



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Medicina Veterinária
Câmpus de Araçatuba

RAFAEL PEREIRA TAKEUTI

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE ELISA INDIRETO PARA
O DIAGNÓSTICO DE MORMO**

**Araçatuba – São Paulo
2017**

RAFAEL PEREIRA TAKEUTI

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE ELISA INDIRETO PARA O
DIAGNÓSTICO DE MORMO**

Trabalho Científico, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Araçatuba, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

**Orientador: Prof. Adjunto Francisco Leydson
Formiga Feitosa**

**Araçatuba – São Paulo
2017**

ENCAMINHAMENTO

Encaminhamos o presente Trabalho Científico para que a Comissão de Estágios Curriculares tome as providências cabíveis.

Rafael Pereira Takeuti
Estagiário

Prof. Adjunto Francisco Leydson Formiga Feitosa
Orientador

Araçatuba – São Paulo
Junho / 2017

AVALIAÇÃO DO TESTE DE ELISA INDIRETO PARA O DIAGNÓSTICO DE MORMO

Rafael Pereira Takeuti

RESUMO

O mormo é uma doença infectocontagiosa reemergente, causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, que acomete equídeos, podendo acometer o homem e outros animais carnívoros e pequenos ruminantes; portanto, apresenta grande risco para a saúde dos animais e seres humanos de acordo com a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), no Brasil o mormo é de notificação obrigatória e são feitas ações coordenadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), instituído pela instrução normativa nº 17, de 8 de maio de 2008. O objetivo do estudo foi analisar o uso do teste ELISA indireto no diagnóstico de mormo. Para tanto, foram obtidos cinco estudos que se enquadravam nos critérios propostos, sendo um do Google acadêmico em língua portuguesa e quatro do PubMed em língua inglesa. Nesse presente estudo foi possível concluir que o teste de ELISA indireto apresenta eficiência com futuro promissor para rotina de auxílio diagnóstico sorológico de mormo, por apresentar melhor sensibilidade e especificidade.

Palavras-chave: *mormo. ELISA. diagnóstico. sorologia, burkholderia mallei.*

EVALUATION OF THE INDIRECT ELISA TEST FOR THE DIAGNOSIS OF GLANDERS

Rafael Pereira Takeuti

SUMMARY

Glanders is a reemerging infectious-contagious disease caused by the *Burkholderia mallei* bacterium, which affects equidae, which can affect humans and other carnivorous animals and small ruminants; Therefore, presents a great risk to the health of animals and humans according to the World Organization of Animal Health (OIE), in Brazil the mormo is obligatory notification and actions are coordinated by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) , Through the National Equine Health Program (PNSE), established by normative instruction n° 17, of May 8, 2008. The objective of the study was to analyze the use of the indirect ELISA test in the diagnosis of glanders. For that, five studies were obtained that fit the proposed criteria, being one of Google academic in Portuguese and four of PubMed in English. In this present study, it was possible to conclude that the indirect ELISA test is efficient with a promising future for serological diagnosis of glanders, since it presents better sensitivity and specificity..

Key-words: *glanders. ELISA. diagnosis. Serology. burkholderia mallei.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. Figura 1. Mapa. Áreas do Território Nacional com e sem ocorrência de Mormo até agosto de 2015..... 11
2. Figura 2. Casos confirmados de Mormo, Brasil..... 12

LISTA DE TABELAS

1. Tabela 1. Relação do nº amostral com a especificidade e sensibilidade do teste ELISA indireto encontrados por autores selecionados através de busca sistematizada de literatura. 15

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ELISA - *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay*

FC - Fixação de Complemento

MAPA - Ministério de Agricultura Pecuária e Abastecimento

OIE - *World Organization of Animal Health*

PNSE - Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos

Se - Sensibilidade

Sp - Especificidade

WB - *Western Blotting*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	14
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4	CONCLUSÃO	16
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18

2. INTRODUÇÃO

O mormo é uma zoonose infecto-contagiosa causada pela bactéria *Burkholderia mallei*, sendo considerada uma das mais antigas doenças que acometem os equídeos, causando hipertermia, sinais respiratórios e lesões cutâneas. A doença geralmente é crônica em equinos e de caráter agudo em asininos e muares, com evolução em poucos dias a anos. Por ser uma zoonose altamente contagiosa e frequentemente fatal de solípedes, o mormo é causado por uma bactéria Gram-negativa, não móvel e facultativamente intracelular. A bactéria *B. mallei* é a mais conhecida de sua família *Burkholderiaceae*, encontra-se presente no solo e é patógeno obrigatório para mamíferos, sendo os cavalos altamente susceptíveis à infecção e considerados reservatórios naturais, embora mulas e burros também sejam susceptíveis (TELES et al., 2012).

No Brasil o mormo é de notificação obrigatória e são feitas ações coordenadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), instituído pela instrução normativa nº 17, de 8 de maio de 2008 (MAPA, 2008). O PNSE visa ao fortalecimento do complexo agropecuário dos equídeos, por meio de ações de vigilância e defesa sanitária animal, através das seguintes atividades: I - educação sanitária; II - estudos epidemiológicos; III - controle do trânsito; IV - cadastramento, fiscalização e certificação sanitária; e V - Intervenção na ocorrência de focos de doenças de interesse. As ações previstas no PNSE em cada unidade da federação são de responsabilidade das respectivas Secretarias de Agricultura ou agências de defesa agropecuária. O controle de trânsito dos equídeos é necessário para sua prevenção, o que visa a instrução normativa nº 24, de 5 de abril de 2004 (MAPA, 2004), que estabelece as normas para controle e erradicação do mormo no Brasil, as principais medidas são o controle de trânsito e de eventos de aglomeração de equídeos, bem como o saneamento dos focos detectados. Todas as medidas são baseadas nos resultados de testes sorológicos realizados por laboratórios privados credenciados pelo MAPA ou por laboratórios oficiais do MAPA (CASTRO, 2015; BRASIL, 2015).

O período de incubação do mormo varia de acordo com a via de infecção, intensidade da exposição e fatores intrínsecos do hospedeiro, podendo levar dias a meses. O diagnóstico laboratorial é de extrema necessidade às medidas preventivas da doença. O teste sorológico para diagnóstico do mormo preconizado para trânsito

internacional de equídeos é a fixação do complemento (FC), porém outros ensaios também são considerados adequados para dar suporte epidemiológicos pela *World Organization of Animal Health* (OIE), como *Western Blotting* (WB) e *Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay* (ELISA) (TELES et al., 2012).

A doença ressurgiu no Brasil após várias décadas sem relatos oficiais (TELES et al., 2012), como ilustradas nas figuras a seguir notificadas pelo MAPA (BRASIL, 2015).

Mapa. Áreas do Território Nacional com e sem ocorrência de Mormo até agosto de 2015.

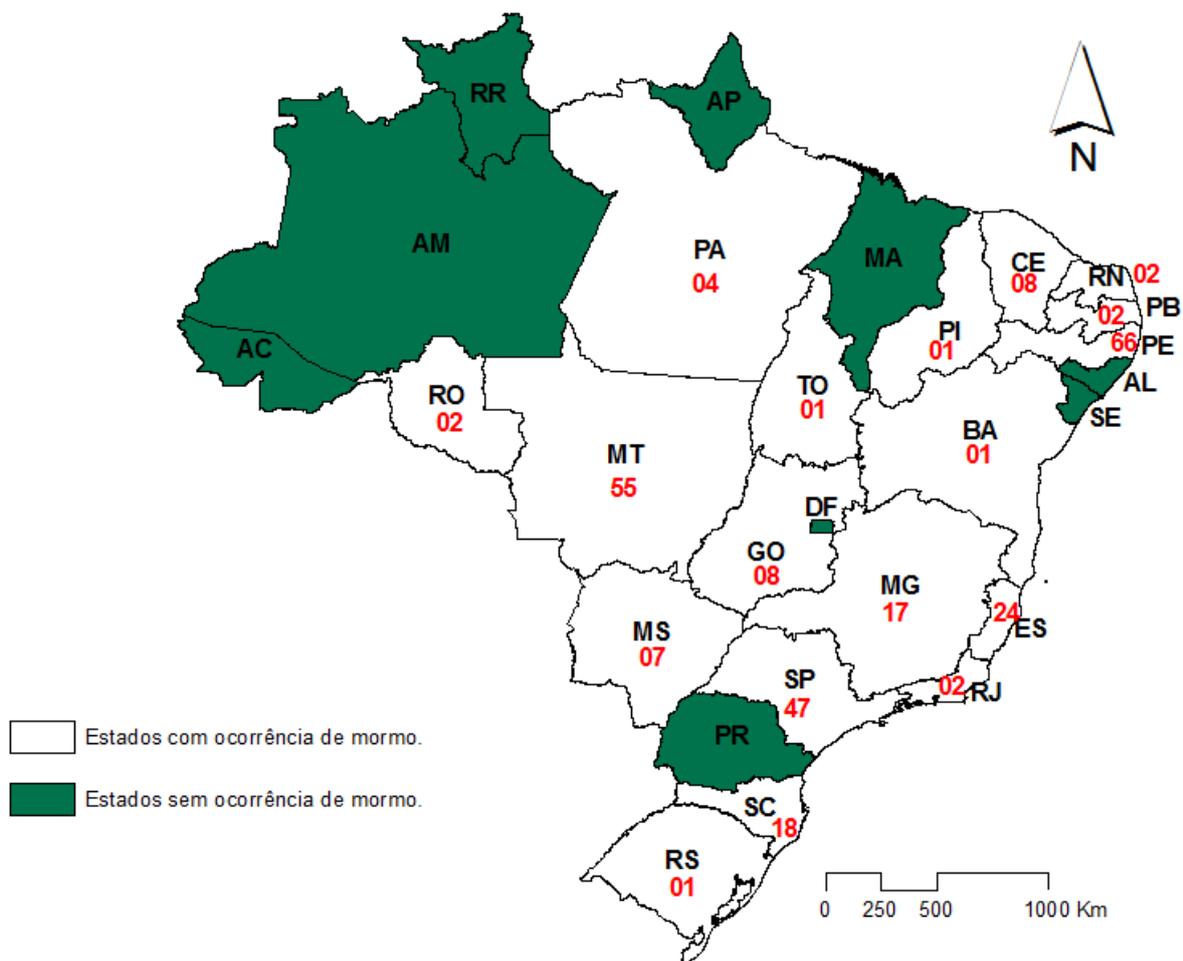


Figura 1. Mapa. Áreas do Território Nacional com e sem ocorrência de Mormo até agosto de 2015 (BRASIL, 2015).

Casos Confirmados de Mormo, Brasil			
UF	2013	2014	2015 (Agosto)
AL	4	1	0
AM	1	0	0
BA	4	7	1
CE	47	10	8
DF	0	0	0
ES	40	4	24
GO	0	1	8
MA	5	0	0
MG	4	7	17
MS	0	0	7
MT	0	18	55
PA	0	6	4
PB	3	10	2
PI	0	0	1
PE	28	95	66
PR	2	2	0
RJ	0	0	2
RN	4	5	2
RO	12	8	2
RS	0	0	1
RR	0	1	0
SC	0	0	18
SE	11	1	0
SP	20	26	47
TO	0	0	1
Total Geral	189	202	266

Figura 2. Casos confirmados de Mormo, Brasil (BRASIL, 2015).

A Figura 1 mostra o mapa do Brasil dividindo as ocorrências de mormo até o mês de agosto do ano de 2015, visto que nos anos anteriores (2013 e 2014) o número de casos totais aumentaram gradativamente, tendo em vista que os dados se limitaram, tão somente, até o mês de agosto de 2015 (Figura 2).

No Brasil o teste padronizado pelo MAPA é a prova sorológica de FC, realizada em laboratório oficial ou credenciado pelo MAPA, conforme a referida Instrução Normativa; porém, o WB foi desenvolvido na Alemanha e passou a ser adotado como prova confirmatória (CASTRO, 2015; BRASIL, 2015).

De acordo com Castro (2015) a avaliação de um teste de diagnóstico depende da sensibilidade (Se) e da especificidade (Sp), na presença de critérios seguros de classificação dos indivíduos, resultando em amostras verdadeiro-positivos e verdadeiro-negativos. No caso da avaliação de testes sorológicos para diagnóstico do mormo, a definição de verdadeiro-negativo seria de animais originários de área livre da doença; porém, ressalta que há grande dificuldade de adotar um único critério de classificação de verdadeiro-positivo que se aproxime da situação real, porém os critérios mais comumente adotados são: a presença de sinais clínicos, sorologia positiva para o teste padrão de FC e isolamento bacteriano.

O teste de fixação de complemento tem a sensibilidade alta de 90% a 95%, porém ocorrem reações falso-negativas que foram ocasionalmente observadas no soro de animais jovens, gestantes e idosos, e reações falso-positivas em aproximadamente 1% dos soros que foram testados com antígeno composto por células inteiras (TELES et al., 2012). A padronização insuficiente do antígeno pode comprometer a qualidade da reação, resultando no comprometimento da especificidade e sensibilidade do teste, sendo assim, questionável sua aplicabilidade. O teste de ELISA indireto tem como finalidade identificar e quantificar anticorpos em amostras de soro. Trata-se de ensaio responsável por medir a interação entre antígeno e anticorpo, que não depende de precipitação, aglutinação ou fixação do complemento (TELES et al., 2012).

O teste FC que é realizado no Brasil apresenta baixa sensibilidade, diferente dos relatados em outros países e pode não contribuir para o controle do mormo, permitindo a propagação da doença, por criar uma ideia errônea em relação aos animais falsos-negativos, fazendo com que os criadores relaxem com as medidas de biossegurança, como a quarentena de animais recém-adquiridos, maior permissividade dos animais durante eventos com aglomeração de equídeos, e por permitir que os animais doentes permaneçam no rebanho com o agente endêmico, possibilitando, com isso, a transmissão para animais sadios (CASTRO, 2015).

Os resultados falso-negativos dos testes acabam permitindo a disseminação do agente infeccioso em áreas e rebanhos livres; além de levar ao sacrifício de animais sadios e restrições desnecessárias ao comércio e trânsito de animais, o que resultaria em perdas financeiras (CASTRO, 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho teve por objetivo responder ao seguinte questionamento: “há eficiência na utilização do teste de ELISA indireto no diagnóstico para Mormo?” por meio de metodologia de revisão sistemática de literatura. Para isso, foram utilizadas informações obtidas de artigos científicos, que abordassem o assunto em questão. A pesquisa foi realizada nos meses de maio e junho de 2017, utilizando como base de dados as plataformas PubMed e Google acadêmico. Os termos utilizados para busca na plataforma Google acadêmico foram “ELISA indireto Mormo equinos”, e na plataforma PubMed “(“glanders”[MeSH Terms] OR “glanders”[All Fields]) AND (“horses”[MeSH Terms] OR “horses”[All Fields]) AND (“diagnosis”[MeSH Terms] OR “diagnosis”[All Fields] OR “diagnoses”[All Fields]) AND (“enzyme-linked immunosorbent assay”[MeSH Terms] OR (“enzyme-linked”[All Fields] AND “immunosorbent”[All Fields] AND “assay”[All Fields]) OR “enzyme-linked immunosorbent assay”[All Fields] OR “elisa”[All Fields])”.

O critério para seleção de artigos, inclui artigos com disponibilidade de texto integral e publicados no período dos anos de 2007 a 2017, no idioma em língua inglesa ou portuguesa, que correspondessem ao tema proposto sobre animais. Como resultado, após minuciosa avaliação, foram obtidos cinco estudos que se enquadravam nos critérios propostos, sendo um do Google acadêmico em língua portuguesa e quatro do PubMed em língua inglesa.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1. Relação do nº amostral com a especificidade e sensibilidade do teste ELISA indireto encontrados por autores selecionados através de busca sistematizada de literatura.

Autor	Número de amostras de soro	Especificidade	Sensibilidade
KUMAR, S. et al. (2011)	1545	98,88%	100%
PAL, V. et al. (2012)	123	100%	100%
SHINGA, H. et al. (2014)	1811	99,7%	100%
SPRAGUE, L. D. et al. (2009)	806	58,6 – 100%	80 – 100%
TELES, J.A.A. et al. (2012)	300	98,2%	100%

De acordo com os artigos analisados, o tamanho amostral de soro de equinos avaliados com o teste de ELISA indireto variou entre 123 e 1811, conforme observado na tabela 1. Em todos os artigos foi feita comparação dos resultados dos testes diagnósticos de fixação de complemento com ELISA indireto, afim de definir a sensibilidade e especificidade; alguns, contudo, também fizeram o uso de WB como preconiza a OIE para ter melhores resultados na obtenção dos verdadeiro-positivos, verdadeiro-negativos, falso-positivos e falso-negativos. As porcentagens da sensibilidade foram calculadas com os resultados verdadeiro-positivos divididos pela soma de verdadeiro-positivos com falsos negativos; já os valores de especificidade foram calculados com o resultado dos verdadeiro-negativos dividido pela soma de verdadeiro-negativos com falso-positivos. Quase todos artigos usaram de proteínas recombinantes para definir o ponto de corte para o ELISA indireto, baseado nas amostras que caracterizavam como verdadeiro-positivos e verdadeiro-negativo.

Kumar et al. (2011) em seu estudo utilizaram 1545 soros, suas amostras positivas foram 21 definidas com FC somados aos sintomas clínicos, cultura bacteriana, 1524 sendo negativas por FC que não apresentavam sinais de mormo.

Obtendo o resultado de 98,88% de especificidade e 100% de sensibilidade, vistos na Tabela 1.

Pal et al. (2012) analisaram 123 amostras, determinando suas amostras positivas e negativas com a combinação de sintomas clínicos, cultura bacteriana e FC, sendo 21 amostras verdadeiro-positivas, 102 negativas por FC. Ao final de seu estudo, concluíram que o teste de ELISA indireto com dois tipos de proteínas recombinantes apresentou 100% de sensibilidade e especificidade.

Shinga et al. (2014) avaliaram 1811 amostras, sendo 49 amostras de soro positivos para controle e 40 negativas para controle com soro de animais saudáveis sem sinais clínicos e que deram resultados negativos ao teste de FC. Das 1811 amostras analisadas, 1500 eram cavalos, 150 burros e 161 de mulas. Foram obtidas nove (9) amostras negativas para ELISA e positivas para FC, o que fez com que a sensibilidade diminuísse.

Sprague et al. (2009) dividiram em cinco grupos os soros analisados e constataram que em um dos seus grupos (Grupo I), obteve 3 amostras com resultados falso-positivos devido à presença de gordura em excesso no sangue, por isso os resultados foram considerados duvidosos, em seu Grupo III, afirma que obteve resultados falso-negativos devido à baixa qualidade do antígeno, já no Grupo IV, o autor relata que os resultados falso-negativos e duvidosos foram devido à reação cruzada no teste com outras bactérias com parede celular similar. Os autores descreveram que em alguns momentos optou-se por excluir tais dados para montar a especificidade e sensibilidade, levando à variabilidade de seus resultados (Tabela 1). Contudo, afirmaram que o teste de ELISA indireto demonstrou melhores resultados nos outros grupos de amostras sorológicas quando comparado ao de fixação de complemento.

Teles et al. (2012) analisaram 300 amostras de soro sanguíneo, sendo 129 amostras positivas e 171 negativas, utilizando-se soro sensibilizado em cinco (5) éguas com controle positivo com teste de FC e 5 éguas como controle negativo, chegando aos resultados demonstrados na Tabela 1. O autor ainda afirma que se houvesse um *kit* de diagnóstico produzido no país com cepas brasileiras diminuiria os resultados falso-negativos que acontecem no teste de fixação de complemento.

5. CONCLUSÃO

Apesar do baixo número de artigos encontrados que atendiam aos critérios de seleção, pode-se concluir que o teste de ELISA indireto apresenta futuro promissor como rotina de auxílio diagnóstico sorológico de mormo, por apresentar resultados melhores na sensibilidade e especificidade, além da versatilidade e praticidade em sua realização.

Considerando os resultados dos artigos, o referido teste pode vir a substituir o teste de fixação de complemento (FC), método considerado padrão pelo MAPA. Entretanto, requer, ainda, melhor padronização e mais ensaios para concluir o seu pleno desenvolvimento.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRASIL. MAPA. Departamento de saúde animal. Secretária de defesa agropecuária. **Situação do mormo Brasil**. Brasília: MAPA, 2015. p.41-43.

CASTRO, Roberto Soares. Métodos de diagnóstico e estratégias de controle do mormo no Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, [S.l.], v. 18, n. 2, p. 98-103, sep. 2015. ISSN 1415-6326. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/cvt/article/view/30618>>. Acesso em: 7 junho 2017.

KUMAR, S. et al. Use of a Recombinant *Burkholderia* Intracellular Motility A Protein for Immunodiagnosis of Glanders. **Clinical And Vaccine Immunology**, [s.l.], v. 18, n. 9, p.1456-1461, 13 jul. 2011. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.05185-11>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21752949>>. Acesso em: 20 maio 2017.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 24, DE 5 DE ABRIL DE 2004. **Aprova as normas para controle e erradicação do Mormo**. Disponível em: <<http://www.cidasc.sc.gov.br/defesasanimais/files/2012/10/Instru%C3%A7%C3%A3o-normativa-n%C2%B0-24-Aprova-as-Normas-para-o-Controle-e-a-Eradica%C3%A7%C3%A3o-do-Mormo.1.pdf>>. Acesso em: 18 maio 2017.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 17, DE 8 DE MAIO DE 2008. **Institui o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Disponível em: <<https://central3.to.gov.br/arquivo/270022/>>. Acesso em: 18 maio 2017.

PAL, V. et al. Evaluation of Recombinant Proteins of *Burkholderia mallei* for Serodiagnosis of Glanders. **Clinical And Vaccine Immunology**, [s.l.], v. 19, n. 8, p.1193-1198, 13 jun. 2012. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cvi.00137-12>. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3416092/>>. Acesso em: 20 maio 2017.

SHINGA, Harisankar et al. Optimization and Validation of Indirect ELISA Using Truncated TssB Protein for the Serodiagnosis of Glanders amongst Equines. **The Scientific World Journal**, [s.l.], v. 2014, p.1-6, 2014. Hindawi Publishing Corporation. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/469407>. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/469407/citations/>>. Acesso em: 20 maio 2017.

SPRAGUE, Lisa D. et al. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. **BMC Veterinary Research**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.32-37, 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-5-32>. Disponível em: <<http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-5-32>>. Acesso em: 21 maio 2017

TELES, José Andreey A. et al. Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v. 32, n. 9, p.838-842, set. 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2012000900004>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-736X2012000900004>. Acesso em: 17 maio 2017.