; e emissão de resultados.

### **1.3.1 Recebimento e identificação de amostras**

Segundo o guia de recebimento de amostras da Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários, por definição as amostras podem ser amostra oficial, análise exploratória, análise fiscal, amostra de contra prova e análise pericial (BRASIL, 2016). Primariamente, a documentação enviada conjuntamente com a amostra deve garantir a rastreabilidade da mesma. Sendo assim, todas as amostras recebidas devem ter sua identificação registrada em formulário específico ou sistema informatizado apropriado com data e horário do recebimento.

Além da documentação, os demais critérios de aceitação avaliados são: presença ou ausência de lacre e sem sinais de violação; embalagem adequada; estado de conservação aceitável, temperatura igual ou inferior a 8°C; quantidade suficiente, verificar se ocorreu extravasamento; no recebimento de soro, avaliar se a amostra encontra-se hemolisada, sendo este um critério de rejeição; verificar se o número de amostras corresponde ao informado no ofício encaminhado. Todas estas informações devem ser registradas no formulário de recebimento de amostras, junto com a data e hora de entrada, descrição da análise para qual foi encaminhada e o documento deve ser assinado por responsável do recebimento.

As amostras em conformidade com estes critérios são encaminhadas para análise com codificação interna do laboratório, de forma a manter toda a sua cadeia de custódia. As que são consideradas não conformes em relação aos critérios de recebimento são descartadas, gerando-se os registros pertinentes.

As amostras enviadas para o diagnóstico sorológico de mormo devem ser conservadas anterior à análise no máximo 7 dias sob refrigeração e congeladas após este período. Posteriormente, devem ser estocadas em congelador a -20°C, por trinta dias para análise de contraprova (BRASIL, 2018a).

### **1.3.2 Fixação de Complemento, *Western blotting* e ELISA no diagnóstico do Mormo**

Segundo a Portaria nº 35, de 17 de abril de 2018, os testes de triagem para o diagnóstico laboratorial do mormo são a Fixação de Complemento (FC) e Ensaio de Imunoabsorção

Enzimática (ELISA), bem como a amostra com resultado diferente de negativo em qualquer teste de triagem deverá ser testada no método complementar que neste caso é o *Western blotting* - *immunoblotting*, excetuando-se quando o animal se enquadrar na situação prevista no inciso II do Art. 13 da IN Mapa nº 6/2018, a qual descreve que animal com resultado positivo no teste de triagem, estando o animal em uma unidade epidemiológica onde haja foco de mormo e apresentando quadro clínico compatível com mormo, deve ser submetido ao teste confirmatório (BRASIL, 2018).

Segundo a OIE, a Fixação de Complemento consiste em um método de diagnóstico sorológico de eleição para o mormo, por se tratar de um teste com alta sensibilidade e especificidade. Esta Instrução Normativa redige que esta técnica detecta quase que exclusivamente anticorpos IgG classe 1, que são específicos da infecção.

Inicialmente, um soro teste é titulado em diluição seriada e uma quantidade fixa de antígeno é adicionada a cada poço. A presença do anticorpo no antissoro ocasiona a formação de complexos imunes. O complemento é então adicionado à solução, acarretando na reação dos componentes (antígeno, soro teste e complemento). Se os complexos estiverem presentes, o complemento é ativado, sendo fixado e consumido (BRASIL, 2018a).

Na etapa final da reação, as células indicadoras (eritrócitos), juntamente com uma quantidade subaglutinante de anticorpos (anticorpo antieritrócito) são adicionados à mistura. Havendo qualquer complemento remanescente, estas células são lisadas; se o complemento tiver sido consumido na segunda etapa pelos complexos imunes, as células não são lisadas devido à quantidade insuficiente de complemento presente na solução. Ressalta-se que a quantidade de complemento utilizada é apenas suficiente para lisar as hemácias se absolutamente nada do complemento for consumido (BRASIL, 2018a).

São de fundamental importância os controles adequados neste método, visto que algumas preparações de anticorpos consomem complemento sem adição de antígeno, por exemplo, soros que já contêm complexos imunes. Além disso, alguns antígenos podem apresentar atividade anticomplementar. Portanto, os controles devem incluir somente anticorpo e somente antígeno para verificar que nenhum destes esteja, por si só, fixando complemento. O resultado do teste de Fixação de Complemento é baseado no percentual de hemólise dos eritrócitos sensibilizados (BRASIL, 2018a).

A sensibilidade do teste de FC é de pelo menos 97%, entretanto pode variar conforme o antígeno utilizado (Elschner, 2011). Khan et al. (2011), utilizando antígenos CIDC e c.c.pro produzidos na Alemanha, obtiveram 100% e 99,39% de sensibilidade, 97,5% e 96,5% de especificidade, valor preditivo positivo de 97,04% e 100%, bem como valor preditivo negativo de 99,48% e 100%. Utilizando antígeno produzido nos Estado Unidos, a sensibilidade encontrada foi de 62,19%, especificidade de 100%, valor preditivo positivo de 95,88% e valor preditivo negativo de 76,33%.

Considerando a complexidade, reações anti-complementares e baixa padronização, diversos testes sorológicos foram desenvolvidos para superar as desvantagens da FC (RAGHAVAN et al., 2016). O ELISA, quando comparado a Fixação de Complemento, possui algumas vantagens, tais como: ausência de influência anticomplementar, identificação de animais com até quatro dias pós infecção e maior detecção de casos clínicos da enfermidade (AL-ANI et al., 1998). Dentre os ELISA desenvolvidos para o diagnóstico de mormo, estão o ELISA competitivo com alta sensibilidade e especificidade, que possui a vantagem de ser utilizado para vários hospedeiros (SPRAGUE et al., 2009) e o ELISA indireto baseado em fração semi-purificada de *B. mallei* (LAROUCAU et al., 2017).

O *Western blotting* adotado no LFDA/PE denomina-se “WB: Mormo” cujo fabricante é o Centro Pan-Americano de Febre Aftosa (PANAFTOSA). O kit é composto pelo conjunto de reagentes necessários para a realização de um ensaio imunoenzimático que permite a detecção *in vitro* de anticorpos contra a proteína TssB da bactéria *Burkholderia mallei*. Este teste é recomendado na vigilância ativa e passiva da doença, sendo validado para utilização com soros de equinos, muares e asininos (PANAFTOSA, 2018).

Neste teste, a proteína TssB é imobilizada em tiras de nitrocelulose com a finalidade de pesquisar anticorpos anti-*Burkholderia mallei* nos soros. Cada kit possibilita a realização de 108 análises e apresenta os seguintes componentes: BCIP, bula, conjugado, controle negativo, controle positivo, diluente de substrato, *E. coli*, leite em pó, NBT, tampão de lavagem e tiras sensibilizadas. Inicialmente realiza-se a incubação das amostras, seguida pela incubação do conjugado e, por fim a adição do substrato, ressalta-se que entre cada incubação, faz-se o processo de lavagem das tiras (PANAFTOSA, 2018).

A acreditação de testes com alta sensibilidade é de fundamental importância para evitar o deslocamento de animais falso negativos, o que poderia resultar na disseminação do agente pelo território e em nível de fronteiras internacionais. Tal fato pode ocasionar prejuízos na

cadeia de produção equídea; bem como testes com alta especificidade conferem veracidade aos resultados positivos, evitando entraves econômicos gerados por falsos diagnósticos de mormo.

### **1.3.3 Imunodifusão em Gel de Ágar no Diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina**

A Anemia Infecciosa Equina é causada por um retrovírus da família Retroviridae, subfamília Lentivirinae (COOK et al., 2013). Este vírus tem distribuição mundial especialmente em regiões de clima tropical e subtropical, onde existe grande quantidade de vetores (KOLLER et al., 2002).

Segundo a Instrução Normativa nº52, de 26 de junho de 2018, para o diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina, realiza-se as técnicas de IDGA e ELISA a serem adotados pelos laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Laboratórios Agropecuários do Sistema Unificado de Atenção à Sanidade Agropecuária (SUASA), em atendimento ao Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), na forma desta Instrução Normativa (BRASIL, 2018b; BRASIL, 2008).

Desde 1970, o IDGA é utilizado no diagnóstico da AIE, por ser de fácil execução (ISSEL; COGGINS, 1979) e apresentar sensibilidade de 98,8% e especificidade de 100% (COGGINS et al., 1972). A Imunodifusão em Gel de Ágar é uma reação de precipitação entre o antígeno (Ag) e o anticorpo (Ac) específico em meio gelificado, onde ambos os reagentes se difundem um contra o outro, formando uma linha ou arco de precipitação na área de reação. Essa técnica geralmente é feita sobre lâminas de microscopia ou placas de Petri, revestidas com uma camada de gel de ágar de 0,6 a 1,5% em solução fisiológica ou tamponada (Montassier, 2017).

O Art. 11 da IN referenciada descreve que a linha formada com o Soro Controle Positivo (SCP) é a base para a leitura do teste. Se ela não estiver nítida o teste não é válido e deve ser repetido. No resultado negativo as linhas formadas entre o Ag e o SCP se dirigem para a cavidade onde se encontram as amostras testadas, enquanto no resultado positivo as linhas formadas entre o Ag e o SCP se fundem com aquelas formadas pelas amostras testadas e formam uma linha contínua de identidade total. As amostras com resultado positivo na técnica de ELISA deverão ser submetidas à técnica de IDGA em triplicata, na mesma roseta (BRASIL, 2018b).

A linha de precipitação de uma amostra fraca positiva tende a se formar mais próximo à cavidade onde se encontra a amostra que está sendo testada; uma amostra com título alto de

Ac apresenta-se como uma faixa difusa, entre as duas linhas de controle, em casos extremos deve-se repetir a prova, diluindo-se as amostras que apresentaram essas reações, em diluição 1/4 e 1/8; na reação inespecífica não forma uma linha contínua com as do controle, no aparecimento de linha(s) inespecífica(s), a prova deve ser repetida (BRASIL, 2018b).

#### **1.3.4 Vírusneutralização no Diagnóstico de Peste Suína Clássica**

A peste suína clássica é uma doença infectocontagiosa que acomete suínos domésticos e selvagens (BOKLUND, 2009). É causada por um vírus de fita simples, envelopado, pertencente ao gênero *Pestivirus* e família *Flaviviridae* (KING et al., 2011). Trata-se de uma doença de notificação obrigatória à OIE (BRASIL, 2013).

O programa nacional de sanidade dos suídeos determina que as amostras com resultados laboratoriais positivos ou inconclusivos para PSC no teste ELISA devem ser testadas na prova de vírusneutralização (VN) para PSC e Diarreia Viral Bovina (BVD). Caso o resultado da VN para PSC seja positivo, a investigação em curso terá continuidade, com interdição da propriedade. Dentre as desvantagens da VN quando comparada ao teste ELISA destacam-se: dependência do cultivo celular, preocupação com contaminação fúngica e/ou bacteriana e necessidade de uma maior demanda de tempo para leitura dos resultados (NISKANEN et al., 1989).

Os testes de VN são realizados em placas-neutralização de poliestireno de 96 cavidades, utilizando uma diluição constante do soro frente às doses infectantes para 50% dos cultivos celulares. A quantificação dos anticorpos é realizada pela incubação de diluições do soro frente a doses constantes do vírus. Após incubação da mistura soro-vírus, uma suspensão de células é adicionada, seguida de incubação em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C. A leitura dos testes é realizada após a incubação, através do monitoramento do efeito citopático (ECP). Nos testes qualitativos, a ausência de ECP indica neutralização viral na diluição utilizada. Nos testes quantitativos, são considerados títulos de anticorpos neutralizantes as recíprocas das maiores diluições do soro capazes de inibir a replicação viral e a consequente produção de ECP (SCHERER et al., 2002).

Para detecção direta de antígenos virais presentes em cultivos celulares utilizam-se imunomarcadores como a imunoperoxidase (IP) que possui algumas vantagens, como a leitura dos resultados efetuada com microscópio de campo claro, bem uma maior sensibilidade e especificidade (PETTERLE, 2003).

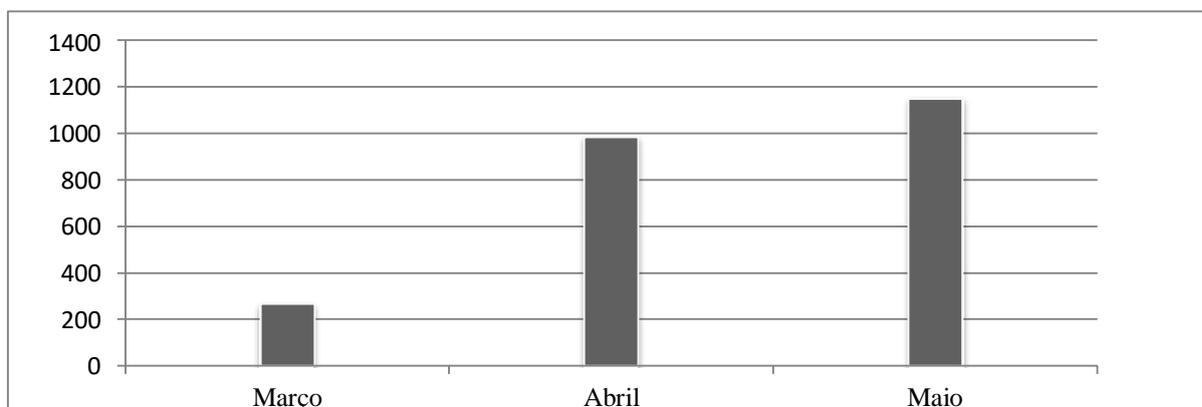
O isolamento e identificação do vírus também podem ser realizados, constituindo, inclusive, um método mais seguro para o diagnóstico da enfermidade. Esta técnica é realizada a partir da inoculação de suspensões de tecido animal suspeito em cultivo de linhagens de células, sendo sua identificação alcançada por técnicas de imunoperoxidase com anticorpos monoclonais das cepas virais que não causam ECP (PETTERLE, 2003).

## 1.4 DISCUSSÃO DAS ATIVIDADES

### 1.4.2 Diagnóstico Sorológico do Mormo

No período de vigência do estágio foram recebidas 2.397 amostras para o diagnóstico sorológico de mormo em equinos, asininos e muares (Gráfico 1), das quais a maior demanda foi proveniente do estado da Bahia (BA), com um total de 45,72% (1.096/2.397) das amostras enviadas, seguido por Minas Gerais com 22,74% (545/2.397), e em terceiro lugar São Paulo com 19,73% (473/2.397) (Tabela 1).

**Gráfico 1** - Amostras recebidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco para o diagnóstico de mormo pela técnica de Fixação de Complemento, ELISA e *Western blotting*, no período de março a maio de 2019.



Fonte: UNI/DIA – LFDA/PE (2019).

**Tabela 1** - Distribuição geográfica no Brasil das amostras recebidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco para diagnóstico de mormo pelas técnicas sorológicas de Fixação de Complemento, ELISA e *Western blotting*, no período de março a maio de 2019.

Estados	Número de Amostras
Bahia	1096 (45,73%)
Ceará	50 (2,08%)
Minas Gerais	545 (22,74%)
Mato Grosso	145 (6,06%)
Pernambuco	59 (2,46%)
Rio Grande do Norte	29 (1,2%)
São Paulo	473 (19,73%)
Total	2.397 (100%)

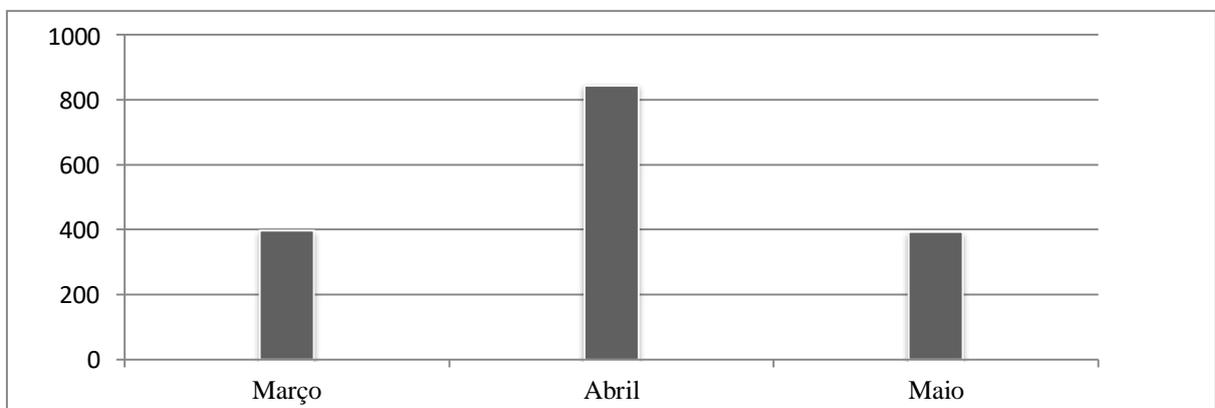
Fonte: UNI/DIA – LFDA/PE (2019).

A superioridade no envio de amostras pelo estado da BA foi decorrente a um foco de mormo em asininos neste local. Entretanto, nos anos de 2016 e 2017, o seis estados com maior envio foram: Rio Grande do Sul responsável por 18,91% (2.151/11.370) das amostras, seguido por 18,02% de Minas Gerais (2.049/11.370), 17,18% de Mato Grosso (1.952/11.370), 14,25% de Mato Grosso do Sul (1.621/11.370), 8,0% de Pernambuco (910/11.370) e 5,87% de São Paulo (668/11.370), enquanto que a Bahia foi responsável pelo envio de 1,31% (149/11.370) das amostras.

### 1.4.3 Diagnóstico Sorológico de Anemia Infecciosa Equina

Durante a realização do estágio foram recebidas 1.546 amostras para o diagnóstico de AIE (Gráfico 2). Através da análise de dados da UNI/DIA do LFDA/PE, observou-se que a maior demanda de amostras recebidas para processamento foi oriunda do estado de Pernambuco (Tabela 2). Esta superioridade no envio está diretamente relacionada ao encaminhamento de soros coletados pela ADAGRO, que atua diretamente na sanidade equídea do estado.

**Gráfico 2** - Amostras recebidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco para o diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina pela técnica de Imunodifusão em Gel de Ágar, no período de março a maio de 2019.



Fonte: UNI/DIA – LFDA/PE (2019).

**Tabela 2** - Distribuição geográfica no Brasil das amostras recebidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco para diagnóstico de AIE pela técnica sorológica de Imunodifusão em Gel de Ágar (IDGA), no período de março a maio de 2019.

<b>Estados</b>	<b>Número de Amostras</b>
Alagoas	40 (2,60%)
Bahia	688 (44,50%)
Ceará	9 (0,58%)
Mato Grosso	6 (0,40%)
Paraíba	26 (1,69%)
Pernambuco	732 (47,3%)
Rio Grande do Norte	26 (1,69%)
Sergipe	19 (1,24%)
<b>Total</b>	<b>1.546 (100%)</b>

Fonte: UNI/DIA – LFDA/PE (2019).

No Brasil, a doença é relatada desde 1968 nos estados do Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (SILVA et al., 2001). Na região nordeste, a frequência de equídeos soropositivos no estado da Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará submetidos ao controle oficial pelo MAPA foi de 2,69% (151/5.615) (SILVA et al., 2013).

#### 1.4.4 Diagnóstico Sorológico de Peste Suína Clássica

Durante a realização do estágio foram recebidas vinte amostras para o diagnóstico de Peste Suína Clássica. Através da análise de dados da UNI/DIA do LFDA/PE, observou-se que a maior demanda de amostras recebidas para processamento foi oriunda do estado de Minas Gerais, localizado no Sudeste do Brasil (Tabela 3). As cinco amostras cuja procedência não foi identificada, trata-se de material que foi enviado ao laboratório para ensaio de proficiência.

**Tabela 3** - Distribuição geográfica no Brasil das amostras recebidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco para diagnóstico de Peste Suína Clássica pela técnica sorológica de Vírusneutralização, no período de março a maio de 2019.

<b>Estados</b>	<b>Número de Amostras</b>
Mato Grosso	2 (10%)
Santa Catarina	2 (10%)
Piauí	5 (25%)
Minas Gerais	6 (30%)
Não informado	5 (25%)
<b>Total</b>	<b>20 (100%)</b>

Fonte: UNI/DIA – LFDA/PE (2019).

De 1999 a 2009, 34,23% (51/149) suínos foram diagnosticados para PSC na região norte e nordeste do país, sendo que estes casos estavam distribuídos nos estados do Amapá, Pará, Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco, demonstrando a presença do

vírus no território nacional (SILVA et al., 2016). Entretanto, neste estudo não foi possível determinar com clareza a verdadeira distribuição espacial e temporal dos surtos nas populações, visto que as amostras utilizadas foram obtidas de vigilância passiva para enfermidade, podendo ocorrer subnotificação da infecção pelo vírus (SILVA et al., 2016).

Considerando que a maior demanda de amostras foi proveniente do estado de Minas Gerais, segundo o MAPA, em 2018, apenas um caso de PSC foi diagnosticado no estado, em contrapartida 50 casos foram confirmados de 2016 a 2017 (BRASIL, 2018c).

## 1.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Estágio Supervisionado Obrigatório possibilitou a inserção no campo analítico de diagnóstico sorológico, especialmente de mormo e Anemia Infecciosa Equina, possibilitando a absorção de conhecimentos técnicos laboratoriais baseados nas Instruções Normativas instituídas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para o diagnóstico de enfermidades de notificação obrigatória aos órgãos oficiais.

A vivência tornou-se de extrema importância para complementação da formação acadêmica e obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, visto que agregou conhecimentos teóricos e práticos contemplados ao longo do curso e trabalhados de forma conjunta durante a realização do estágio. A área de maior destaque abordada foi de medicina veterinária preventiva, cujo enfoque foi o diagnóstico de doenças infectocontagiosas.

Por fim, desenvolveu-se, através da vivência obtida, o trabalho intitulado “Frequência de casos de mormo em asininos no Brasil no período de janeiro de 2018 a abril de 2019”, fornecendo dados que beneficiam a cadeia equídea.

## 1.6 REFERÊNCIAS

AL-ANI, FK; AL-RAWASHDEH, OF; ALI, AH; HASSAN, FK. 1998: Glanders in horses: clinical, biochemical and serological studies in Iraq. **Veterinarski Arhiv**, n.68, p. 155–162, 1998.

BOKLUND, A. et al. Comparing the epidemiological and economic effects of control strategies against classical swine fever in Denmark. **Preventive Veterinary Medicine**, v.90, n. 3-4, p. 180-93, 2009.

BRASIL. Instrução Normativa Nº 17, de 8 de maio de 2008. Instituir o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos -PNSE, no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 2008. Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº52, de 26 de junho de 2018. Define os requisitos e critérios para a realização do diagnóstico de Anemia Infecciosa Equina no Território Nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.9-10, 27 de novembro, 2018b. Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa nº6, de 16 de janeiro de 2018. Estabelece as Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do mormo no Território Nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.3, 17 de janeiro, 2018a. Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Laboratórios Federais de Defesa Agropecuária – LFDAs. 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/laboratorios/lanagros>>. Acesso em: 26 de junho de 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Situação mundial da Peste Suína Clássica (PSC) e Peste Suína Africana (PSA) 2018. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/2018/copy\\_of\\_37a-ro/psa-e-psc.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/2018/copy_of_37a-ro/psa-e-psc.pdf)>. Acesso em: 16 de julho de 2019.

BRASIL. Portaria nº35, de 17 de janeiro de 2018. Define os testes laboratoriais a serem empregados para o diagnóstico do mormo no Território Nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 77, p.6, 23 de abril. Seção 1.

COGGINS, L; NORCROSS, NL; NUSBAUM, SR. Diagnosis of equine infectious anaemia by immunodiffusion test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.33, p. 11-18, 1972.

COOK, RF; LEROUX, C; ISSEL, CJ. Equine infectious anemia and equine infectious anemia virus in 2013: a review. **Veterinary Microbiology**, v. 187, p. 181-204, 2013.

ELSCHNER, M. et al. Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. **BMC Veterinary Research**, v.7, p.4, 2011.

ISSEL, CJ; COGGINS, L. Equine infectious anemia: current knowledge. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 174, n.7, p. 727-733, 1979.

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

KING, AMQ; et al. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virology Division of the International Union of Microbiological Societies (IUMS). **Elsevier Academic Press**, San Diego, p. 1375, 2011.

KOLLER, WW; BARROS, ATM; GOMES, A; MADRUGA, CR; ARAÚJO CP; UMAKI, A; ISMAEL, APK. Sazonalidade de tabanídeos (Diptera: Tabanidae) em área de transmissão entre cerrado e pantanal, no Mato Grosso do Sul, Brasil. **12º Congresso de Parasitologia Veterinária, Rio de Janeiro, Programas e Resumos**, Rio de Janeiro, 2002.

LAROUCAU, K; BERTIN, C; ROCHE, M; COLANERI, C; MADANI, N; POURQUIER, P; et al. A new ELISA assay for glanders diagnosis. **Arbeits- und Fortbildungstagung der DVG-Fachgruppe AVID**, 2017.

MONTASSIER, H.J. **Técnica de Imunodifusão para a Detecção de Anticorpos Precipitantes contra Antígenos Solúveis**. 2017. Disponível em: <<https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/tecnica-de-imunodifusao-v-f-set-24-17.pdf>>. Acesso em: 14 de julho de 2019.

NISKANEN, R; ALENIUS, S; LARSSON, B; JUNTTI, N. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. **Journal of Veterinary Medicine**, Berlin, v.36, p. 113-118, 1989.

OIE. World Organisation for Animal Health. **Technical disease cards: glanders**. 2018. Disponível em: <[http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal\\_Health\\_in\\_the\\_World/docs/pdf/Disease\\_cards/GLANDERS.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Disease_cards/GLANDERS.pdf)> . Acesso em: 15 de junho de 2019.

PETTERLE, TN. Trabalho de Conclusão do Curso, **Diagnóstico Viroológico - Técnicas**. 2003.

RAGHAVAN, R; SYRIAC, G; WERNERY, R; ELSCHNER, M; MAWHINNEY, I; WERNERY, U. Comparative test performance of different serological tests for glanders. **Journal of Equine Veterinary Science**.2016

SCHERER, CFC et al . Técnica rápida de neutralização viral para a detecção de anticorpos contra o vírus da Diarréia Viral Bovina (BVDV) no leite. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 2, p. 45-50, 2002.

SILVA, C; PEQUENO, N; CLEMENTINO, I. J; AZEVEDO, S; SILVA, A. Frequência de anemia infecciosa equina em equinos nos estados da Paraíba, Rio Grande do Norte e Ceará durante o ano de 2010. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 1, p.12-17, 2013.

SILVA, MNF; et al. Identification and genetic characterization of classical swine fever virus isolates in Brazil: a new subgenotype. **Archives of Virology**, 2016.

SILVA, RAMS; ABREU, UGP; BARROS, ATM. Anemia Infecciosa Equina: Epizootiologia, Prevenção e Controle no Pantanal. **Círculo Técnico nº29, Embrapa Pantanal**, Corumbá, MS, p. 32, 2001.

SPRAGUE, LD; ZACHARIAH, R; NEUBAUER, H; WERNERY, R; JOSEPH, M; SCHOLZ, HC; et al. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. **BMC Veterinary Research**, n.5, p. 32, 2009.

## 2. CAPÍTULO II

Frequência de casos de mormo em asininos no Brasil no período de janeiro de 2018 a abril de 2019.

### RESUMO

O mormo é uma doença infectocontagiosa de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial, de caráter agudo ou crônico e que acomete principalmente os equídeos. No Brasil, os testes de triagem para o diagnóstico laboratorial desta enfermidade são a Fixação de Complemento ou ELISA e o teste confirmatório é o *Western blotting*. Objetivou-se nesse estudo determinar a frequência de casos positivos de mormo em asininos no Brasil no período de janeiro de 2018 a abril de 2019, a partir do diagnóstico realizado no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Pernambuco (LFDA/PE). Para tal foram analisados os resultados obtidos do diagnóstico de mormo nas técnicas de FC, ELISA e WB e calculou-se a frequência dos casos positivos. Foram recebidas 1.073 amostras para diagnóstico de mormo no período de janeiro de 2018 a abril de 2019 e o estado da Bahia foi responsável pela maior demanda de envio, totalizando 64,86 % (696/1.073) das amostras, seguido pelo estado de Minas Gerais com 30,7% (329/1.073). Detectou-se uma frequência de 0,74% (8/1.073) e, considerando a exclusividade de casos positivos no estado da Bahia, a frequência neste estado foi de 1,14% (8/696). Conclui-se que houve uma baixa frequência de casos de mormo em asininos no território brasileiro no período analisado, com maior concentração de casos da enfermidade na região Nordeste do país.

**Palavras chaves:** Sorologia; *Burkholderia mallei*; zoonose

### 2.1 INTRODUÇÃO

O mormo é uma doença infectocontagiosa, zoonótica, de caráter agudo ou crônico, que acomete principalmente os equídeos, entretanto também pode acometer o homem, carnívoros e, eventualmente, os pequenos ruminantes. Popularmente conhecida como catarro de burro, catarro de mormo, lamparão, garrotilho atípico e cancro nasal, é causada pelo bacilo Gram-negativo denominado *B. mallei* e caracteriza-se por ser uma enfermidade piogranulomatosa que ocasiona lesões respiratórias, linfáticas e cutâneas (MOTA, 2006).

Considerada uma das mais antigas doenças dos equídeos, cujos relatos datam do século III e IV a.C. por Hipócrates e Aristóteles que inicialmente foi denominada *melis* e depois por *malleus* na versão latina (BLANCOU, 1994). A enfermidade foi amplamente difundida durante

a idade média, devido às diversas guerras, reduzindo tal expansão no início do século XX, visto que o transporte animal foi substituído pelo motorizado (NAUREEN et al., 2007). Clinicamente a doença caracteriza-se por febre, tosse e corrimento nasal. Primariamente, as lesões nodulares evoluem para úlceras, que após a cicatrização formam lesões em forma de estrela, ocorrendo com maior frequência na forma crônica da doença, caracterizada pela forma cutânea, linfática e respiratória (MOTA, 2006).

Segundo a Instrução Normativa nº6 de 16 de janeiro de 2018 e IN nº50 de 24 de setembro de 2013, o mormo é uma doença de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial, composto pelas unidades do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e pelos Órgãos Estaduais de Defesa Sanitária Animal, no intuito de preservar a saúde animal no Brasil. Devido ao seu impacto sobre o comércio internacional de animais e seus subprodutos, é uma das doenças animais de declaração obrigatória para a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE, 2018).

O Brasil possui o maior rebanho de equinos (*Equus caballus*) da América Latina e o terceiro mundial, com aproximadamente 6 milhões de animais e quando somados aos asininos (*Equus asininus*) e muares (*Equus asinus* × *Equus caballus*), totalizam cerca de 8 milhões de cabeças, movimentando em média 7,3 bilhões de reais (IBGE, 2017). O mormo ocasiona grandes prejuízos aos proprietários, pois segundo a Instrução Normativa nº6 de 16 de janeiro de 2018, a medida obrigatória para os casos positivos é a eutanásia (BRASIL, 2018a).

Segundo a Portaria nº 35, de 17 de abril de 2018, os testes de triagem para o diagnóstico laboratorial do mormo são a Fixação de Complemento (FC), Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA), bem como amostra com resultado diferente de negativo em qualquer teste de triagem deverá ser testada no método complementar, o *Western blotting- imunoblotting* (WB), excetuando-se quando o animal se enquadrar na situação prevista no inciso II do Art. 13 da IN Mapa nº 6/2018, na qual resultado positivo no teste de triagem, estando o animal em uma unidade epidemiológica onde haja foco de mormo e apresentando quadro clínico compatível com mormo, deve ser submetido ao diagnóstico confirmatório.

A análise dos casos de mormo em asininos no país é importante para compreensão do comportamento e da distribuição da enfermidade no território nacional e para orientação na implementação de medidas controle e erradicação desta zoonose.

## **2.2 REVISÃO DE LITERATURA**

### 2.2.1 Etiologia

O agente etiológico do mormo é *Burkholderia mallei*, bactéria que morfológicamente se apresenta como cocobacilo Gram-negativo irregular, isolado ou em pequenas cadeias, medindo de 2 a 5 µm de comprimento por 0,5 µm de espessura, imóvel e não formadora de esporos (MOTA, 2006). Na nomenclatura é considerada uma proteobactéria do grupo betaproteobactéria, ordem Burkholderiales, família Burkholderiaceae, gênero Burkholderia, espécie *Burkholderia mallei* (*B. mallei*) (NCBI, 2019).

### 2.2.2 Epidemiologia

O mormo persiste em vários países asiáticos, africanos e sul-americanos (OIE, 2018). No Brasil esta zoonose foi descrita pela primeira vez em 1811, sendo introduzida, possivelmente, por animais infectados importados da Europa (PIMENTEL, 1938). Após erradicação no país em 1968, relatou-se, após 30 anos, a ocorrência em equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas, Nordeste do Brasil (MOTA et al., 2000). Desde 2005 até 2017 vários casos desta zoonose ocorreram em diferentes regiões do país, suspeitando-se que a mesma nunca tenha sido erradicada (MOTA et al., 2000). De janeiro de 2005 até dezembro de 2016, 697 focos de mormo foram registrados no país, sendo que a região Nordeste detém de 61,4% (428/697) do total (FONSECA-RODRÍGUEZ; JÚNIOR; MOTA, 2019).

*Burkholderia mallei* pode acometer diversas espécies animais, inclusive o ser humano, podendo ser utilizada inclusive como arma biológica, sendo considerada uma importante zoonose (SRINIVASAN et al., 2001). Dentre os hospedeiros, os equídeos (equinos, muares e asininos) são as espécies domésticas mais suscetíveis à forma sintomática da doença. Entretanto, ocasionalmente, também acomete ovinos, caprinos, cães e gatos, enquanto que bovinos, suínos e aves são considerados resistentes. Além destes, verifica-se a ocorrência em animais silvestres como camelídeos e leões, e em animais de laboratório como hamsters, cobaios, ratos e camundongos (FRITZ et al., 2000; MOTA; RIBEIRO, 2016).

Entre os solípedes, os burros e jumentos são considerados mais sensíveis à forma clínica da enfermidade, as mulas têm sensibilidade intermediária e os cavalos demonstram alguma resistência, manifestada pelo aparecimento de formas crônicas da doença (FRITZ et al., 2000). Além disso, a doença acomete principalmente animais idosos, debilitados e submetidos a estresse (MOTA, 2000). Desta forma, animais infectados e portadores assintomáticos são importantes fontes de infecção para o plantel (MOTA, 2006).

Apesar da maior resistência pelos equinos quando comparado a outros equídeos, por meio de avaliação hematológica, verificou-se que asininos possuem uma maior quantidade de leucócitos, seguido por muares e equinos. Entretanto, com relação ao hematócrito e níveis de hemoglobina sérica, equinos possuem maior quantidade, seguido por muares e, por fim, asininos. Demais valores hematológicos e bioquímicos não apresentam diferença significativa entre as espécies (GU et al., 2007).

A principal via de infecção é a digestiva, porém também pode ocorrer pelas vias respiratória, cutânea e genital (RADOSTITS et al., 2002; MOTA, 2006). As principais vias de excreção da bactéria são orais e nasais, subsequente à ruptura das lesões pulmonares crônicas nos brônquios, sendo assim a disseminação ocorre principalmente pela contaminação de forragens, cochos e bebedouros por secreção oral e nasal (RADOSTITS et al., 2010).

Os principais fatores de riscos associados ao mormo são a movimentação de equídeos que participam de eventos esportivos, manejo higiênico-sanitário, introdução de animais infectados em propriedades livres da doença (AL-ANI e ROBERSON, 2007), proximidade entre domicílios e grande quantidade de animais (GHORIA et al., 2017), compartilhamento de fonte de comida, água, pastagens e materiais de uso comum entre os animais (LANGENEGGER et al., 1960).

### **2.2.3 Patogenia**

Após ingestão de alimento ou água contaminados, a bactéria atravessa a mucosa intestinal e atinge os linfonodos, onde se prolifera e dissemina-se para órgãos de eleição através da corrente sanguínea. O agente se coloniza nos pulmões, pele e mucosas, sendo que a localização pulmonar do bacilo pode ocorrer através da via sanguínea ou da penetração pelas vias aéreas superiores. Na faringe, formam-se lesões primárias, estendendo-se para o sistema linfático onde produz lesões nodulares; no septo nasal podem ocorrer erosões e úlceras (MOTA et al., 2000). Lesões semelhantes piogranulomatosa também são encontradas nos pulmões, baço, fígado e na pele (MOTA, 2006).

*B. mallei* é um patógeno intracelular facultativo, que pode sobreviver e replicar em linhagens de células fagocíticas (ROWLAND et al., 2006; WHITLOCK et al., 2009). Esta bactéria penetra nos macrófagos alveolares, possivelmente intermediado pelo receptor Fc do complemento onde permanece livre da ação dos mecanismos imunes inatos, o que contribui para a sua disseminação por meio da penetração no leito capilar do interstício pulmonar

(WHITLOCK et al., 2009). Isto possibilita o alcance dos linfonodos regionais e a motilidade intracelular depende da polimerização da actina que auxilia o movimento dentro e entre as células hospedeiras (STEVENS et al., 2005; WHITLOCK et al., 2009).

A infecção por esta bactéria induz a produção rápida e intensa de interferon- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) no baço, bem como de citocinas especialmente interleucina-6 (IL-6), IL-12, IL-18, IL-27 e proteínas quimiotáticas de monócitos-1 (MCP-1), sendo estas respostas importantes na defesa do organismo contra a infecção (ROWLAND et al., 2006).

#### **2.2.4 Sinais Clínicos**

O período de incubação depende da virulência da bactéria, do tipo e da intensidade da infecção e da resistência do animal, variando de alguns dias a vários meses (ACHA; SZYFRES, 2003). Em solípedes, principais hospedeiros suscetíveis de *B. mallei*, o mormo pode se manifestar de forma aguda, subaguda ou crônica (GILAD et al., 2007), raramente ocorrendo a forma superaguda, observada principalmente em animais desnutridos, imunossuprimidos e estressados (ACHA; SZYFRES, 2003).

Os sinais clínicos mais frequentes são febre, tosse e secreção nasal, podendo na fase aguda apresentar edema em região peitoral e vir a óbito em 48 horas (MOTA et al., 2000). Na forma aguda da doença, observa-se febre alta, diminuição do apetite, tosse, dispneia progressiva, emaciação, ulceração do septo nasal, acompanhada de descarga nasal, inicialmente serosa, tornando-se mucopurulenta a hemorrágica, nódulos nas cavidades nasais e descargas oculares purulentas, cuja morte por septicemia ocorre em poucos dias (MOTA et al., 2000), ocorrendo principalmente em asininos, que são mais susceptíveis (DVORAK et al., 2008). Em outros animais, na fase inicial da doença, podem apresentar apenas semiflexão e abdução do membro posterior (LARSEN; JOHNSON, 2009).

A fase crônica da doença, que pode desenvolver-se após semanas ou meses, é caracterizada por três tipos de manifestações clínicas: a nasal, a pulmonar e a cutânea, porém estas não são distintas e o mesmo animal pode apresentar simultaneamente todas as formas, sendo a forma pulmonar e cutânea as mais comuns em surtos da doença (MOTA; RIBEIRO, 2016).

Na forma cutânea ocorre o aumento de volume dos linfonodos das regiões do pescoço, principalmente dos linfonodos submaxilares que comumente estão edemaciados e doloridos, espessamento dos vasos linfáticos da face que ulceram e drenam secreção purulenta e

adenopatia; a forma pulmonar ocasiona pneumonia lobar com abscedação cavernosa e desenvolvimento de pleurite fibrinosa; também nota-se a presença de lesões no septo nasal, que se iniciam com nódulos e evoluem para úlceras que no processo de cicatrização formam cicatrizes em forma de estrela (ITO et al. 2008, LARSEN; JOHNSON, 2009, SANTOS et al., 2001). Os equídeos também podem sofrer infecção latente, apresentando descarga nasal, ocasionalmente respiração laboriosa e lesões pulmonares (ITO et al. 2008; LARSEN; JOHNSON, 2009).

### **2.2.5 Diagnóstico**

O diagnóstico do mormo é feito pelo exame clínico, dados epidemiológicos e identificação do agente por isolamento ou caracterização molecular, reação imunoalérgica e testes sorológicos (MOTA, 2006).

Considera-se caso positivo de mormo o equídeo que apresentar pelo menos uma das seguintes condições: resultado positivo nos testes de triagem e complementar de diagnóstico ou somente no teste complementar; resultado positivo no teste de triagem, estando o animal em uma unidade epidemiológica onde haja foco de mormo e apresentando quadro clínico compatível com mormo; ou detecção da bactéria *Burkholderia mallei* por meio de método microbiológico ou molecular, porém a ausência de detecção da bactéria por estas duas técnicas, não anula o disposto de identificar como animal positivo pelos testes sorológicos (BRASIL, 2018a).

Os animais positivos devem ser sacrificados pelo serviço oficial, bem como todo plantel deve ser submetido ao teste de FC com intervalo de 21 (vinte e um) a 30 (trinta) dias entre as coletas, com prazo máximo de 30 (trinta) dias para a primeira coleta. Após dois resultados negativos, a interdição é suspensa. Potros com idade inferior a 6 (seis) meses de idade, filhos de éguas positivas para mormo deverão ser examinados clinicamente e, caso não apresentem sintomas de mormo devem ser mantidos isolados e submetidos a testes sorológicos ao completarem 6 (seis) meses de vida (BRASIL, 2018a)

#### **2.2.5.1 Exame Clínico**

O exame clínico raramente possibilita um diagnóstico seguro; os sinais clínicos do mormo podem estar ausentes ou pouco desenvolvidos, principalmente na evolução crônica, frequente em cavalos. Desta forma, o diagnóstico laboratorial é fundamental para confirmar os achados do exame clínico. Deve-se realizar o diagnóstico diferencial com garrotilho,

tuberculose, linfangite epizoótica, linfangite ulcerativa, esporotricose, rinosporidiose e anemia infecciosa equina (MOTA; RIBEIRO, 2016).

#### **2.2.5.2 Detecção microbiológica**

O patógeno se desenvolve bem em meios que contêm glicerol ou sangue, portanto, pode ser isolado em meio de ágar sangue ovino (5%) desfibrinado, após incubação de 48 horas em aerobiose a 37°C, mostrando colônias de 1 mm de diâmetro, irregulares, mucóides, brilhantes, não hemolíticas e de tonalidade branco acinzentada. Em ágar batata glicerinada produz pigmento amarelado, adquirindo coloração achocolatada após 48 horas de incubação a 37°C; no ágar PC, que contém cristal violeta, sais biliares, ticarcilina e polimixina B, permite crescimento de *B. mallei* que modifica a coloração do meio para rosa, produzindo colônias circulares, lisas, brancas ou translúcidas, menores de 1 mm (MOTA et al., 2000; SILVA et al., 2009; SAID; JUNIOR; DOMINGUES, 2016). Este microrganismo cora-se fracamente pelo corante de Gram, logo se recomenda utilizar corantes contendo hidróxido de potássio ou ácido fênico, como o azul de metileno de Loeffler e a fucsina fenicada (DITTMANN et al., 2015; MOTA et al., 2005).

Nas provas bioquímicas utilizadas para caracterizar as bactérias, observa-se os seguintes resultados: oxidase e catalase positivas, redução do nitrato, hidrólise da ureia, descarboxilização da lisina e fermentação da glicose, sendo negativa para a produção de H<sub>2</sub>S, indol, não utiliza citrato e não fermenta maltose, lactose, manose e manitol, além de não reagirem ao vermelho de metila (VM) e Voges Proskauer (VP) (AL-ANI et al., 2007; SILVA et al., 2009). São sensíveis à ação da luz solar, calor e desinfetantes comuns e dificilmente sobrevivem em ambientes contaminados por mais de seis semanas (RADOSTITS et al., 2002).

Por causa do baixo número de bactérias no tecido infectado, nos abscessos e em pus excretado, o cultivo do patógeno em meios líquidos ou sólidos é frequentemente negativo, além de demandar maior tempo para um resultado conclusivo. Se o material é originário de animais com doença sem sinais clínicos ou em casos crônicos o isolamento bacteriológico fica ainda mais difícil (ARUN et al., 1999). Além disso, ao optar pelo processamento da amostra suspeita de *B. mallei* para inoculação em meio de cultura, deve-se considerar o risco biológico apresentado pela bactéria, logo estas técnicas devem ser realizadas em cabine de segurança biológica e em área de contenção NB3 (BRASIL, 2017). Desta forma, torna-se pertinente avaliar qual método de diagnóstico fornece uma maior segurança e eficácia na aplicabilidade.

#### **2.2.5.4 Detecção molecular**

Estudos genéticos demonstraram que existem cerca de 650 genes relacionados à virulência do agente, dentre estes se destacam os genes: T3SS, CAP, sistema de secreção tipo III e sistema T6S (SCHELL; LIPSCOMB; DESHAZER, 2008). Além disto, outro fator importante na virulência da bactéria é a cápsula polissacarídea, bem como o gene *wcbF* importante na produção do polissacarídeo capsular (WHITLOCK; MARK ESTES; TORRES, 2007). No Brasil, existe uma grande variabilidade intra e interespecies de *B. mallei* e *B. pseudomallei* e tal heterogeneidade do perfil ribotípico foi confirmada no polimorfismo de DNA observado, sendo assim estas diferenças são úteis na diferenciação molecular da bactéria frente à identificação molecular das cepas de *B. mallei* (SILVA et al., 2009).

#### **2.2.5.4 Testes sorológicos**

Segundo a Portaria nº 35, de 17 de abril de 2018, os testes sorológicos de triagem para o diagnóstico laboratorial do mormo são a Fixação de Complemento e ELISA, bem como amostra com resultado diferente de negativo em qualquer teste de triagem deverá ser testada no método complementar, utilizando o *Western blotting - imunoblotting*, excetuando-se quando o animal se enquadrar na situação prevista no inciso II do Art. 13 da IN Mapa nº 6, de 16 de janeiro de 2018 (BRASIL, 2018b).

Os resultados dos exames sorológicos de mormo são emitidos em formulários próprios de acordo com o fluxograma determinado. Resultados positivos devem ser imediatamente e exclusivamente comunicados ao Serviço de Sanidade Animal (SSA) da Delegacia Federal de Agricultura (DFA) da Unidade Federativa onde se encontra o animal reagente, que deverá comunicar, oficialmente, o interessado. A DFA local poderá determinar que a comunicação seja feita diretamente ao órgão executor. Resultado negativo é comunicado ao médico veterinário que assinou o pedido de exame e/ou interessado. Apenas o responsável técnico ou seu substituto pode assinar o formulário de resultado do exame e o relatório mensal (BRASIL, 2018a).

#### **2.2.5.5 Reação imunoalérgica**

Segundo a Portaria nº35, 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 6 (seis) meses de idade e que apresentem sintomatologia clínica compatível com o mormo, mediante autorização do DSA/SDA/MAPA (BRASIL, 2018b).

### **2.2.6 Tratamento**

Segundo a Instrução Normativa nº6 de 16 de janeiro de 2018, o tratamento de animais acometidos não é indicado, pois não há eficácia para a eliminação do agente nos animais portadores, logo permanecem fonte de infecção para outros animais e para o homem, conseqüentemente contribuindo para disseminação do agente. O mecanismo intracelular é crucial para a virulência e têm sido o foco de pesquisas para compreensão da patogênese e mecanismos terapêuticos (WHITLOCK et al., 2007).

### **2.2.7 Controle e Prevenção**

O Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE) visa o fortalecimento do complexo agropecuário dos equídeos, por meio de ações de vigilância e Defesa Sanitária Animal. Objetivando prevenir, controlar ou erradicar doenças dos equídeos, o PNSE promove as seguintes atividades: educação sanitária, estudos epidemiológicos, fiscalização e controle do trânsito de equídeos, cadastramento, fiscalização e certificação sanitária de estabelecimentos e intervenção imediata quando da suspeita ou ocorrência de notificação obrigatória (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2008).

As diretrizes gerais para prevenção, controle e erradicação do mormo no território nacional, no âmbito do PNSE estão descritas na Instrução Normativa Nº 6, de 16 de janeiro de 2018 e os Órgãos Executores de Sanidade Agropecuária (OESA) podem estabelecer essas diretrizes específicas em cada Unidade da Federação (UF), conforme a situação epidemiológica da doença (BRASIL, 2018a; BRASIL, 2008).

De acordo com a Instrução Normativa nº6, de 16 de janeiro de 2018, as normas para erradicação e controle do mormo baseiam-se na interdição e regime de saneamento em propriedades com um ou mais animais diagnosticados com mormo, cuja suspensão da interdição só ocorrerá após o sacrifício dos animais positivos e a realização de dois exames de FC sucessivos de todo plantel, com intervalos de 21 a 30 dias, com resultados negativos no teste de diagnóstico; sacrifício de animais positivos, em seguida incineração ou enterro dos cadáveres no próprio local (assim como de todos os materiais utilizados nas instalações); desinfecção das instalações e fômites; desinfecção de veículos e equipamentos (cabrestos, arreios e outros), abolição de cochos coletivos, aquisição de animais de áreas livres; uso de equipamentos de proteção individual (EPI) pelas pessoas que manipulam esses animais; controle de trânsito

interestadual com exame negativo de mormo dentro do prazo de validade de 60 dias; e notificação da suspeita de foco (BRASIL, 2018a).

## **2.3 OBJETIVOS**

### **2.2.1 Objetivo Geral**

Determinar a frequência de casos de mormo em asininos no Brasil no período de janeiro de 2018 a abril de 2019, a partir do diagnóstico realizado no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco (LFDA/PE).

## **2.4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.4.1 Análise dos resultados de exames para diagnóstico de Mormo**

Foram analisados os resultados dos exames laboratoriais do diagnóstico de mormo (FC, ELISA e WB) em asininos do Brasil, realizados no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco, no período de janeiro de 2018 a abril de 2019, seguindo as diretrizes descritas na Portaria nº 35, de 17 de abril de 2018. Os dados gerados dos testes laboratoriais foram inseridos em um banco de dados do programa computacional Microsoft® Excel que foi posteriormente utilizado nas análises epidemiológicas.

### **2.4.2 Determinação da frequência de casos de Mormo**

A frequência de casos de mormo estudados foi mensurada por meio do cálculo: número de casos de mormo em asininos no período de janeiro de 2018 a abril de 2019, dividido pelo número total de amostras recebidas no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco para o diagnóstico de mormo em asininos do Brasil.

## **2.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram recebidas 1.073 amostras para diagnóstico de mormo no período de janeiro de 2018 a abril de 2019. O estado da Bahia foi responsável pela maior demanda de envio, totalizando 64,86 % (696/1.073) das amostras, seguido pelo estado de Minas Gerais com 30,7% (329/1.073). Detectou-se uma frequência de casos confirmados de mormo de 0,74% (8/1.073) e, considerando a exclusividade de casos positivos no estado da Bahia (BA), a frequência neste estado foi de 1,14% (8/696) (Tabela 1).

**Tabela 1** – Frequência de casos de mormo em amostras de soro de asininos encaminhadas para o Laboratório Federal de Defesa Agropecuária em Pernambuco (LFDA/PE), no período de janeiro de 2018 a abril de 2019.

<b>Estados</b>	<b>Amostras</b>	<b>Resultados Positivos</b>	<b>Frequência relativa (%)</b>
Alagoas	2	0	0
Bahia	696	8	1,14
Ceará	1	0	0
Distrito Federal	1	0	0
Goiás	1	0	0
Minas Gerais	329	0	0
Mato Grosso	4	0	0
Pará	6	0	0
Paraíba	3	0	0
Pernambuco	23	0	0
Paraná	1	0	0
Rio Grande do Norte	1	0	0
Rio Grande do Sul	2	0	0
Tocantins	3	0	0
<b>Brasil – Total</b>	<b>1.073</b>	<b>8</b>	<b>0,74</b>

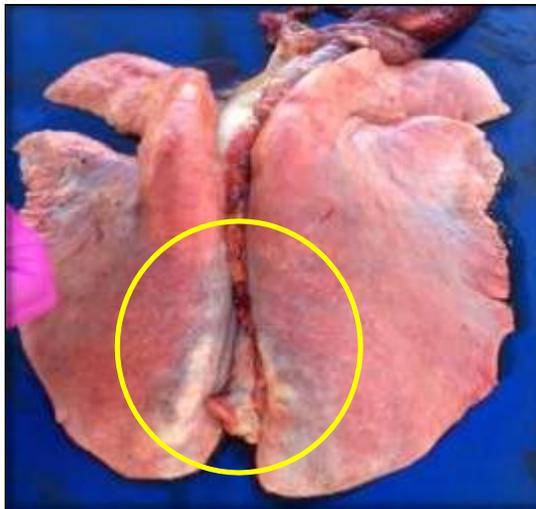
Fonte: UNI/DIA – LFDA/PE (2019).

O rebanho mundial de asininos é estimado em 42,762 milhões de animais e o país tem o décimo maior rebanho do mundo com cerca de 927 mil cabeças (FAO, 2014). A região Nordeste do país detinha em 2012, 90% do rebanho nacional (812.467/902.716), seguida pela região Sudeste com 4,2% (38.423/902.716), Norte com 3,71% (33.452/902.716), Centro-Oeste com 1,55% (13.992/902.716) e, por fim, a região Sul com 0,49% (4.382/902.716) dos animais (IBGE, 2013). De 2001 a 2012 observou-se uma redução no rebanho de asininos em todas as regiões do país, com uma retração nacional de aproximadamente 27,14% e na região Nordeste, a queda foi de 28,66% (1.138.847 em 2001 para 812.467 em 2012). Esta redução foi justificada pela popularização do transporte automobilístico, resultando na redução da criação e abandono de animais (IBGE, 2013). Em 2016, o governo da Bahia realizou o abate de 300 animais recolhidos nas ruas e no Ceará foi criado um órgão especial para o recolhimento desses animais abandonados; em 2016, 4,5 mil jumentos foram recolhidos nas estradas (MACHADO, 2017).

O trânsito de animais assintomáticos é um fator de risco relevante na disseminação do mormo, principalmente considerando o cenário brasileiro repleto do comércio desses animais, utilização em eventos esportivos e exposições (KHAN et al., 2013). Desta forma, a falta de controle de asininos circulantes na BA pode estar diretamente relacionada a presença de focos da enfermidade no estado, visto que diversos fatores de risco estão associados à disseminação

do patógeno, dentre eles a ausência de saneamento sanitário decorrente do abandono de animais e o transporte ilegal sem Guia de Transporte Animal (GTA) (AL-ANI e ROBERSON, 2007).

De 2005 até 2016, o estado da Bahia apresentou 1,87% (13/697) da frequência de focos de mormo no país e, nos anos de 2013 a 2016 observou-se um incremento considerável nos casos da enfermidade no Brasil, especialmente na região Nordeste (FONSECA-RODRÍGUEZ et al., 2019). No presente trabalho ficou demonstrado, no período analisado, a ocorrência de um foco de mormo exclusivamente na Bahia que possui o maior rebanho de asininos do país (IBGE, 2013). Na necropsia de um animal positivo deste foco de mormo, verificou-se a presença de lesões como áreas de congestão e consolidação pulmonar (Figura1).



**Figura 1.** Achado de Necropsia - Pulmão de asinino positivo para mormo no estado da Bahia. Congestão e consolidação pulmonar destacada no círculo amarelo (LFDA/PE, 2019).

A ocorrência de casos somente na região Nordeste pode ser justificada pelo elevado número de equídeos que ainda são utilizados para o transporte da cana-de-açúcar e, que não recebem o manejo sanitário correto, além de serem alocados em ambientes coletivos com pouca ventilação e alta umidade, favorecendo a disseminação da bactéria (SILVEIRA et al., 2013).

O Sudeste do Brasil entre os anos de 2005 e 2016 apresentou 11,62% (81/697) da frequência de focos de mormo no país e o estado de Minas Gerais, com rebanho de 26.598 cabeças foi detentor de 30,86% (25/81) dos focos da região, sendo inferior apenas ao estado de São Paulo responsável por 35,80% (29/81) (FONSECA-RODRÍGUEZ et al., 2019). Apesar da superioridade dos focos desta enfermidade em SP na região Sudeste, nenhuma amostra de asinino para o diagnóstico confirmatório da doença foi enviada no período de janeiro de 2018 a abril de 2019.

A importância da vigilância epidemiológica nacional por meio de resultados de testes diagnósticos fidedignos, identificação de fatores de riscos e estimativas de focos da enfermidade auxiliam diretamente no controle e propagação da doença.

## 2.6 CONCLUSÃO

Conclui-se uma baixa frequência de mormo em asininos no território brasileiro. Entretanto, uma elevada concentração dos casos da enfermidade no nordeste do país, região com maior rebanho desta espécie. Este estudo contribui para planejamentos epidemiológicos que poderão ser utilizados em programas de controle desta enfermidade.

## 2.7 REFERÊNCIAS

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

AL-ANI FK; ROBERSON, J. Glanders in horses: A review of the literature. **Veterinarski Arhiv**, v. 77, n. 3, p. 203-218, 2007.

ARUN, S; NEUBAUER, H; GUREL, A; AYYILDIZ, G; JUSCU, B; YESILDERE, T; MEYER, H; HERMANS, W. Equine glanders in Turkey. **Veterinary Record**, p. 255-258. 1999.

BLANCOU, J; Les anciennes methodes de surveillance et de controle de la morve. **Bulletin Société Veterinaire Prat. de France**, v. 78, n. 01, p.34-54, 1994.

BRASIL. Instrução Normativa N° 17, de 8 de maio de 2008. Instituir o Programa Nacional de Sanidade dos Eqüídeos -PNSE, no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**, 2008. Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa n°50, de 24 de setembro de 2013. Define sobre as doenças de notificação obrigatória ao serviço veterinário oficial do Brasil. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.47, 25 de setembro, 2013. Seção 1.

BRASIL. Instrução Normativa n°6, de 16 de janeiro de 2018. Estabelece as Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional. **Diário Oficial da União**, Brasília, p.3, 17 de janeiro, 2018a. Seção 1.

BRASIL. Portaria n°2.349, de 14 de setembro de 2017. Aprova a Classificação de Risco dos Agentes Biológicos, na forma do anexo a esta Portaria, elaborada em 2017 pela Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS). **Diário Oficial da União**, 2017. Seção 1.

BRASIL. Portaria n°35, de 17 de janeiro de 2018. Define os testes laboratoriais a serem empregados para o diagnóstico do mormo no Território Nacional. **Diário Oficial da União**,

Brasília, n. 77, p.6, 23 de abril, 2018b. Seção 1.

DITTMANN, LR et al. Aspectos clínico-patológicos do mormo em equinos - revisão de literatura. **Almanaque de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 1, n.1, p. 1-5, 2015.

DVORAK, GD; Spickler, A. Glanders. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 233, n.4, p.570-577, 2008.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. 2014. Disponível em: <<http://www.fao.org/>>. Acesso em: 02 de julho de 2019.

FONSECA-RODRÍGUEZ, O; JÚNIOR, JWP; MOTA, RA. Spatiotemporal Analysis of Glanders in Brazil. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.18, p. 14-19, 2019.

FRITZ, DL et al. Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*). **Veterinary Pathology**, v.37, n.6, p.626-636, 2000.

GHORIA, MT; KHAN, MS; KHAN, JA; RABBANI, M; SHABBIR, MZ; CHAUDHRY, HR; ALI, M. A; MUHAMMAD, J; ELSCHNER, MC; JAYARAO, BM. Seroprevalence and risk factors of glanders in working equines – Findings of a cross-sectional study in Punjab province of Pakistan. **Acta Tropica**, v. 176, p. 134-139, 2017.

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

GOUVEIA FILHO PCBD. **Desempenho da fixação do complemento para diagnóstico do mormo utilizando antígeno de cepas brasileiras de *Burkholderia mallei***. Recife-PE. Brasil: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2017.

GUL, ST; AHMAD, M; KHAN, A; HUSSAIN, I. Haemato-Biochemical observations in apparently healthy equine species. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 27, p. 155-158, 2007.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Efetivo dos rebanhos, por tipo de rebanho**. 2013. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/73#resultado>>. Acesso em: 02 de julho de 2019.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Efetivo dos rebanhos**. 2017. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: 02 de julho de 2019.

ITO, F. et al. Programa de Vigilância de Zoonoses e Manejo de Equídeos do Estado de São Paulo. Módulo III: Outras zoonoses de importância em equídeos e vigilância epidemiológica em unidades municipais – Parte 2. **Boletim Epidemiológico Paulista**. 2008. Disponível em [http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa56\\_equideos.htm](http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa56_equideos.htm). Acesso em 9 de junho de 2019.

KHAN, I; WIELER, LH; MELZER, F; ELSCHNER, MC; MUHAMMAD, G; ALI, S; et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.60, p. 204-21, 2013.

LANGENEGGER, J; DÖBEREINE, J; LIMA, AC. Foco de mormo (*Malleus*) na região de Campos, estado do Rio de Janeiro. **Arquivos do Instituto Biológico Animal**, Rio de Janeiro, v.3, p.91-108, 1960.

LARSEN, JC; JOHNSON, NS. Pathogenesis of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **Military Medicine**, v.174, n.6, p.647-651, 2009.

MACHADO, L. Exportação de jumentos: venda do Brasil para a China vira caso de polícia e ameaça a espécie. **Jornal O GLOBO**. 2017. Disponível em: <<https://g1.globo.com/natureza/noticia/2019/02/19/exportacao-de-jumentos-venda-do-brasilpara-a-china-vira-caso-de-policia-e-ameaca-a-especie.ghtml>>. Acesso em: 02 de julho de 2019.

MOTA, RA et al. Caracterización bioquímica y perfil de sensibilidad antimicrobiana in vitro de muestras de *Burkholderia mallei* aisladas de équidos de La región nordeste de Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.1, p.7-11, 2005.

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

MOTA, RA. Aspectos Etiopatológicos, Epidemiológicos e Clínicos no Mormo. **Veterinária e Zootecnia**, v.13, n.2, p.117-124, 2006.

MOTA, RA; RIBEIRO, MG. Mormo. In: MEGID, J; RIBEIRO, MG; PAES, AC (Eds). **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1.ed. Rio de Janeiro: Roca, p.423-435, 2016.

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

NCBI. **National Center for Biotechnology Information**. 2019. Disponível em: <[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)> Acesso em: 17 de junho de 2019.

OIE - **World Animal Health Organization**, 2018. Disponível em: <[www.oie.int/](http://www.oie.int/)>. Acesso em: 12 de junho de 2019.

PANAFTOSA. **Report on the performance of the Elisa-BKM16 test**. Pan American Foot and Mouth Disease Center/Veterinary Public Health, Pan American, Health. Organization/World Organization for Animal Health, Panaftosa/SPV-Paho/Who. 2018. Disponível em : <[https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com\\_docman&view=download&slug=report-performance-elisa-bkm16&Itemid=518](https://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&slug=report-performance-elisa-bkm16&Itemid=518)> Acesso em 1 de junho de 2019.

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

RADOSTITS, OM et al. **Clínica veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1737, 2002.

RADOSTITS, OM; GAY, CC; Blood, DC; HINCHCLIFF, KW; MCKENZIE, RA. **Clínica Veterinária: um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e equinos**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2010.

ROWLAND, C.A. et al. Critical Role of Type 1 Cytokines in Controlling Initial Infection with *Burkholderia mallei*. **Infection and Immunity**, v.74, n.9, p.5333-5340, 2006.

SAID, NC; JUNIOR, GN; Domingues, PF. Mormo em Equinos e a Biossegurança no

Agronegócio. **Tekhne e Logos**, Botucatu, SP, v.7, n.3, Dezembro, 2016.

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

SHELL, MA; LIPSCOMB, L; DESHAZER, D. Comparative Genomics and an Insect Model Rapidly Identify Novel Virulence Genes of *Burkholderia mallei*. **Journal of Bacteriology**, v.190, n.7, p.2306–2313, 2008.

SILVA, KPC et al. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, n.5, p. 439-444, 2009.

SILVEIRA, P; MACHADO, M; BANDEIRA, JDT; DE MORAIS, R; DOS SANTOS, F; SILVEIRA, A; et al. Glanders prevalence comparison between Zona da Mata, Agreste and Sertão from Pernambuco, Brazil, from 2005 to 2011. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v.16, p. 45-52, 2013.

SRINIVASAN, A et al. Glanders in a military research microbiologist. **The New England Journal of Medicine**, v.345, p.256-258, 2001.

STEVENS, JM et al. Actin-binding proteins from *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* can functionally compensate for the actin-based motility defect of a *Burkholderia pseudomallei* bim A mutant. **Journal of Bacteriology**, v.187, p.7857–7862, 2005.

WHITLOCK, GC et al. *Burkholderia mallei* cellular interactions in a respiratory cell model. **Journal of Medical Microbiology**, v.58, p.554-562, 2009.

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