

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINÁRIA

Colegiado dos Cursos de Pós-Graduação

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM NOVO
MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE MALEÍNA PARA
DIAGNÓSTICO DE MORMO**

Maurício Baltazar de Carvalho Filho

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2012

Maurício Baltazar de Carvalho Filho

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE UM NOVO
MÉTODO PARA PRODUÇÃO DE MALEÍNA PARA
DIAGNÓSTICO DE MORMO**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da UFMG como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva.

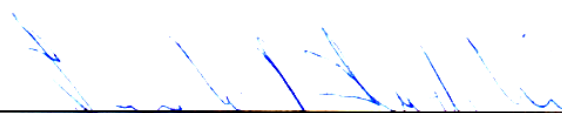
Orientador: Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2012


Carvalho Filho, Maurício Baltazar de, 1962-
C331d Desenvolvimento e avaliação de um novo método para produção de maleína para diagnóstico de mormo / Maurício Baltazar de Carvalho Filho. – 2012.
36 p. : il.
Orientador: Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária
Inclui bibliografia
1. Equídeo – Doenças – Diagnóstico – Teses. 2. Doenças respiratórias – Teses. 3. Antígenos – Teses. I. Reis, Jenner Karlisson Pimenta dos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.108 96


Dissertação defendida e aprovada em 15 de março de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Presidente



Prof. Rinaldo Aparecido Mota



Prof. Francisco Carlos Faria Lobato

DEDICATÓRIA

A meus filhos Pedro e Rafael,
este pela inspiração inicial e
aquele pela motivação adicional
advinda de seu surpreendente
aparecimento.

AGRADECIMENTOS

A minha mãe pelo apoio sempre carinhoso.

Aos amigos Rodrigo, Evandro, Augusto, Antônio, Paulinho, Lívia, Marcília, Vânia e Pedro Paulo pela valiosa e generosa contribuição.

Ao Professor Jenner Karlisson Pimenta dos Reis pela orientação acadêmica e apoio nas horas difíceis.

Ao Professor Rômulo Cerqueira Leite pela contribuição e aconselhamento.

Ao Dr. Cláudio Fonseca de Freitas, Coordenador da Divisão de Produção Animal da Fundação Ezequiel Dias, pela disponibilização de parte dos animais utilizados neste estudo.

Ao amigo Ricardo Aurélio Pinto Nascimento, Coordenador Geral do Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais, local em que se realizou a maior parte dos experimentos.

Ao amigo Pedro Moacyr Pinto Coelho Mota, cuja sugestão inicial e encorajamento tornaram possível este trabalho.

A Eliana Silva pela formatação final do manuscrito.

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	ABSTRACT	10
1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Conceituação e etiologia	11
2.2	Distribuição geográfica	12
2.3	Diagnóstico	13
2.4	Controle e erradicação	14
2.5	O teste da maleína	14
3.	MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1	Local de realização dos experimentos	15
3.2	Origem e caracterização das estirpes de <i>B. mallei</i>	15
3.2.1	Inoculação em cobaias	15
3.2.2	Caracterização bioquímica das estirpes de <i>B. mallei</i>	15
3.2.3	Caracterização molecular das estirpes de <i>B. mallei</i>	16
3.3	Produção do concentrado de maleína	16
3.4	Purificação do concentrado de maleína	16
3.5	Caracterização das maleínas experimentais	17
3.5.1	Caracterização em HPLC	17
3.5.2	Caracterização por eletroforese	17
3.6	Teste das maleínas experimentais	17
3.6.1	Teste de esterilidade	17
3.6.2	Teste de inocuidade	18
3.6.3	Testes de potência e especificidade	18
3.6.4	Teste a campo	19
3.7	Exame histopatológico das reações alérgicas	20
3.8	Avaliação da soroconversão após a maleinização dos controles negativos	20
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	Caracterização das estirpes de <i>B. mallei</i>	20
4.1.1	Inoculação em cobaias	20
4.1.2	Caracterização bioquímica das estirpes de <i>B. mallei</i>	21
4.1.3	Caracterização molecular das estirpes de <i>B. mallei</i>	22
4.2	Caracterização das maleínas experimentais	22
4.2.1	Caracterização em HPLC	22
4.2.2	Caracterização por eletroforese	24
4.3	Teste das maleínas experimentais	25
4.3.1	Teste de esterilidade	25
4.3.2	Teste de inocuidade	25
4.3.3	Testes de potência e especificidade	25
4.3.4	Teste a campo	29
4.4	Exame histopatológico das reações alérgicas	30
4.5	Avaliação da soroconversão após a maleinização dos controles negativos	32
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
6.	CONCLUSÕES	32
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
8.	ANEXOS	36

LISTA DE TABELAS		
Tabela 1	Título de anticorpos anti- <i>B. mallei</i> no teste de FC dos quatro equinos sensibilizados com suspensão inativada de <i>B. mallei</i> utilizados no teste de potência	26
Tabela 2	Comparação entre as médias das reações produzidas pelas maleínas experimentais (F1) e pela maleína padrão nos equinos sensibilizados e nos controles negativos	27
Tabela 3	Concordância entre a Maleína Experimental nº 2 e a Maleína Padrão e entre estas e o Teste de Fixação de Complemento	30
Tabela 4	Resposta sorológica no teste de fixação de complemento de animais controle negativo após maleinização com a maleína experimental nº 4 e a maleína padrão	32
LISTA DE QUADROS		
Quadro 1	Notificações de focos de mormo no Brasil (2000-2010)	13
Quadro 2	Resultados dos testes do <i>kit</i> API 20E [®] utilizado para caracterização bioquímica das cinco amostras de <i>B. mallei</i> isoladas de casos clínicos de mormo no Brasil	21
LISTA DE FIGURAS		
Figura 1	Preparação de um equino para inoculação das maleínas	19
Figura 2	Orquite bilateral (Reação de Strauss) em cobaia experimentalmente infectado com <i>B. mallei</i>	20
Figura 3	Amplicons de fragmentos do gene <i>fliP</i> de <i>B. mallei</i>	22
Figura 4	Curvas de amplificação de fragmento do gene <i>fliP</i> de <i>B. mallei</i>	22
Figura 5	Perfil cromatográfico do Concentrado da Maleína nº 2	23
Figura 6	Perfil cromatográfico da F1 da Maleína nº 2	23
Figura 7	Perfil cromatográfico da F2 da Maleína Nº 2	23
Figura 8	Perfil cromatográfico da tiroglobulina bovina	23
Figura 9	Perfil cromatográfico da albumina bovina	23
Figura 10	Gel de eletroforese de F1 e de concentrados de maleínas experimentais	24
Figura 11	Gel de eletroforese de F2 de maleínas experimentais	25
Figura 12	Reação ao teste da maleína de um equino sensibilizado (Maleína Experimental nº 2)	27
Figura 13	Reação ao teste da maleína de um equino controle negativo (Maleína Experimental nº 2)	27
Figura 14	Reações negativas em asininos inoculados pela via intradermopalpebral com a Maleína Experimental nº 1	29
Figura 15	Equino positivo para a maleína experimental nº 2 e para a maleína padrão	30
Figura 16	Equino negativo para a maleína experimental nº 2 e para a maleína padrão	30
Figura 17	Corte histológico de derme profunda de equino mostrando infiltrado celular de reação alérgica provocada pela Maleína Padrão, 48 horas após inoculação	31
Figura 18	Corte histológico de derme profunda de equino mostrando infiltrado celular de reação alérgica provocada pela Maleína Experimental nº 2, 48 horas após inoculação	31
LISTA DE GRÁFICOS		
Gráfico 1	Resultados dos testes de potência e especificidade das maleínas experimentais (F1) e da maleína padrão	28

RESUMO

O Mormo é uma doença dos solípedes, causada pela bactéria *Burkholderia mallei*. Entre os testes para diagnóstico do Mormo, destaca-se o teste alérgico da maleína. No presente trabalho, buscou-se purificar o grupo proteico constitutivo da maleína de modo a separar as frações proteicas com peso molecular acima de 350kDa, onde se acredita residir a atividade imunoalérgica específica desse reagente. O antígeno foi purificado em um sistema de filtração tangencial equipado com membrana de celulose regenerada com ponto de corte de 300kDa, a partir de um concentrado proteico produzido pela precipitação do sobrenadante de culturas de *B. mallei* pela adição de ácido tricloroacético. As frações purificadas foram caracterizadas por HPLC e revelaram possuir peso molecular na faixa de 660kDa. À eletroforese, essas frações apresentaram peso molecular entre 268 e 460kDa. As maleínas experimentais semi-purificadas tiveram sua potência testada frente a um padrão internacional pela inoculação intradérmica de equinos sensibilizados com uma suspensão inativada de *B. mallei*. A especificidade dos antígenos foi avaliada pela inoculação em controles negativos. As médias das reações produzidas pelas maleínas experimentais e pela maleína padrão nos animais sensibilizados foram de 6,41mm e 3,07mm, respectivamente. No grupo controle, esses valores foram de 1,72mm e 0,61mm, respectivamente. O tratamento estatístico dos dados obtidos dos testes de potência e especificidade revelou que as maleínas experimentais são mais potentes que a maleína padrão e possuem potencial para serem utilizadas como teste auxiliar no diagnóstico do Mormo.

Palavras-chave: equino, mormo, maleína, antígeno, diagnóstico, purificação

ABSTRACT

Glanders is a disease of the equid, caused by the bacteria Burkholderia mallei. One of the most frequently used tests for diagnosis of Glanders is the allergic test of mallein. In the present work it was sought to purify the protein group which makes up for mallein, in an effort to segregate the protein fractions with molecular weight above 350kDa, which is believed to hold the specific immuno-alergic activity of this reagent. The antigen was purified from a protein pre-concentrate using a tangential-flow filtration system fitted with a regenerated cellulose membrane with a molecular weight limit of 300kDa. The purified fractions were characterized by HPLC and revealed to have a molecular weight of about 660kDa. In the electrophoresis, these values stayed between 268 and 460kDa. The potency of the semi-purified experimental malleins was tested in comparison with an international standard by the intradermic inoculation of horses sensitized by an inactivated suspension of B. mallei. The specificity of the antigen was evaluated by the inoculation of negative controls. The means of the reactions elicited by the experimental malleins and by the standard in the sensitized horses were 6.41mm and 3.07mm, respectively. In the control group, these values were 1.72mm and 0.61mm, respectively. The statistical analysis of the potency and specificity tests showed that the experimental malleins have a good potential to be used as an auxiliary test for the diagnosis of Glanders.

Keywords: equine, glanders, mallein, antigen, diagnosis, purification

1. INTRODUÇÃO

O Mormo é uma doença grave dos equídeos, presente de forma endêmica na região nordeste do Brasil. Não se conhece o impacto econômico dessa doença sobre o rebanho equídeo da região, o maior do País, com 1,36 milhões de cabeças (PESQUISA..., 2010), mas por se tratar de uma enfermidade com alta taxa de mortalidade, para a qual não se recomenda o tratamento, sendo os animais infectados sistematicamente eutanasiados, acredita-se que os custos financeiros sejam elevados, se não para o país como um todo, pelo menos para cada propriedade, individualmente.

Um dos instrumentos de diagnóstico do Mormo adotado pelo programa nacional de controle e erradicação da doença é o teste alérgico da Maleína, utilizado como método confirmatório, ou alternativo, conforme o caso, ao teste de Fixação de Complemento.

O Brasil não produz maleína, assim como não produz o antígeno utilizado na prova de fixação de complemento, que em alguns casos pode ser a própria maleína. Ficamos, portanto, dependentes da importação desses reagentes, com as naturais e indesejáveis consequências de ordem técnica e financeira para o País.

Com vistas a prover o País de uma tecnologia simples na concepção, mas capaz de produzir um antígeno de boa qualidade que possa ser utilizado com segurança como teste auxiliar no diagnóstico de Mormo, idealizamos este trabalho, que teve por objetivo desenvolver uma nova metodologia para produção de maleína, baseada na purificação das maleoproteínas por ultrafiltração, bem como avaliar o potencial maleogênico de estirpes autógenas de *B. mallei* isoladas de casos de Mormo no nordeste brasileiro.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Conceituação e etiologia

O Mormo é primariamente uma doença dos equídeos; outras espécies, inclusive o homem, são hospedeiros acidentais (Acha e Szyfres, 1987). É uma das doenças mais antigas de que se tem conhecimento, tendo sido descrita por Aristóteles no Século IV a.C sob a designação de Edema Maligno (Wilkinson, 1981).

O agente causal do Mormo é a bactéria *Burkholderia mallei*, um bastonete pequeno, Gram negativo, imóvel, encapsulado, não formador de esporos, intracelular facultativo (Redfearn *et al.*, 1966; DeShazer *et al.*, 2001).

Anteriormente, esse micro-organismo já havia sido classificado como *Bacillus mallei* (Flugge, 1967), *Malleomyces mallei* (Merchant e Packer, 1967) e *Pseudomonas mallei* (Wetmore e Gochenour, 1956; Smith e Chery, 1957; Rogul *et al.*, 1970). A inclusão final no gênero *Burkholderia* foi proposta por Yabuuchi *et al.* (1992) baseado nas sequências 16s de rRNA e na homologia DNA-DNA de *B. mallei* e *B. pseudomallei*.

Devido à alta virulência de algumas estirpes, à possibilidade de ser transmitida por aerossóis e à resistência à maioria dos antibióticos, a *B. mallei* é considerada um agente potencial para ser utilizado como arma biológica, incluído na Categoria B do Centers for Disease Control and Prevention (CENTERS..., 2011).

Conhece-se bem, hoje, a variabilidade antigênica e de virulência das estirpes de *B. mallei* (Cravitz e Miller, 1950; Nierman *et al.*, 2004). Romero *et al.* (2006) demonstraram que o genoma da *B. mallei* pode sofrer alterações com sucessivas passagens em meio de cultura ou em diferentes espécies de mamíferos.

A cápsula de polissacarídeos e os lipopolissacarídeos (LPS) da membrana celular da *B. mallei* são considerados fatores de virulência, que auxiliam o agente a evadir os mecanismos de defesa do sistema imunológico do hospedeiro. A perda da capacidade de produzir os lipopolissacarídeos da membrana celular devido a mutações provocadas por cultivos sequenciais pode levar à redução ou mesmo perda da virulência (DeShazer *et al.*, 2001; Neubauer *et al.*, 2005).

A doença apresenta-se sob três formas principais: pulmonar, nasal e cutânea. As formas respiratórias se caracterizam pela formação de nódulos no epitélio das vias aéreas que evoluem para úlceras. Pneumonia, descarga nasal purulenta e emaciação são sintomas comuns (Blaha, 1989). Nos animais acometidos por essa forma da doença, a mortalidade pode chegar a 95% (THE CENTER..., 2007). A forma cutânea caracteriza-se pela formação de nódulos ao longo dos vasos linfáticos, principalmente dos membros posteriores, que podem evoluir para feridas abertas com secreção purulenta.

Nos equinos, o Mormo geralmente se apresenta sob a forma crônica, podendo o animal permanecer infectado por vários anos, nos asininos e muares é mais comum a forma aguda, com septicemia e evolução para óbito em poucos dias (Hagebock *et al.*, 1993).

A principal forma de transmissão do Mormo é pela ingestão de alimento e água contaminados por secreções de animais com as formas clínica ou subclínica, em condições de aglomeração e insalubridade.

O compartilhamento de equipamento de montaria é outra forma importante de transmissão. A mosca doméstica (*Musca domestica*), ao se alimentar das feridas abertas, também pode contribuir para a disseminação da bactéria como vetor mecânico (Hutyra e Marek, 1926, citado por Al-Ani e Roberson, 2007; Marek e Manninger, 1945, citado por Neubauer, 2005; Henning, 1956, citado por Al-Ani e Roberson, 2007).

2.2. Distribuição geográfica

O Mormo é considerado erradicado dos países da Europa Ocidental e da América do Norte (Derbyshire, 2002). A doença continua presente, contudo, na Ásia, no Oriente Médio e na América do Sul (Krishna *et al.*, 1992; Bazargani *et al.*, 1996; Al-Ani *et al.*, 1998; Muhammad *et al.*, 1998; Arun *et al.*, 1999; Mota *et al.*, 2000).

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em 1811, introduzida provavelmente por animais infectados importados da Europa (Pimentel, 1938, citado por Langenegger, 1960). Em 1960, Langenegger *et al.* relataram a ocorrência de um foco de Mormo no município de Campos, no estado do Rio de Janeiro. Daquele ano até 1998, a doença não foi notificada no nosso país. Em 1999, contudo, foram identificados focos em Pernambuco e Alagoas (Mota *et al.*, 2000). De lá para cá, notificaram-se focos em estados das regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste (Quadro 1). Em 2008, um foco de Mormo foi identificado no município de Santo André, São Paulo (Brasil, 2008), e em 2009, outro foco foi detectado no Distrito Federal (THE WORLD..., 2011).

Quadro 1. Notificações de focos de Mormo no Brasil (2000-2010)

Unidades da Federação	Nº de Focos											TOTAL
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	
NORTE			3	8	12	5			3			31
Amazonas			1	8	12	4						25
Pará						1			3			4
Roraima			2									2
NORDESTE	4	4	91	42	20	36	24	30	46	33	28	358
Alagoas	1	1	4	2		7	5	2	3			25
Ceará		3	2	2		4	4	1		2	1	19
Maranhão	1			4	2			1				8
Paraíba			2	1	1	3	7	13	14	11	7	59
Pernambuco			69	13	15	12	8	7	11	17	15	167
Piauí	2					1						3
R. G. Norte			4	18	2	9		6	18	3	4	64
Sergipe			10	2							1	13
C. OESTE										1		1
Dist. Federal										1		1
SUDESTE									1			1
São Paulo									1			1
SUL					2							2
Paraná					1							1
Santa Catarina					1							1
BRASIL	4	4	94	50	34	41	24	30	50	34	28	393

Fonte: Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE/DSA/SDA/MAPA)

2.3. Diagnóstico

O Mormo é uma das doenças de interesse do Programa de Sanidade dos Equídeos, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e sua ocorrência deve ser comunicada às autoridades veterinárias locais e à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

Casos suspeitos de Mormo devem ser diferenciados de outras infecções crônicas da mucosa e seios nasais, mais especificamente de Garrotilho (*Streptococcus equi*, subespécie *equi*). O Mormo cutâneo deve ser diferenciado de Linfangite Ulcerativa (*Corynebacterium pseudotuberculosis*), Pseudotuberculose (*Yersinia pseudotuberculosis*), Esporotricose (*Sporotrichium* spp.) e Linfangite Epizoótica (*Histoplasma farciminosum*).

Deve-se, preferencialmente, tentar o isolamento do agente de lesões fechadas. O microrganismo é aeróbio e cresce bem em

ágar nutriente ou ágar batata enriquecidos com 4 % de glicerol, bem como em ágar sangue, incubados a 37°C por 72 horas (Steele, 1980). A *B. mallei* reduz nitrato e é positiva nas provas de catalase, oxidase, gelatinase e arginina dehidrolase, e negativa para indol e motilidade (Naureen *et al.*, 2007). Embora a maioria dos autores defenda que a glicose é o único carboidrato utilizado, alguns trabalhos mostraram que com meios de cultura e indicadores apropriados pode-se demonstrar a utilização de arabinose, frutose, galactose e manose (Evans, 1966).

O Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres da Organização Internacional de Saúde Animal (GLANDERS, 2008), no seu capítulo sobre Mormo, recomenda o Teste de Fixação de Complemento para controle do trânsito internacional de equídeos. No Brasil, as Normas para Controle e Erradicação do Mormo, aprovadas pela Instrução Normativa SDA nº 24, de 5 de abril de 2004, adotam,

para diagnóstico da doença, o Teste de Fixação de Complemento e o Teste alérgico da Maleína, este último em animais positivos na fixação de complemento, mas sem sinais clínicos, ou em animais negativos na fixação de complemento, mas com sinais clínicos (Brasil, 2004).

Cravitz e Miller (1950) relataram uma sensibilidade de pelo menos 97% para o teste de Fixação de Complemento. Naureen *et al.* (2007) encontraram uma especificidade de 100% para os testes de Fixação de Complemento e da Maleína, e uma sensibilidade de 91,4% para o primeiro e 75,7% para o segundo. Sprague *et al.* (2009) também encontraram especificidade de 100% no Teste de Fixação de Complemento. Outros autores, contudo, relataram a ocorrência de falsos positivos nos testes de Fixação de Complemento e da Maleína (Marek e Manninger, 1945; Wernery *et al.*, 2005). Resultados falsos positivos podem ocorrer em animais infectados por *Streptococcus equi*, no caso do teste alérgico da maleína (Al-Ani, 1993), e em testes sorológicos realizados logo após a aplicação do teste da maleína (Hagebock *et al.*, 1993; Sprague *et al.*, 2009). De Shazer *et al.* (2000) demonstraram a ocorrência de reação cruzada entre antígenos polissacarídeos de superfície de *B. mallei* e *B. pseudomallei* em testes de ELISA e *Immunoblotting*. Segundo Neubauer *et al.* (2005), a ocorrência de falsos positivos nos testes sorológicos e no teste alérgico da maleína estaria relacionada à baixa purificação dos antígenos. Por outro lado, pode-se esperar a ocorrência de resultados falso negativos nos testes de Fixação de Complemento e da Maleína em alguns animais em estado avançado da doença, animais velhos, e em fêmeas gestantes (Jana *et al.*, 1982; Neubauer *et al.*, 2005; Sprague *et al.*, 2009).

Outros testes sorológicos utilizados para diagnóstico de Mormo são a Imunodifusão em Gel de Agar (IDGA), a Contra-

imunoeleetroforese (CIE), o Teste de Anticorpos fluorescentes (IFA), a Hemaglutinação Indireta (HAI), o ELISA, o Teste de Rosa Bengala (RBT) e o Western Blot (Al-Ani e Roberson, 2007; Naureen *et al.*, 2007; Eschner *et al.*, 2011).

Técnicas moleculares como a PCR e a PCR em tempo real utilizando oligonucleotídeos capazes de amplificar segmentos do gene *fliP* (gene codificador de proteínas dos *pili*) já foram padronizadas para identificação de *B. mallei* (GLANDERS, 2008).

2.4. Controle e erradicação

Não existe vacina comercial para o Mormo e, regra geral, as autoridades veterinárias proíbem o tratamento dos equídeos infectados. O controle da doença se dá pela identificação dos animais infectados através de testes sorológicos e imunoalérgicos, eliminação dos animais positivos, saneamento dos focos e controle do trânsito de animais, conforme a legislação local de cada país (Al-Ani e Roberson, 2007).

2.5. O teste da maleína

A maleína é um antígeno proteico de citoplasma que, uma vez inoculado em um animal previamente sensibilizado pela exposição natural à *B. mallei* é capaz produzir uma reação alérgica (OIE, 2008). Na maioria das vezes, a maleína é inoculada em volume de 0,1 mL na pálpebra inferior. A leitura do resultado é realizada 48 a 72 horas após a inoculação. A reação positiva caracteriza-se por edema marcado da pálpebra, acompanhado ou não de secreção purulenta e conjuntivite (AL-Ani e Roberson, 2007).

As primeiras maleínas eram constituídas do filtrado de culturas de *B. mallei* sem nenhum processamento adicional. Eram antígenos brutos que produziam uma grande quantidade de reações falso-positivas (Hutyra e Marek, 1926). Algu

melhoramento na qualidade desse antígeno foi obtido pela utilização de um meio de cultura sintético que utilizava asparagina como fonte de nitrogênio no lugar das peptonas. Esse produto, conhecido como *heat-concentrated synthetic medium mallein* (HCMS), era pouco purificado e continha ingredientes não utilizados do meio de cultura e produtos solúveis de origem bacteriana capazes de produzir reações inespecíficas (Verma *et al.*, 1994).

A maleína atualmente utilizada no Brasil é importada e produzida com estirpes exóticas de *B. mallei* a partir de uma adaptação da técnica utilizada para produção de tuberculina (Huitema, 1969), na qual a concentração das maleoproteínas é efetuada pela precipitação com ácido tricloroacético (TCA), resultando em um produto primariamente proteico, mas ainda pouco purificado.

Verma *et al.*, 1994, purificaram parcialmente as maleoproteínas em coluna cromatográfica de gel filtração, separando frações de peso molecular acima de 350kDa e entre 120 e 170 kDa, e verificaram que a fração de peso molecular mais elevado se constituía em um antígeno de melhor qualidade, apresentando maior sensibilidade e especificidade.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de realização dos experimentos

Os trabalhos experimentais foram realizados no Laboratório de Produção de Materiais de Referência (PMR), no Laboratório de Biologia Molecular (LBM), na Unidade Instrumental de Cromatografia Líquida - Espectrometria de Massas (UI/CLEM) e no Laboratório de Controle de Produtos Biológicos (CPB), todos do Laboratório Nacional Agropecuário em Minas Gerais (LANAGRO-MG), e no Laboratório de Apoptose do Departamento de Patologia

Geral do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

3.2. Origem e caracterização das estirpes de *B. mallei*

As cinco estirpes de *B. mallei* utilizadas para produção de maleína neste trabalho foram isoladas de casos clínicos de Mormo nos estados de Alagoas e Pernambuco por Mota *et al.* (2000). Foram gentilmente cedidas ao LANAGRO-MG pelo Prof. Rinaldo Aparecido Mota, do Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva do Departamento de Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Neste trabalho, as estirpes foram identificadas com os números de um a cinco e caracterizadas por inoculação em cobaias, por testes bioquímicos e por técnicas de biologia molecular (PCR e PCR em tempo real).

3.2.1. Inoculação em cobaias

As cobaias (*Cavia porcellus*) são especialmente sensíveis à infecção por *B. mallei* (Howe, 1949; Miller *et al.*, 1948). Nessa espécie, desenvolve-se uma orquite bilateral acentuada típica da infecção por *B. mallei*, conhecida como reação de Strauss. Com o objetivo de caracterizar as estirpes e selecionar clones virulentos de maior capacidade maleogênica, inocularam-se cinco cobaias, uma para cada estirpe, pela via intraperitoneal com 1,0mL de uma suspensão de *B. mallei* em salina tamponada contendo $1,0 \times 10^8$ UFCs, padronizada por diluição e contagem de UFCs em placas de Agar Nutriente com 4 % de glicerol (Fritz *et al.*, 1999; Fritz *et al.*, 2000).

3.2.2. Caracterização bioquímica das estirpes de *B. mallei*

Para realizar a caracterização bioquímica das estirpes, utilizou-se o *kit* API 20E[®] mais as

provas de oxidase, catalase, motilidade e *triple sugar iron* (TSI) (MacFaddin, 2000).

3.2.3. Caracterização molecular das estirpes de *B. mallei*

As estirpes de *B. mallei* foram caracterizadas por PCR e PCR em tempo realizados conforme os protocolos sugeridos pelo Manual de Testes Diagnósticos e Vacinas para Animais Terrestres da OIE (2008), Capítulo 2.5.11 – Mormo e, em ambos os casos, utilizaram-se oligonucleotídeos desenhados com base em diferenças entre as sequências do gene *fliP* de *B. mallei* e *B. pseudomallei*. Para o PCR em tempo real, utilizou-se o *kit* RealQ PCR master Mix[®], da Ampliqon, com iniciadores e sondas IDT DNA[®] e equipamento Applied Biosystems ABI 7500[®]. A temperatura de anelamento foi alterada de 63°C para 62°C, a fim de se adequar o protocolo ao *kit* de PCR em tempo real disponível. Essa temperatura forneceu o balanço adequado entre a melhor atividade da enzima DNA polimerase e a especificidade da reação. Como controle negativo, utilizou-se uma amostra de *B. pseudomallei* fornecida pelo Laboratório Central de Saúde Pública no Ceará – LACEN-Ce e como controle positivo, utilizou-se a amostra 15310 de *B. mallei* da American Type Culture Collection (ATCC).

3.3. Produção do concentrado de maleína

Os concentrados dos cinco lotes de Maleína foram produzidos conforme a metodologia descrita por Huitema (1969). Trata-se de uma adaptação da técnica utilizada para a produção do Derivado Proteico Purificado de Tuberculina (Bernardelli, 2007), em que a purificação das proteínas é feita por precipitação com ácido tricloroacético (TCA).

Resumidamente, após oito semanas de incubação a 37°C, as culturas de *B. mallei* em meio líquido Dorset-Henley foram inativadas em vapor fluente (100°C) por uma

hora, testadas por semeadura em placas de ágar nutriente adicionado de 4% de glicerol para confirmar a inativação, centrifugadas em centrífuga refrigerada a 6.000 x g por uma hora, e o sobrenadante, filtrado em membrana de PVDF 0,22µ para remoção completa das células. O produto, denominado Maleína Bruta, foi processado adicionalmente pela adição de TCA em uma concentração final de 4% para separação das maleoproteínas por precipitação. O precipitado foi lavado repetidas vezes em solução salina a 5% até que o pH do sobrenadante atingisse 2,4 e, em seguida, em salina acidificada (pH 3,0) até alcançar o pH 2,7. Na sequência, foi redissolvido em um volume mínimo de uma solução alcalina para se obter do concentrado de maleína, cujo pH deve ficar em torno de 6,7. A concentração proteica desse concentrado foi estimada pelo método do Biureto Modificado (Bernardelli, 2007) em aparelho espectrofotômetro Thermo Spectronic, modelo Genesys 10 UV, com leitura em 544 nm, utilizando uma curva padrão de albumina. Os concentrados de maleína assim produzidos apresentaram concentração proteica em torno de 30mg/mL.

3.4. Purificação do concentrado de maleína

O processo de purificação teve como objetivo selecionar as proteínas com peso molecular acima de 350kDa, consideradas mais imunorreativas e específicas (Verma *et al.*, 1994). A purificação do concentrado de maleína foi realizada por ultrafiltração em um equipamento Millipore Labscale[®] TFF equipado com um cartucho de filtração tangencial Pellicon[®] XL Ultracel 300 com membrana de celulose regenerada e limite de peso molecular de 300kDa. O concentrado foi diluído em uma solução PBS 0,01 M, pH 7,2-7,4, até um volume de 500mL, que é a capacidade máxima do reservatório do equipamento de ultrafiltração. A solução de maleína diluída foi re-concentrada por ultrafiltração até um volume 10 vezes menor (50mL), e as etapas

de diluição e re-concentração foram repetidas até a obtenção da purificação desejada.

A purificação foi monitorada pela avaliação da concentração proteica da solução e pela observação de seu perfil cromatográfico. A concentração proteica foi estimada pelo método do Biureto Modificado acima descrito e o perfil cromatográfico foi estabelecido utilizando uma coluna Agilent Zorbax® Bio Series GF-250, de 4,6 mm de diâmetro interno, e uma metodologia que emprega como fase móvel uma solução PBS 0,01 M, pH 7,2 a 7,4, a mesma utilizada para lavar o concentrado de maleína, com *flow rate* de 0,5mL/min., volume de injeção de 50µL, detector UV em 210nm, e temperatura de 25°C, em equipamento Shimadzu, modelo LC-20AT.

Como, no presente caso, purificação e concentração proteica são variáveis inversamente proporcionais, foi necessário estabelecer um equilíbrio entre as duas, que resultasse em um produto razoavelmente purificado com uma concentração proteica que permitisse a realização dos testes de controle de qualidade do produto final. Neste experimento, o processo de purificação foi repetido até que se obtivesse um único pico bem definido no perfil cromatográfico em HPLC e uma concentração proteica de aproximadamente 10mg/mL.

As maleínas purificadas, retido do processo de ultrafiltração, foram misturadas a igual volume de uma solução tamponada de glicose a 14% (Huitema, 1969), esterilizadas por filtração em membrana PVDF de 0,22µ, distribuídas em volumes de 1,0mL em frascos para liofilização, congeladas a -40°C por 24 horas e liofilizadas. No momento do uso, as maleínas liofilizadas foram reidratadas e diluídas em uma solução esterilizada de Fenol a 0,5% para conter 1,0mg de proteína por mL.

O permeado do processo de ultrafiltração, proteínas com peso molecular abaixo de 350 kDa, foi concentrado no mesmo equipamento TFF, equipado com um cartucho Pellicon® XL Biomax 5, com membrana de polietersulfana e limite de peso molecular de 5 kDa, misturado em igual volume da mesma solução de glicose tamponada usada para diluir o retido, filtrado, liofilizado e armazenado para futuras investigações.

3.5. Caracterização das maleínas experimentais

3.5.1. Caracterização em HPLC

As maleínas experimentais foram caracterizadas por cromatografia HLPC, utilizando a metodologia descrita no item anterior. Como referência de peso molecular para a fração purificada, utilizou-se a tiroglobulina bovina (Sigma), com peso molecular entre 660 e 690kDa, e como referência para a fração retirada, utilizou-se a albumina bovina (SIGMA - Fração V), com peso molecular de 67kDa.

3.5.2. Caracterização por eletroforese

Para caracterizar as maleínas experimentais por eletroforese, utilizou-se o *kit* Invitrogen NuPAGE® para proteínas de alto peso molecular, com gradiente crescente de poliacrilamida de 3 a 8% e tampão de corrida de Tris-Acetato. O gel foi corado com Azul de Coomassie R250.

3.6. Teste das maleínas experimentais

3.6.1. Teste de esterilidade

Para avaliação da esterilidade, o antígeno purificado liofilizado foi reidratado e diluído para a concentração de uso com água destilada esterilizada, e inoculado em uma bateria de meios líquidos para pesquisa de bactérias aeróbias (*Tryptic Soy Broth*), anaeróbias (Caldo Tioglicolato) e fungos e

leveduras (Caldo Saboraud), conforme a metodologia para pesquisa de contaminação em vacinas inativadas do Laboratório de Controle de Produtos Biológicos (CPB)/LANAGRO-MG.

3.6.2. Teste de inocuidade

A inocuidade das maleínas experimentais foi avaliada pela inoculação em cobaias, por via subcutânea, de 1,0 mL do produto reidratado e diluído para a concentração de uso com água destilada esterilizada, conforme a metodologia do teste de controle de qualidade de tuberculinas do CPB/LANAGRO-MG.

3.6.3. Testes de potência e especificidade

Para testar a potência das cinco maleínas experimentais, utilizaram-se quatro éguas sem raça definida com idades entre quatro e dez anos, negativas para Mormo no teste de Fixação de Complemento (FC). Os animais foram mantidos em um piquete nas dependências do LANAGRO-MG e alimentados com feno de Tifton e sal mineral, à vontade, mais 2 kg de ração de manutenção por dia para cada animal. No piquete, tinham acesso livre a água de bebedouro.

Os animais foram sensibilizados com uma suspensão mista de *B. mallei* inativada, com volume celular de 25%, elaborada com três das cinco amostras utilizadas para produção das maleínas experimentais. O inóculo sensibilizante foi produzido diluindo a suspensão de *B. mallei* a 1:5 em solução salina e adjuvante incompleto de Freund, na razão de 1:1,5:2,5, respectivamente e os animais foram inoculados com 1,0mL desse inóculo, sendo 0,5mL por via intramuscular e 0,5 mL por via subcutânea. Uma dose de reforço foi aplicada 30 dias após a primeira, e o primeiro teste foi realizado 44 dias após o reforço. Outras doses de reforço foram aplicadas 30 dias após cada teste, e os animais foram reutilizados 30 dias após cada

reforço (Verma *et al.*, 1994). Ao todo, os animais desse grupo foram utilizados para a realização de cinco testes. Para avaliar a eficiência da sensibilização, coletaram-se amostras de soro imediatamente antes da primeira dose de inóculo, 30 dias após a primeira e a segunda doses, e imediatamente antes da realização de cada teste, que foram tituladas quanto a presença de anticorpos contra *B. mallei* pelo teste de FC. Os testes de FC foram realizados no Laboratório de Bacteriologia do LANAGRO-PE.

As cinco maleínas experimentais foram identificadas com a mesma numeração dada às estirpes de *B. mallei* de que se originaram e testadas na mesma sequência, de 1 a 5. A potência das maleínas experimentais foi avaliada por comparação com uma maleína padrão (Instituto Pasteur, Bucarest, Romênia). Foram preparados, por tricotomização, quatro quadrados de 6 cm² de cada lado do pescoço de cada animal, dois numa linha superior e dois numa linha inferior, separados entre si por 6 cm, tanto na lateral como na vertical. A espessura da dobra da pele em cada área foi medida com um cutímetro e no centro de cada quadrado foi inoculado, por via intradérmica, 0,1mL de maleína na concentração de 1,0mg/mL, de forma sistemática, de modo que, do lado direito do pescoço, a maleína teste foi inoculada nos pontos 1 e 4, e a padrão, nos pontos 2 e 3, invertendo-se a ordem do lado esquerdo (Figura 1). Do lado direito, foi preparado também um quinto ponto para inoculação do diluente das maleínas experimentais. Quarenta e oito horas após a maleinização, a espessura da dobra da pele em cada ponto foi novamente medida e a intensidade da reação foi registrada como a diferença em milímetros entre as duas leituras (antes e após a inoculação). As reações produzidas pela maleína experimental foram comparadas com as reações produzidas pela maleína padrão.



Figura 1. Preparação de um equino para inoculação das maleínas.

Para avaliar a especificidade das maleínas, o mesmo procedimento foi realizado, a cada teste, em quatro equinos não sensibilizados, negativos para Mormo ao teste de FC (controles negativos), e as reações produzidas neste grupo foram comparadas com as reações produzidas nos animais sensibilizados.

Os animais desse grupo eram machos e fêmeas com idade entre três e seis anos e foram fornecidos pela fazenda da Penitenciária Agrícola José Maria Alckmin, em Ribeirão das Neves, e pela Fazenda Experimental da Fundação Ezequiel Dias, em Betim. No primeiro caso, os animais eram mantidos em um regime misto de pasto e capim cameroon misturado a milho triturado fornecido no cocho, e sal mineral, à vontade, no segundo, eram mantidos em piquetes e recebiam feno de Tifton ou Coast Cross, capim cameroon picado, e sal mineral, à vontade, mais 4 kg de ração de manutenção por dia para cada animal, em ambos os casos, tinham acesso livre a água de bebedouro.

Os dados foram avaliados estatisticamente por ANOVA em parcela subdividida, com os reagentes na parcela e os pontos de inoculação na subparcela. Foi usado o delineamento inteiramente ao acaso para o teste de especificidade e o delineamento em blocos ao acaso para o teste de potência (Sampaio, 2010). Para o tratamento estatístico dos dados, utilizou o software SAEG, Versão 9.1 - 2007.

O uso de animais neste experimento foi autorizado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais através do Protocolo nº 167/2011.

3.6.4. Teste a campo

A fim de se conhecer a atividade das maleínas experimentais em animais naturalmente infectados, submeteu-se uma delas a um teste a campo em conjunto com a maleína padrão, que foi realizado pelo Serviço de Saúde Animal (SSA) da Superintendência Federal de Agricultura (SFA) de Pernambuco. Para este teste, escolheu-se a Maleína Experimental nº 2, por ter esta apresentado boa atividade específica nos testes de potência e especificidade, bem como por estar disponível em maior quantidade.

Nove animais positivos no teste de FC (sem sinais clínicos de Mormo), quatro inconclusivos e dois negativos (com sinais clínicos de Mormo) foram inoculados pela via intradermopalpebral com 0,1 mL de cada reagente, na concentração de 1,0 mg/mL de proteína, sendo que a maleína experimental foi inoculada na pálpebra inferior direita e o padrão na pálpebra inferior esquerda. A leitura dos resultados foi realizada 48 horas após as inoculações, considerando-se como resultado positivo a formação de edema na pálpebra inferior, acompanhado ou não de conjuntivite e secreção purulenta.

3.7. Exame histopatológico das reações alérgicas

Para caracterização das reações alérgicas produzidas pelas maleínas experimentais e pela maleína padrão nos animais sensibilizados, realizou-se o exame histopatológico da área de inoculação.

Quarenta dias após a realização do último teste de potência, os animais sensibilizados foram novamente maleinizados, na concentração e volume utilizados para realização dos testes de potência em áreas do pescoço ainda não utilizadas. Dois deles foram inoculados com duas amostras de maleína, uma de cada lado do pescoço, sendo que um desses recebeu, de um lado, uma maleína experimental e do outro, a maleína padrão. Os outros dois animais foram inoculados apenas com uma maleína experimental, sendo que de um deles retirou-se uma amostra de pele íntegra para ser utilizada como controle negativo. O preparo da área a ser inoculada foi realizado como se fez para a realização dos testes de potência e especificidade.

As amostras foram coletadas por biópsia do local da reação 48 horas após a inoculação das maleínas. Após antisepsia e anestesia do local pela aplicação subcutânea de solução de lidocaína a 2%, foram retirados, com o auxílio de um bisturi, fragmentos de aproximadamente 1 cm² compostos de derme superficial e profunda, procurando-se incluir na amostra a área lesada e sua periferia.

Os fragmentos de tecido foram fixados por 24 horas em formalina a 10% tamponada, desidratados em álcool em concentrações crescentes de 70 a 100%, diafanizados em xilol e embebidos em parafina. Os segmentos foram seccionados com 5µ de espessura e corados pela técnica rotineira de hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica (MICHALANY, 1980).

3.8. Avaliação da soroconversão após a maleinização

A fim de avaliar a soroconversão na prova de FC após a inoculação da maleína, já relatada por outros autores (Huitema, 1969; Hagebock *et al.*, 1993; Sprague *et al.*, 2009), quatro animais de um dos grupos controle tiveram seus títulos de anticorpos anti-*B. mallei* avaliados aos 30, 60 e 120 dias após a maleinização.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das estirpes de *B. mallei*

4.1.1. Inoculação em cobaias

Sete dias após a inoculação intraperitoneal da suspensão de *B. mallei* as cobaias apresentaram os sinais típicos da reação de Strauss (Figura 2). Foram então eutanasiadas em câmara de CO₂ e coletaram-se amostras de material purulento de seus testículos, do qual foi possível isolar o agente em colônias puras após semeadura em placas de Agar Nutriente com 4 % de glicerol. Das amostras isoladas, produziram-se suspensões em solução de Skin Milk a 5% que foram congeladas e liofilizadas para uso posterior.



Figura 2. Orquite bilateral (Reação de Strauss) em cobaia experimentalmente inoculado com a estirpe nº 3 de *B. mallei*.

4.1.2. Caracterização bioquímica das estirpes de *B. mallei*

As cinco estirpes de *B. mallei* isoladas no Brasil apresentaram características morfológicas próprias de um bastonete pequeno, Gram negativo, não formador de esporo, irregularmente corado, com inclusões citoplasmáticas bipolares. No ágar nutriente adicionado de 4% de glicerol, após 48 horas de incubação a 37 °C, as colônias eram pequenas, lisas, pardacentas e, quando examinadas contra a luz, apresentavam aspecto de gotas de mel, características compatíveis com *B. mallei*.

As cinco estirpes mais o controle positivo (ATCC 15310) apresentaram resultados

positivos nas provas de catalase e oxidase e negativo na prova de motilidade. No teste de TSI, todas as estirpes foram negativas para fermentação de glicose, lactose e sacarose. O Quadro 2 mostra os resultados dos testes bioquímicos do *Kit* API 20E.

Em que pese haver considerável variação entre os achados de diferentes autores no que respeita a caracterização de *B. mallei* por provas bioquímicas, principalmente quanto à utilização de açúcares (Evans, 1966), os resultados aqui encontrados permitem uma classificação presuntiva das amostras como *B. mallei* (Al-Ani *et al.*, 1998; Mota *et al.*, 2000; Naureen *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009).

Quadro 2. Resultados dos testes do *kit* API 20E[®] utilizado para caracterização bioquímica das cinco estirpes de *B. mallei* isoladas de casos clínicos de Mormo no Brasil

Testes	Estirpes de <i>B. mallei</i>					
	1	2	3	4	5	ATCC 15310
ONPG ¹	-	-	-	-	-	-
Arginina	+	+	+	+	+	+
Lisina	-	-	-	-	-	-
Ornitina	-	-	-	-	-	-
Citrato de sódio	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-
Ureia	-	-	-	-	-	-
Triptofano	-	-	-	-	-	-
Indol	-	-	-	-	-	-
Piruvato de sódio	+	+	+	+	+	+
Gelatina	+	+	+	+	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+
Manitol	-	-	-	-	-	-
Inositol	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-	-
Raminose	-	-	-	-	-	-
Sacarose	-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	-	-	-
Amigdalina	-	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-	-

1. Orto-nitro-fenil-β-D-galactopiranosídeo.

4.1.3. Caracterização molecular das estirpes de *B. mallei*

A PCR das amostras amplificou um segmento alinhado com o marcador de 900 bp para todas as amostras de *B. mallei*, inclusive o controle positivo, compatível com a metodologia empregada (Glanders,

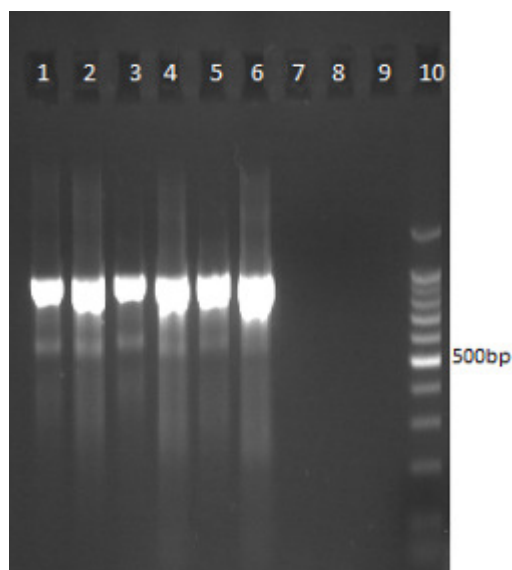


Figura 3. Amplicons de fragmentos do gene *fliP* de *B. mallei* (989bp). Colunas 1, 2, 4, 5 e 6, amostras de *B.mallei*. Coluna 3, ATCC 15310. Coluna 7, *B. pseudomallei* LACEN-Ce. Colunas 8 e 9, Branco. Coluna 10, Marcador.

4.2. Caracterização das maleínas experimentais

4.2.1. Caracterização em HPLC

Os perfis cromatográficos dos concentrados de maleína apresentaram variação entre as amostras e revelaram a existência de pelo menos três picos. Todos eles, contudo, apresentaram um pico de menor tempo de retenção de 3,6 minutos. Esse pico, que apresentou o mesmo tempo de retenção que a tiroglobulina bovina, foi o alvo para purificação, já que os demais se formavam em tempos compatíveis com frações

2008). A PCR em tempo real apresentou curvas de amplificação também para todas as amostras de *B. mallei*. Nos dois casos, não houve amplificação de segmento do Gene *fliP* de *B. pseudomallei*, comprovando a especificidade da técnica (Figuras 3 e 4).

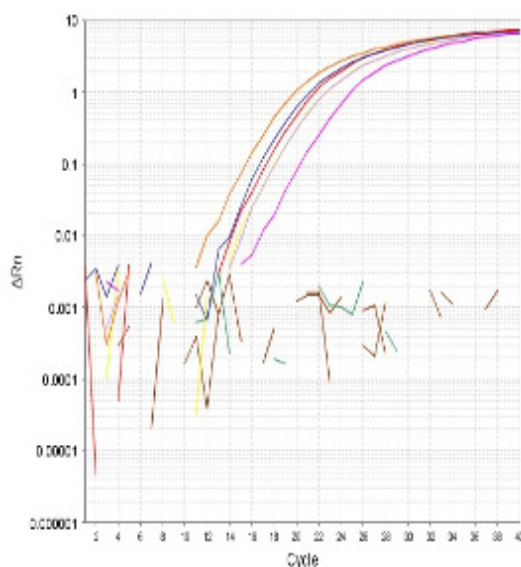


Figura 4. Curvas de amplificação de fragmento do gene *fliP* de *B. mallei*. Linha azul, Amostra 1; linha laranja, Amostra 2; linha vermelha, Amostra 3; linha lilás, Amostra 4; linha amarela, Amostra 5; linha magenta, ATCC 15310; linha verde (quebrada), *B. pseudomallei* LACEN-Ce; linha marrom (quebrada), Branco.

proteicas de peso molecular abaixo de 350 kDa. Após a purificação, as frações retidas no processo de ultrafiltração de todas as maleínas experimentais (proteínas com peso molecular acima de 350kDa), denominadas de F1, apresentaram um único pico, com tempo de retenção de 3,6 minutos. Por outro lado, o maior pico da fração permeada no processo de ultrafiltração (proteínas com peso molecular abaixo de 350kDa), denominada de F2, apresentou tempo de retenção entre 4,5 a 5,0 minutos, mais compatível com o perfil cromatográfico da albumina bovina, que possui peso molecular de 67kDa. Este último dado contrasta com

os resultados do trabalho de Verma *et al.* (1994), que encontraram valores entre 120kDa a 170kDa para essa fração proteica. Estes autores, contudo, purificaram as maleínas em colunas cromatográficas de gel filtração, coletando frações dos dois maiores picos que identificaram no perfil cromatográfico dos concentrados de maleína. Dessa forma pode-se obter um produto mais puro, constituído por um grupo proteico mais homogêneo, o que explicaria a discrepância entre os dois resultados, já que no presente trabalho não se buscou purificar a F2, mas apenas concentrá-la para elevar o seu teor proteico, o que equivale dizer que,

neste caso, ela está constituída de várias sub-frações que podem ter contribuído para deslocar o tempo de retenção de seu pico principal após a concentração.

A Figura 5 mostra o perfil cromatográfico do concentrado da Maleína nº 2, a Figura 6 mostra o perfil cromatográfico da F1 da Maleína Experimental nº 2, a Figura 7 mostra o perfil cromatográfico da F2 da Maleína Experimental nº 2, e a Figura 8 mostra o perfil cromatográfico da tiroglobulina bovina. A Figura 9 mostra o perfil cromatográfico da albumina bovina.

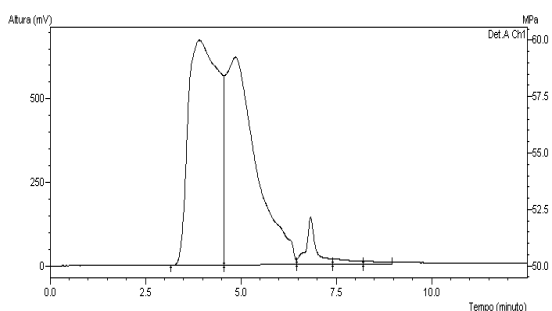


Figura 5. Perfil cromatográfico do Concentrado de Malena Nº 2.

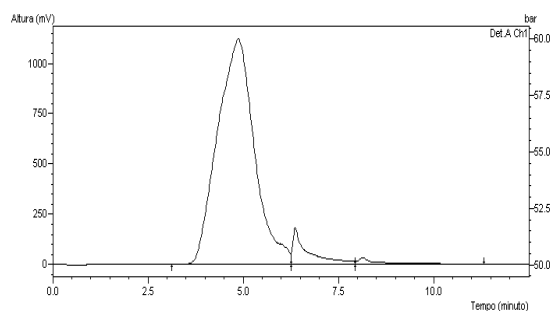


Figura 7. Perfil cromatográfico da F2 da Maleína Experimental Nº 2.

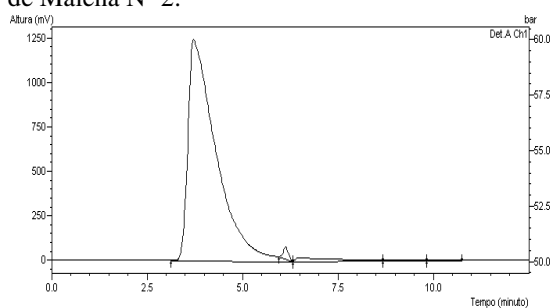


Figura 6. Perfil cromatográfico da F1 da Maleína Experimental Nº 2.

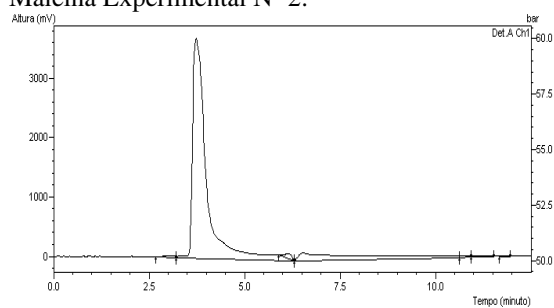


Figura 8. Perfil cromatográfico da tiroglobulina bovina.

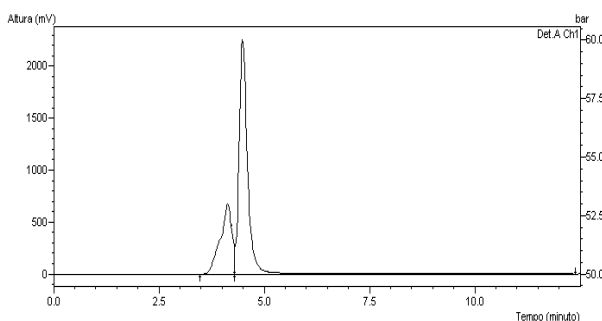


Figura 9. Perfil cromatográfico da albumina bovina.

4.2.2. Caracterização por eletroforese

À eletroforese, as F1 apresentaram bandas que se alinharam entre os marcadores de 268 kDa e o de 460kDa (Figura 10), e a tiroglobulina bovina se alinhou com o marcador de 238kDa. É provável que o tratamento da amostra com β -mercaptoethanol e o aquecimento tenham modificado a estrutura tetramérica da tiroglobulina bovina, cujas subunidades são unidas por ligações dissulfeto (Edelhoeh e De Crombrughe, 1966).

Não se conhece a estrutura molecular da maleína, e não foram encontradas referências na literatura de nenhum trabalho que tentasse caracterizá-la por eletroforese. Não existe, portanto, uma explicação para o fato de os resultados da eletroforese para as maleínas experimentais purificadas (F1) não terem reproduzido aqueles encontrados na cromatografia HPLC, onde a massa molecular estimada foi de 660kDa. Uma possibilidade, é que se trate de uma molécula constituída de duas ou mais subunidades que, a exemplo da tiroglobulina, foram separadas com o tratamento desnaturante da amostra.

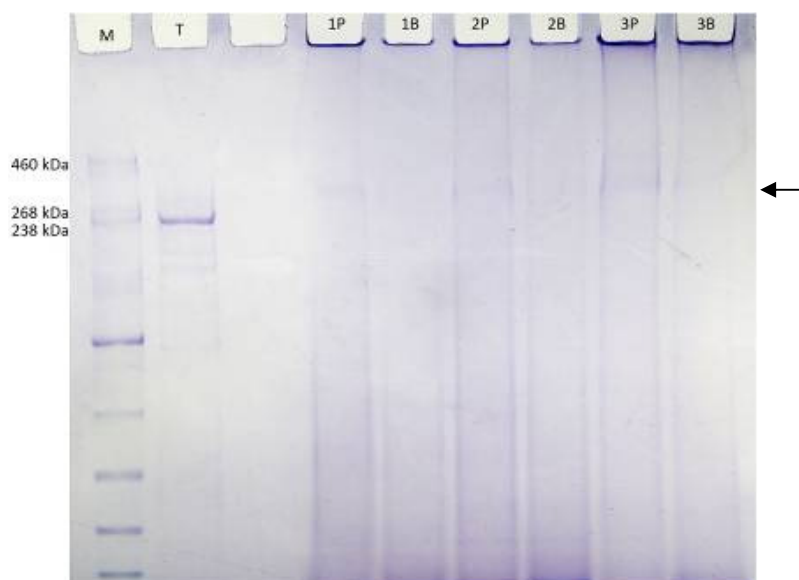


Figura 10. Gel de eletroforese de F1 e de concentrados de maleínas experimentais. M, Marcador. T, tiroglobulina bovina. 1P, 2P e 3P, F1 de maleínas experimentais purificadas. 1B, 2B e 3B, concentrados de maleínas experimentais.

Examinando atentamente a Figura 10, pode-se notar que os concentrados de maleínas experimentais 2B e 3B também apresentaram bandas alinhadas com as amostras purificadas, porém com menor intensidade, um resultado até certo ponto esperado, já que as F1 estão presentes nos concentrados de maleína, mas em menor concentração. Também foi observado que uma quantidade relativamente grande da amostra parece ter ficado retida na canelata (parte superior). Existe a possibilidade da

formação de agregados de proteína, impedindo assim sua difusão para dentro da malha do gel. Se for este o caso, outras formas de determinação da massa molecular deverão ser empregadas para uma melhor caracterização do grupo proteico constitutivo da maleína e confirmação dos resultados obtidos em HPLC.

Os resultados da eletroforese para as F2 correlacionaram melhor com aqueles da cromatografia HPLC. Essa fração

apresentou bandas alinhadas entre os marcadores de 55kDa e 71kDa, junto com a banda mais forte da albumina bovina, e também à altura do marcador de 41kDa (Figura 11). A detecção de mais de uma

banda proteica para essa fração não chega a ser uma surpresa, uma vez que as F2 não foram purificadas, mas apenas concentradas após a retirada das frações F1.

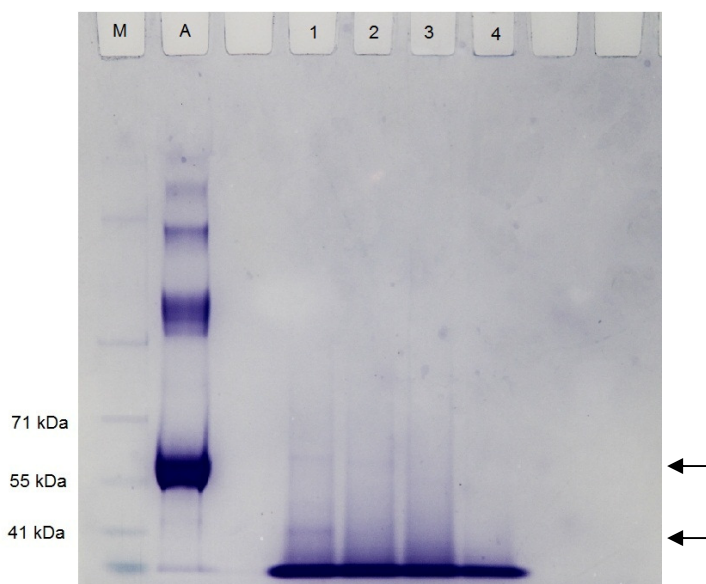


Figura 11. Gel de eletroforese de F2 de maleínas experimentais. M, Marcador. A, Albumina bovina. 1, 2, 3 e 4, F2 de maleínas experimentais.

4.3. Teste das maleínas experimentais

4.3.1. Teste de esterilidade

As maleínas experimentais não apresentaram crescimento bacteriano ou de fungos e leveduras nos meios inoculados.

4.3.2. Teste de inocuidade

As maleínas experimentais não produziram reações locais ou sistêmicas detectáveis nas cobaias inoculadas.

4.3.3. Testes de potência e especificidade

A avaliação da eficiência da sensibilização dos animais utilizados no teste de potência, feita através da pesquisa de anticorpos contra *B. mallei* no soro dos animais

sensibilizados, pelo Teste de FC, revelou que os animais desenvolveram uma resposta humoral ao inóculo sensibilizante. Os títulos subiram rapidamente após a primeira dose e permaneceram estáveis após a segunda, mas, a exceção do animal nº 4, apresentaram uma leve tendência de queda após o primeiro teste, a despeito das ressensibilizações entre os testes. (Tabela 1). O animal nº 1, o mais velho entre os animais do grupo sensibilizado, voltou ao *status* de negativo após o segundo teste, mas continuou apresentando reação alérgica às maleínas, o que sugere tratar-se esta última de uma reação imunológica mediada por mecanismos celulares, independente da resposta humoral (Hagebock *et al.*, 1993; Al-anni e Roberson, 2007; Tizard, 2008; Elschner *et al.*, 2011).

Tabela 1. Título de anticorpos anti-*B. mallei* no teste de FC dos quatro equinos sensibilizados com suspensão inativada de *B. mallei* utilizados nos testes de potência

Animal	Título na Fixação de Complemento						
	Antes da 1ª dose de inóculo	30 dias após a 1ª dose	30 dias após a 2ª dose*	Antes do 2º teste	Antes do 3º teste	Antes do 4º teste	Antes do 5º teste
1	Negativo	1:160	1:320	1:40	Negativo	Negativo	Negativo
2	Negativo	1:320	1:160	1:80	1:80	1:160	1:80
3	Negativo	1:160	1:160	1:160	1:40	1:80	1:80
4	Negativo	1:320	1:160	1:640	1:160	1:320	1:320

* Antes do 1º teste

Os testes de potência e especificidade foram realizados apenas para as frações purificadas (F1) das maleínas experimentais. Os concentrados de maleína e as frações retiradas (F2) não foram testados neste experimento.

Nenhuma das análises de variância deste experimento revelou a existência de diferença significativa entre as médias das reações nos quatro pontos de inoculação, e apenas no caso do teste de potência da Maleína Experimental n° 3 pôde-se observar uma interação ponto x reagente, onde, para a maleína experimental apenas, houve uma diferença significativa entre os pontos 3 e 4. Como este fato não se repetiu em nenhum dos outros testes, optamos por desconsiderá-lo na comparação das médias.

Por se tratar de uma resposta biológica, naturalmente instável, esperava-se um coeficiente de variação (CV) alto, o que realmente aconteceu. O CV das análises de variância, tanto para o teste de potência quanto para o teste de especificidade, ficou em torno de 30%. Por essa razão, utilizou-se

o Teste T para comparar as médias, já que esse teste é mais indicado quando se tem CV's elevados, onde o erro tipo II é mais frequente (Sampaio, 2010). Como não houve efeito significativo dos pontos de inoculação, utilizou-se, na comparação, o efeito médio geral.

As reações produzidas nos testes de potência neste estudo foram bem menores que as obtidas por Verma *et al.* (1994) para a maleína padrão em um experimento similar (30 ± 5 mm nos animais sensibilizados). Cumpre destacar, contudo, que esses autores utilizaram como padrão uma maleína diferente, fornecida pelo Diergeneeskundig Instituut, Lelystad, da Holanda e, muito provavelmente, sensibilizaram os animais com as mesmas estirpes utilizadas na produção desse padrão. De qualquer forma, o tratamento estatístico dos resultados dos testes de potência revelou que as maleínas experimentais produziram reações significativamente maiores que as produzidas pela maleína padrão utilizada neste experimento (Tabela 2, Gráfico 1 e Figura 12).

Tabela 2. Comparação entre as médias das reações produzidas pelas maleínas experimentais (F1) e pela maleína padrão nos equinos sensibilizados e nos controles negativos

Reagente	Teste									
	1		2		3		4		5	
	AS	CN	AS	CN	AS	CN	AS	CN	AS	CN
Maleínas F1	6,86Aa	0,86Ab	6,16Aa	0,96Ab	8,72Aa	3,32Ab	5,52Aa	2,04Ab	4,78Aa	1,42Ab
Padrão	3,83Ba	0,48Ab	3,06Ba	0,59Ab	2,63Ba	0,73Bb	3,03Ba	0,61Bb	2,80Ba	0,65Bb

Médias seguidas de letras diferentes, maiúsculas nas colunas e minúsculas nas linhas, diferem significativamente pelo teste de T ($P < 0.01$). AS = Animais sensibilizados. CN = Controle negativo. Leituras em milímetros.

O menor desempenho da maleína padrão nos testes de potência pode, em algum grau, estar relacionado ao distanciamento antigênico entre as estirpes utilizadas na sua produção e as estirpes autógenas utilizadas na produção do inóculo sensibilizante (Naureen *et al.*, 2007). Curiosamente, contudo, esse achado coincide com as conclusões de Verma *et al.* (1994) sobre a reatividade de uma maleína romena por eles testada e que foi classificada como pouco reativa. Já a ocorrência de reações menores

que as esperadas também para as maleínas experimentais, ainda considerando o trabalho dos autores acima citados, pode estar associada à capacidade sensibilizante das estirpes de *B. mallei* utilizadas na produção do inóculo, ao potencial maleogênico das estirpes utilizadas na produção das maleínas experimentais e/ou a variações individuais entre animais. Naturalmente, alguns desses fatores também podem ter afetado a resposta à maleína padrão.



Figura 12. Reação ao teste da maleína de um equino sensibilizado (Maleína Experimental nº 2).

As reações produzidas nos animais não sensibilizados utilizados no teste de especificidade foram bem menores que as

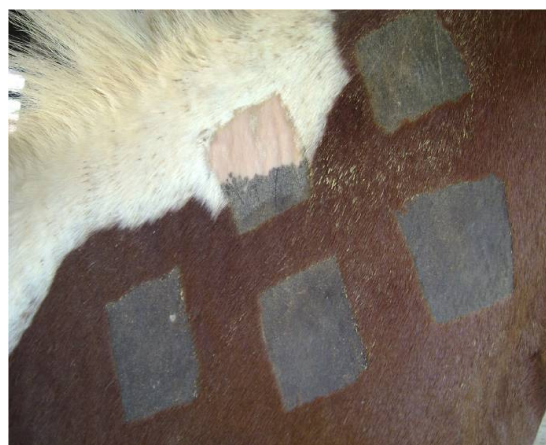


Figura 13. Reação ao teste da maleína de um equino controle negativo (Maleína Experimental nº 2).

produzidas nos animais sensibilizados. Das cinco maleínas experimentais testadas, apenas a nº 3 apresentou reação média acima

de 3 mm (3,3 mm) nesse grupo (Tabela 2, Gráfico 1 e Figura 13). Para o padrão, essas reações foram ainda menores, a maior delas, que também aconteceu no teste n° 3, foi de 0,73 mm (Tabela 2 e Gráfico 1). Esse resultado é especialmente interessante, pois pode estar sugerindo a possibilidade de uma reação cruzada nesse grupo de animais.

O tratamento estatístico dos dados dos testes de especificidade demonstrou que existe diferença significativa entre as reações

produzidas nos animais sensibilizados e aquelas produzidas nos controles negativos, tanto pelas maleínas experimentais quanto pelo padrão. A maleína padrão, contudo, produziu reações significativamente menores nesse grupo, quando comparada às maleínas experimentais de n°s 3, 4 e 5. Não houve diferença significativa entre as reações produzidas pela maleína padrão e as maleínas experimentais de n°s 1 e 2 no grupo controle. (Tabela 2 e Gráfico 1).

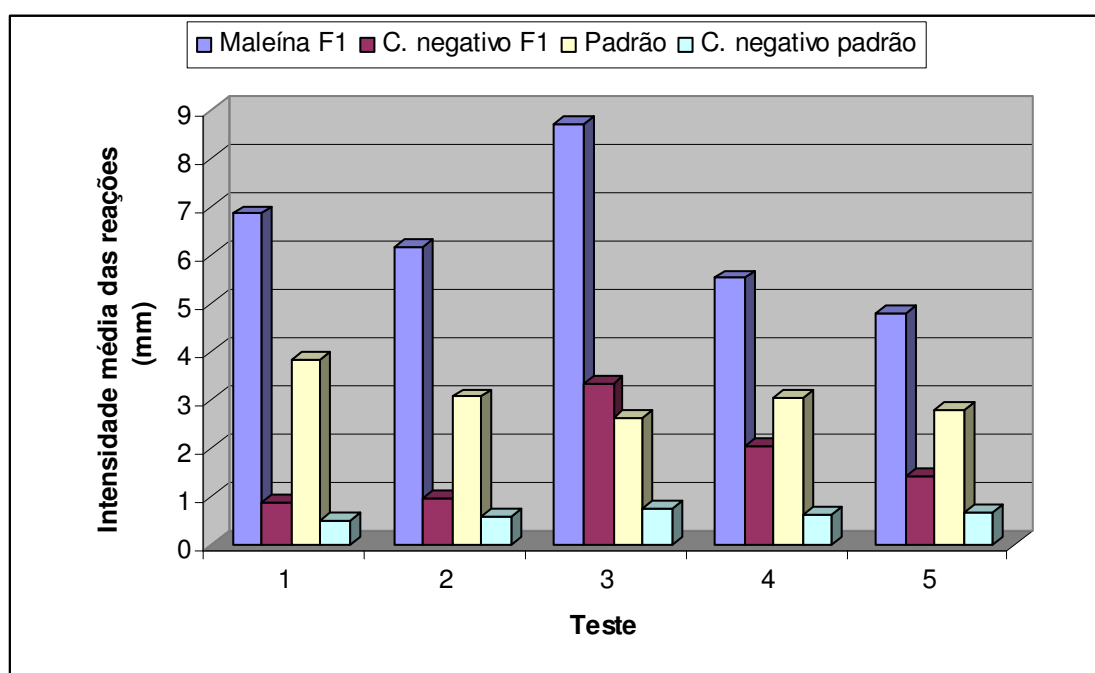


Gráfico 1. Resultados dos testes de potência e especificidade das maleínas experimentais (F1) e da maleína padrão.

Entre as maleínas experimentais, a n° 1 apresentou a melhor atividade específica, com uma relação sensibilidade/especificidade de 7,98 e a n° 3, a pior atividade específica, com uma relação sensibilidade/especificidade de 2,63. Uma provável explicação para esse resultado pode residir no fato de ter sido esta última a maleína experimental com menor grau de purificação evidenciado no resultado da

cromatografia HPLC. Para o padrão, a média dessa relação, considerando os cinco testes, foi de 5,02.

A especificidade da Maleína Experimental n° 1 foi confirmada em seis asininos negativos no teste de FC, os quais não apresentaram qualquer reação perceptível 48 horas após a inoculação do antígeno pela via intradermopalpebral (Figura 14).



Figura 14. Reações negativas em asininos inoculados pela via intradermopalpebral com a Maleína Experimental nº 1.

O diluente das maleínas experimentais, inoculado no quinto ponto do lado direito do pescoço, não produziu nenhuma reação, em nenhum dos animais inoculados.

4.3.4. Teste a campo

Dos 15 animais utilizados no teste a campo, cinco apresentaram resultados concordantes positivos entre a Maleína Experimental nº 2 e a Maleína Padrão (Figura 15), e nove apresentaram resultados concordantes negativos entre os dois antígenos (Figura 16). Em apenas um animal, os resultados discordaram (positivo para a maleína padrão e negativo para a maleína experimental). Em que pese ter sido obtido de um número pequeno de animais, o coeficiente Kappa

calculado foi de 0,86, o que é considerado concordância quase perfeita. Com relação à FC, contudo, a concordância praticamente não existiu para as duas maleínas. Dos nove animais positivos na FC, oito foram negativos para a Maleína Padrão e nove foram negativos para a Maleína Experimental nº 2, e os dois animais negativos na FC (com sintomas de Mormo) foram positivos para as duas maleínas. Dos os quatro animais inconclusivos na FC, três foram positivos para as duas maleínas e um foi negativo também para os dois antígenos (Tabela 3). Esses resultados evidenciam a importância do uso dos dois testes em associação para aumentar a certeza diagnóstica.

Tabela 3. Concordância entre a Maleína Experimental nº 2 e a Maleína Padrão e entre estas e o Teste de Fixação de Complemento

		Maleína Padrão		Fixação de Complemento		
		+	-	+	-	IN
Maleína nº 2	+	5	0	0	2	3
	-	1	9	9	0	1
Padrão	+	Kappa 0,85		1	2	3
	-			8	0	1

Fonte: SSA/SFA/PE. IN – Inconclusivo.



Figura 15. Equino positivo para a maleína experimental nº 2 e para a maleína padrão.



Figura 16. Equino negativo para a maleína experimental nº 2 e para a maleína padrão.

4.4. Exame histopatológico das reações alérgicas

A avaliação histopatológica das reações alérgicas produzidas pelas cinco maleínas experimentais e pela maleína padrão nos animais sensibilizados revelou, para todas elas, o mesmo padrão de infiltração celular mista com predominância de eosinófilos e neutrófilos (Figuras 17 e 18).

Embora não tenha sido encontrado na literatura consultada nenhum trabalho de caracterização da reação alérgica da maleína pela avaliação histopatológica da inflamação, como foi feito aqui, esses resultados estão em desacordo com relatos que informam tratar-se de uma reação alérgica de origem celular (Hipersensibilidade do Tipo IV), com predominância de células mononucleares, principalmente linfócitos T e macrófagos

(Hagebock *et al.*, 1993; Al-anni e Roberson, 2007; Tizard, 2008; Elschner *et al.*, 2011).

Não obstante, além dos achados histopatológicos, as características macroscópicas da reação alérgica à maleína também diferem daquelas de uma reação de hipersensibilidade do Tipo IV, como a provocada pela tuberculina, por exemplo, onde se tem a formação de um edema rígido que atinge seu ápice 72 horas após a aplicação do antígeno, o qual deve, obrigatoriamente, ser inoculado pela via intradérmica (Brasil, 2006). A reação à inoculação da maleína surge mais precocemente. Nos testes de potência realizados neste experimento, observou-se a formação de edema no ponto de inoculação, tanto das maleínas experimentais como do padrão, cerca de 20 minutos após a aplicação do antígeno, muito embora a reação tivesse persistido por 48 horas ou

mais. Quanto à via de inoculação, além da via intradérmica, a maleína também pode ser inoculada pela via subcutânea e por instilação na conjuntiva, estas duas últimas, formas incomuns de inoculação quando se pretende produzir uma reação alérgica

mediada por mecanismos celulares. Portanto, em que pese as citações da literatura, fazem-se necessários maiores e mais aprofundados estudos para se esclarecer a verdadeira natureza da reação alérgica provocada pela maleína.

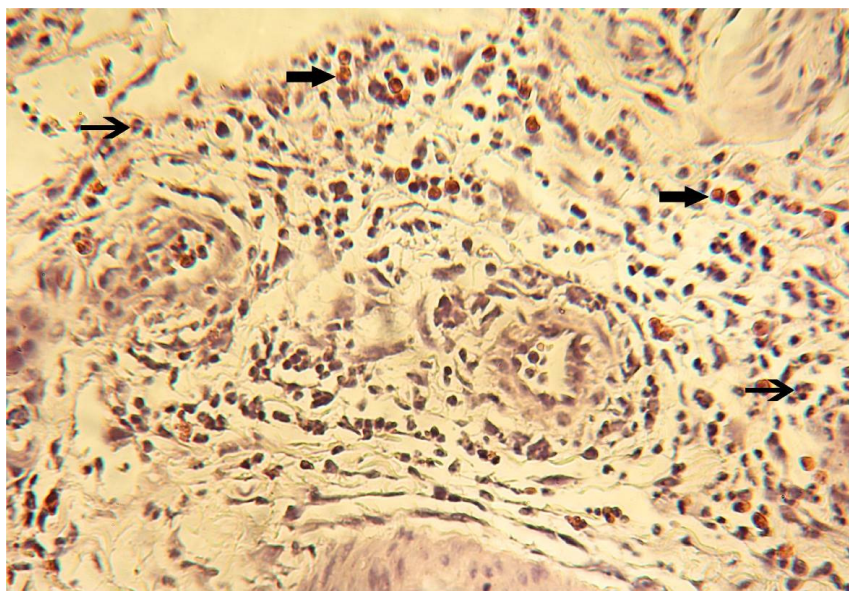


Figura 17. Corte histológico de derme profunda de equino mostrando infiltrado celular de reação alérgica provocada pela Maleína Padrão, 48 horas após a inoculação. Setas largas: eosinófilos; setas estreitas: neutrófilos. HE, 250x.

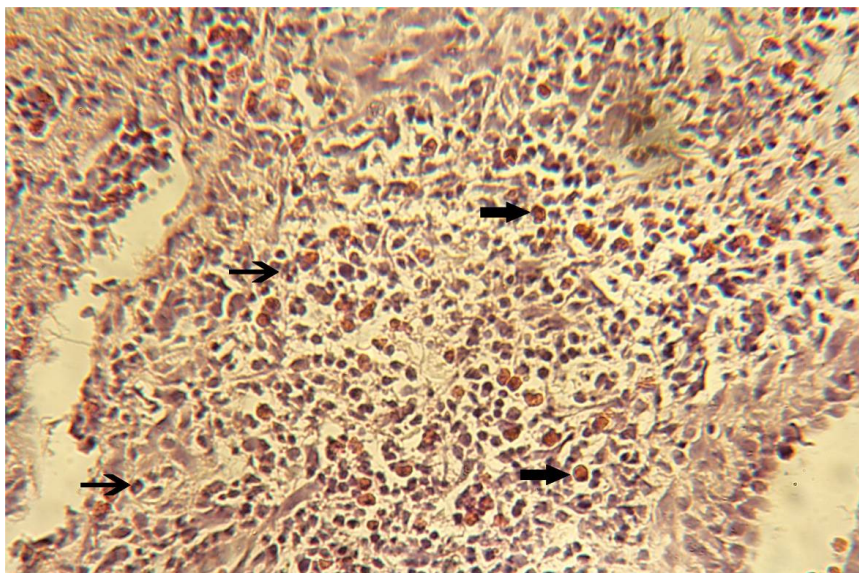


Figura 18. Corte histológico de derme profunda de equino mostrando infiltrado celular de reação alérgica provocada pela Maleína Experimental nº 2, 48 horas após a inoculação. Setas largas: eosinófilos; setas estreitas: neutrófilos. HE, 250x.

4.5. Avaliação da soroconversão após a maleinização dos controles negativos

Os controles negativos que tiveram a sua resposta humoral avaliada em diferentes momentos após a aplicação das maleínas confirmaram a soroconversão no teste de

FC. Esses animais apresentaram títulos decrescentes de anticorpos anti-*B. mallei*, voltando ao *status* de negativos 120 dias após a maleinização, o que corrobora os trabalhos de Huitema (1969), Hagebock *et al.* (1993) e Sprague *et al.* (2009) (Tabela 4).

Tabela 4. Resposta sorológica no teste de fixação de complemento de animais controle negativo após maleinização com a maleína experimental nº 4 e a maleína padrão

Animal	Dias após a maleinização		
	30	60	120
558	1:40	1:5	Negativo
633	1:20	1:5	Negativo
641	1:160	1:10	Negativo
642	1:10	Negativo	Negativo

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Mormo é considerado uma doença re-emergente, e o número de casos no Brasil está aumentando com o surgimento de focos em regiões anteriormente livres. O Mormo é uma doença grave, com potencial zoonótico, de alta letalidade, que requer a atenção e os esforços das autoridades sanitárias nacionais, da área animal, principalmente, mas também da área humana. Para o seu controle e erradicação, serão necessárias ações bem planejadas e instrumentos eficientes de identificação de animais infectados. Nesse contexto, insere-se a contribuição do presente trabalho. A metodologia de produção da maleína descrita neste estudo provou ser capaz de melhorar a qualidade do reagente naquilo em que ele é mais deficiente, a sensibilidade, sem, contudo, comprometer a sua especificidade. A sensibilidade ainda poderá ser melhorada se considerarmos que os antígenos de melhor resposta, produzidos individualmente, poderão ser associados em um único produto. Além disso, esses reagentes poderão ser utilizados como antígenos em testes sorológicos (FC, ELISA, imunoblot e outros), cuja padronização colocará à disposição das autoridades veterinárias nacionais uma gama ainda maior de opções para aperfeiçoamento do

programa de controle e erradicação do Mormo. A nova metodologia empregada na produção da maleína poderá facilmente ser utilizada para a produção de outros produtos biológicos, como as tuberculinas bovina e aviária. A contribuição deste trabalho, portanto, não é apenas de ordem técnica e sanitária, é também de ordem econômica, pois oferece ao país a possibilidade de se tornar auto-suficiente na produção de um insumo que atualmente precisa ser importado, com razoável dispêndio financeiro.

6. CONCLUSÕES

A metodologia de filtração tangencial foi eficiente na purificação das frações de alto peso molecular constitutivas da maleína e consideradas mais imunorreativas.

Algumas das estirpes autógenas de *B. mallei* isoladas de casos de Mormo no nordeste brasileiro foram capazes de produzir maleína com potencial para ser utilizada como teste auxiliar no diagnóstico da doença.

As maleínas experimentais parcialmente purificadas, produzidas a partir das estirpes autógenas de *B. mallei*, são mais potentes que a maleína padrão utilizada neste estudo.

7. REFERÊNCIAS

- ACHA, P. N.; SZYFRES, B. In: *Zoonoses and communicable diseases common to man and animals*. 2 ed. Washington, DC: Pan American Health Organization. 1987, v.503. p.86-89.
- AL-ANI, F.K. Glanders in horses: a review. *Sud. J. Vet. Sci. Anim. Husb.* v.32, p.1-10, 1993.
- AL-ANI, F. K.; AL-RAWASHDEH, O. F.; ALI, A. H. *et al.* Glanders in horses: clinical, biochemical and serological studies in Iraq. *Veterinarski Arhiv*, v.68, p.155-162, 1998.
- AL-ANI, F. K., ROBERSON, J. Glanders in horses: A review of the literature. *Vet. Arhiv*, v. 77, p. 203-218, 2007.
- ARUN, S.; NEUBAUER, H.; GUREL, A. *et al.* Equine glanders in Turkey. *Vet. Rec*, v. 144, p. 255-258. 1999.
- BARZAGANI, T. T.; TADJBAKHS, H.; BADI, A. *et al.* The outbreak of glanders in some racehorses in three states of Iran. *J. Equ. Vet. Sci.* v. 16, p. 232-236, 1996.
- BERNARDELLI, A. *Producción y control de tuberculina bovina y aviar: Derivado Proteico Purificado (DPP)*. Buenos Aires: Ediciones Senasa, 2007. 74p.
- BLAHA, T. In: *Applied veterinary epidemiology*. New York: Elsevier, 1989. p. 109-201.
- Brasil. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Portaria n. 64 de 18 mar. 1994. Normas para Produção e Controle de Tuberculina PPD. *Diário Oficial*, Brasília, 23 mar. 1994. Seção 1, p. 4198-4200.
- Brasil. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Instrução Normativa n. 24 de 5 abr. 2004. Normas para o Controle e a Erradicação do Mormo. *Diário Oficial*, Brasília, 12 abr. 2004. Seção 1, p. 7-10.
- Brasil. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e da Tuberculose Animal – PNCEBT. *Manual Técnico*. Brasília, 2006.
- Brasil. SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA. Nota Técnica DSA n. 60 de 6 set. 2008. Brasília, 2008.
- CENTERS for Disease Control and Prevention (CDC). www.cdc.gov. Acesso em: 20 dez. 2011.
- CRAVITZ, L.; MILLER, W. R. Immunologic studies with *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei*: I Serological relationships between *M. mallei* and *M. pseudomallei*. *J. Infect. Dis.* v. 86, p. 46-51, 1950.
- DERBYSHIRE, J.B. Eradication of glanders in Canada. *Can. Vet. J.* v. 43, p. 722-726, 2002.
- DESHAZER, D.; WAAG, D.M.; FRITZ, D. L. *et al.* Identification of a *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. *Microb. Pathog.* v. 30, p.253-269, 2001.
- DISEASES notifiable to the OIE [2011] World Organization for Animal Health. Disponível em: <http://www.oie.int>. Acesso em: 20 jun. 2011.
- EDELHOCH, H.; DE CROMBRUGGHE, B. The properties of thyroglobulin: 13. The structure of reduced alkylated thyroglobulin. *J. Biol. Chem.* v. 24, n. 19, p. 4357-4365, 1966.

- ELSCHNER, M.C.; SCHOLZ, H.C.; MELZER, F. *et al.* Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Veterinary Research*, v. 7, n. 4, 2011.
- EVANS D. Utilization of carbohydrates by *Actinobacillus mallei*. *Can. J. Microbiol.* v. 12, p. 625–639, 1966.
- FLUGGE, F. *Pseudomonas*. In: Merchant, I.A.; Packer, R.A. *Veterinary Bacteriology and Virology*, 7 ed. Ames: Iowa State University Press, 1967. p. 659-663.
- FRITZ, D.L.; VOGEL, P.; BROWN, D.R. *et al.* The hamster model of intraperitoneal *Burkholderia mallei* (Glanders). *Vet. Pathol.*, v. 36, p. 276-291, 1999.
- FRITZ, D.L.; VOGEL, P.; BROWN, D.R. *et al.* Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*). *Vet. Pathol.*, v. 37, p. 626-636, 2000.
- GLANDERS. Chapter 2.5.8. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [2008]. World Organization for Animal Health (OIE). Disponível em: <http://www.oie.int>. Acesso em: 20 jun. 2011.
- HAGEBOCK, J.M.; SCHLATER, L.K.; FRERICHS, W.M. *et al.* Serologic responses to the mallein test for glanders in solipeds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 5, p. 97-99, 1993.
- HENNING, M. W. *Animal Diseases in South Africa*. 3 ed. Pretoria: Central News Agency, 1956. p. 159-181.
- HOWE, C. In: *The Oxford Medicine*. New York: Oxford University Press, 1949. p. 185-201.
- HUITEMA, H. Production of mallein PPD. *Neth. J. Vet. Sci.* v. 2, n. 2, p. 127-133, 1969.
- HUTYRA, F.; MAREK, J. *Special Pathology and Therapeutics of Domestic Animals*. Chicago: Alex Eger, 1926.
- JANA, A. M.; GUPTA, A. K.; PANDYA, G. *et al.* Rapid diagnosis of glanders in equine by counterimmunoelectrophoresis. *Indian Vet. J.*, v. 9, p. 5-9, 1982.
- KRISHNA, L.; GUPTA, V. K.; MASAND, R. Pathomorphological study of possible glanders in solipeds in Himachal Pradesh. *Ind. Vet., J.*, v. 69, p. 211–214, 1992.
- MACFADDIN, J.F. *Biochemical tests for identification of medical bacteria*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2000. 912 p.
- MAREK, J.; MANNINGER, R. Rotzkrankheit: Malleus. In: *Spezielle Pathologie und Therapie der Haustiere*, 9 ed. Jena: Gustav Fischer, 1945. p. 591– 627.
- MERCHANT, I. A.; R. A. PACKER. *Veterinary Bacteriology and Virology*, 7 ed., Ames: Iowa State University Press, 1967. p. 364-369.
- MICHALANY, J. *Técnica histológica em anatomia patológica: com instruções para o cirurgião, enfermeira e citotécnico*. São Paulo: EPU, 1980. 277p.
- MILLER, W.R.; PANNELL, L.; CRAVITZ, L.; *et al.* Studies on certain biological characteristics of *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei*: II Virulence and infectivity for animals. *J. Bacteriol.*, v. 55, p. 127-135, 1948.
- MOTA, R. A.; BRITO, M. F.; CASTRO, F. J. C. *et al.* Mormo em equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 20, n. 4, p. 155-159, 2000.

- MUHAMMAD, G.; KHAN, M.Z.; ATHAR, M. Clinico-microbiological and therapeutic aspects of glanders in equines. *J. Equine Sci.*, v. 9, p. 93–96, 1998.
- NAUREEN, A.; SAQIB, M.; MUHAMMAD, G. *et al.* Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. *J. Vet. Diagn. Invest.*, v. 19, p. 362–367, 2007.
- NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L.D.; ZACHARIAH, R. *et al.* Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: State-of-the-art and perspectives. *J. Vet. Med. B*, v. 52, p. 201-205, 2005.
- NIERMAN, W.C.; DESHAZER, D.; STANLEY, H.K. *et al.* Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *PMAS*, v. 101, n. 39, p. 14246–14251, 2004.
- PESQUISA da Produção da Pecuária Municipal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2010. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010. Acesso em: 1º jan. 2012.
- REDFEARN, M. S., N. J. PALLERONI, R. Y. STANIER (1966): A comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei*. *J. General Microbiol.* v. 43, p. 293-313, 1966.
- ROGUL, M; BRENDLE, J. J.; HAAPALA, D. K; ALEXANDER, A. D. Nucleic acid similarities among *Pseudomonas pseudomallei*, *Pseudomonas multivorans* and *Actinobacillus mallei*. *J. Bacteriol.* v. 101, p. 827-853, 1970.
- ROMERO C.M.; DESHAZER, D.; FELDBLYUM, T. *et al.* Genome sequence alterations detected upon passage of *Burkholderia mallei* ATCC 23344 in culture and in mammalian hosts. *BMC Genomics*, v. 7, p. 228, 2006.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 3 ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2010. 264p.
- SILVA, K.P.C.; MOTA, R.A.; CUNHA, A.P. *et al.* Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 29, n.5, p. 439-444, 2009.
- SPRAGUE, L.D; ZACHARIAH, R.; NEUBAUER, H. *et al.* Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. *BMC Vet. Res.* v. 5, p. 32, 2009.
- SMITH, P. B., CHERY, W.B.. Identification of *Malleomyces* by specific bacteriophages. *J. Bacteriol.* v. 74, p. 668-672, 1957.
- STEELE J.H. Bacterial, rickettsial and mycotic diseases. In: STEELE, J.H. *Handbook Series in Zoonoses*. Boca Raton: CRC Press, 1980. p.339-351.
- CHAPTER 2.5.8: Glanders. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, [2008]. WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH. OIE. Disponível em: <http://www.oie.int>. Acesso em: 20 jun. 2011.
- THE CENTER for Food Security and Public Health (CFSPH). Iowa State University. College of Veterinary Medicine. GLAN_H0807. 2007. Disponível em: www.cfsph.iastate.edu. Acesso em: 20 dez. 2011.
- THE WORLD Animal Health Information System (WAHIS), [2011]. World Organization for Animal Health. Disponível em: <http://www.oie.int>. Acesso em: 20 jun. 2011.

TIZARD, I.R. *Veterinary Immunology*: an introduction. 8 ed. Saunders, 2008. 574p.

VERMA, R.D.; VENKATESWARAN, K.S; SHARMA, J.K. *et al.* Potency of partially purified malleo-proteins for mallein test in the diagnosis of glanders in equines. *Vet. Microbiol*, v. 41, p. 391-397, 1994.

WERNERY, U.; ZACHARIA, R; WERNERY, R. *et al.* Ten years of freedom from notifiable equine diseases in the UnitedArab Emirates. In: THE 15TH INTERNATIONAL CONFERENCE OF RACING ANALYSTS AND VETERINARIANS, 2005. Dubai. Proc... Dubai: 2005. p. 1-4.

WETMORE, P. W., W. S. GOCHENOUR. Comparative studies on the genus *Malleomyces* and selected *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* v. 72, p. 79-89, 1956.

WILKINSON, L. Glanders: medicine and veterinary medicine in common pursuit of a contagious disease. *Med. Hist.* v. 25, p. 363-84, 1981.

8. ANEXOS