



INSTITUTO

INSTITUTO BIOLÓGICO

REUNIÃO CÂMARA SETORIAL DA EQUIDEOCULTURA

MAPA, Brasília-DF, 25 de outubro de 2017



INSTITUTO BIOLÓGICO



Secretaria de Agricultura
e Abastecimento

PROJETO CANANÉIA

Até setembro de 2017 – monitorados 33 equinos

OBJETIVOS PROJETO MORMO

- **Estudo clínico-patológico: investigar os sinais clínicos e lesões histopatológicas de equinos com infecção crônica e aguda**
- **Patogenia e etiologia (*in vivo* e *in vitro*);**
- **Estudo da resposta imunológica à infecção pela *B. mallei* em equídeos;**
- **Avaliação e desenvolvimento de testes sorodiagnóstico (fixação de complemento -FC, ELISA e western blotting-WB)**
- **Padronização de testes moleculares**
- **Cultivo microbiológico – Avaliação do comportamento bacteriano em meios de cultivo**
- **Imunodiagnóstico: teste imunoalérgico (maleína)**

OBJETIVOS PROJETO MORMO

Objetivos:

- avaliar, padronizar e validar métodos sorodiagnósticos e moleculares para identificação de animais infectados;
- avaliar a eficácia dos métodos de sorodiagnóstico na identificação de portadores crônicos;
- monitorar animais com infecção aguda e crônica provenientes de focos;
- acompanhar a dinâmica dos títulos de anticorpos em éguas prenhes soropositivas para mormo;
- avaliar a persistência de anticorpos colostrais em potros filhos de éguas naturalmente infectados;
- avaliar a transmissão via monta natural - garanhão naturalmente infectado

CRITÉRIO DE INCLUSÃO DOS EQUINOS NO EXPERIMENTO

Resultados da FC diferentes de negativo

- Positivo,
- Inconclusivo
- Anticomplementar

Animais doados pelos proprietários

- Polícia militar ES
- Polícia militar SP
- Foco Capivari –SP

Chegada dos equinos da Polícia Militar do Espírito Santo em Cananeia – Segurança no transporte



Instalações - Estação Quarentenária



BAIAS DOS EQUINOS DA ESTAÇÃO QUARENTENÁRIA



Estudo clínico-patológico dos equinos do experimento:

- São inspecionados diariamente pela equipe de funcionários de Cananéia
- E quinzenalmente pela equipe do Instituto Biológico, que realiza investigação clínica detalhada e coleta de amostras.

Grupos experimentais (Cananéia)

Dados preliminares de inspeção clínica e sorodiagnóstico permitem concluir 02 grupos de equinos em fases distintas de evolução da doença:

Infecção aguda (n=04)

Infecção crônica (n=10)

Grupo controle negativo (n=19).



Forma aguda de mormo

Sorodiagnóstico

Positivo: ELISA, WB e FC



Equino do grupo experimental com infecção aguda apresentando fraqueza e prostração

Manifestações clínicas dos equinos grupo experimental - Infecção aguda



Descarga nasal muco-purulenta

Manifestações clínicas dos equinos grupo experimental - Infecção aguda



Descarga nasal muco-purulenta



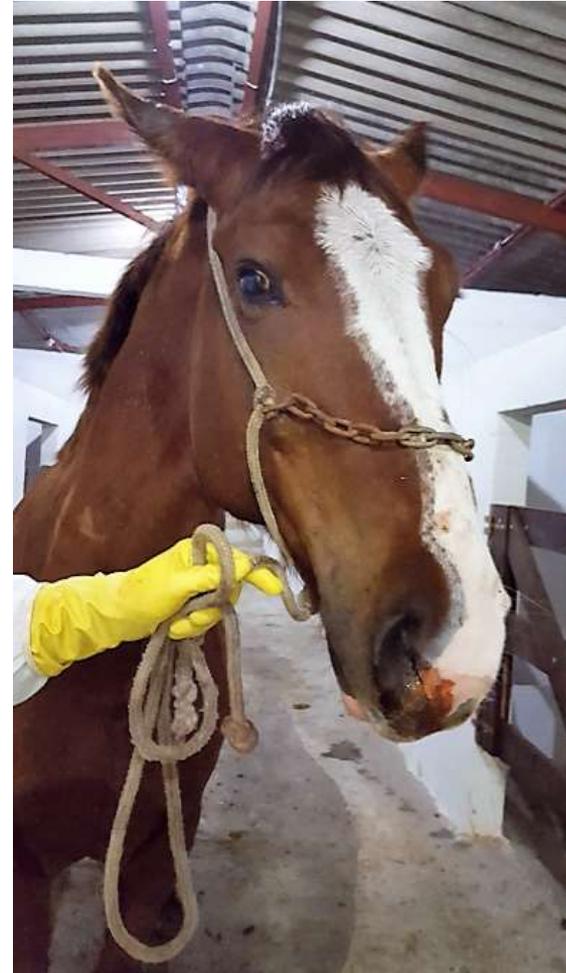
Sorodiagnóstico
Positivo: ELISA, WB e FC

Sinais apresentados equinos - grupo Infecção crônica

Sorodiagnóstico

Positivo: ELISA e WB

Negativo: FC



Hemoptise intermitente

Sinais apresentados equinos - grupo Infecção crônica



Abscessos e nódulos na pele de equino com mormo

Sorodiagnóstico

Positivo: ELISA e WB

Negativo: FC



Sinais apresentados equinos - grupo Infecção crônica

Sorod diagnóstico
Positivo: ELISA e WB
Negativo: FC



Granulomas na pele de equino com mormo

Sinais apresentados equinos - grupo Infecção crônica

Sorodiagnóstico
Positivo: ELISA e WB
Negativo: FC



Equino com infecção crônica – monitorado pela equipe do projeto
por 28 meses (junho de 2015 a outubro de 2017)



Coleta de amostras de sangue

No período de junho de 2015 a setembro de 2017 foram coletadas 1560 amostras de sangue para detecção de anticorpos anti- *B. mallei* no soro por FC, ELISA e WB



FIBRINOGÊNIO
PLASMÁTICO NORMAL

AUMENTO DA TAXA DE
FIBRINOGÊNIO
PLASMÁTICO

O aumento da concentração de fibrinogênio plasmático é um indicador de processo inflamatório em equinos. Nos equinos do grupo na fase aguda, foi evidenciado esse aumento de fibrinogênio, dificultando a obtenção de soro dos equinos deste grupo.

COLETA DE AMOSTRAS PARA DETECÇÃO DIRETA DA *B.MALLEI*

Até setembro de 2017 foram coletadas 3120 amostras de secreções. Estas amostras foram analisadas por PCR e cultivo microbiológico.



Punção abscessos subcutâneos



Estudo Anátomo-histopatológico

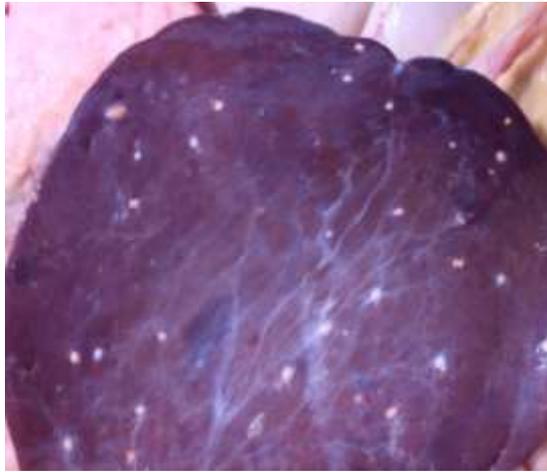
Dos animais mortos foram coletados fragmentos de órgãos.

Para detecção direta da *b.mallei* por pcr e cultivo microbiológico

Exame histopatológico



Lesões fígado



Fonte: Pituco, E. M., 2015 – LVB/IB

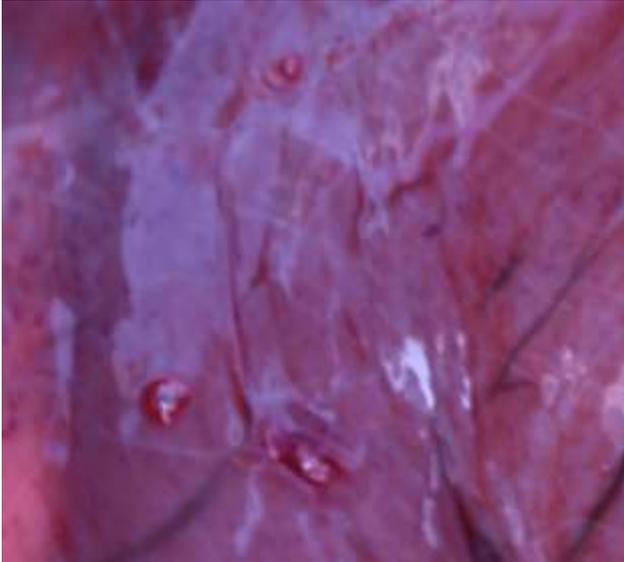
Legenda: foto lesão miliar no fígado de equino positivo mormo.

LESÕES NA TRAQUÉIA



Legenda: equino positivo mormo.

Pulmão



Legenda: equino positivo mormo. Microabscessos, nódulos e hemorragia em pulmão.

Baço



Fonte: Dra Mônica Fagundes C. K. Gunnewiek – SAA/CDA, agosto 2016

Legenda: foto lesão **hemorrágica** no baço de equino positivo mormo.

Linfonodos



Legenda: linfonodo do epiplon aumentado e com necrose



Linfonodos pré-crural estão aumentados e hemorrágicos.

MÉTODOS DE ANÁLISE



MORMO: AVALIAÇÃO CLÍNICA, EPIDEMIOLÓGICA, ANATOMOPATOLÓGICA E MICROBIOLÓGICA

Sorodiagnóstico:

- Fixação de complemento
- Elisa indireto (antígeno recombinante)
- Western Blotting



NECESSIDADE DE SUBSTITUIR FC POR TESTE COM MELHOR DESEMPENHO

PROJETO MORMO CANANÉIA

Testes promissores: ELISA E WB

Estes testes foram validados pela equipe do projeto de Cananéia e no momento a equipe está finalizando informe técnico para pleitear o reconhecimento junto as autoridades sanitárias.

Apresentaram alta sensibilidade, especificidade e fácil execução para identificação de equinos mormo positivos tanto com infecção crônica como aguda. Estes kits denominados ELISA BKM16 e WB: MORMO serão produzidos pelo Panaftosa.

KIT ELISA PANAFTOSA



KIT ELISA PANAFTOSA

O ELISA e WB apresentaram excelente desempenho, repetibilidade e reprodutibilidade, além da estabilidade no resultado em qualquer fase da gestação, enquanto que os resultados da FC apresentaram maiores variações em diferentes coletas do mesmo animal.



ELISA BKM16 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*B. MALLEI*

Recomendado como teste de triagem (fácil execução, boa sensibilidade)

Elisa (indireto): antígeno composto pelo lipopolissacarídeo da parede celular da *B. mallei* **recombinante**.

Diferencia *B. mallei* X *B. pseudomallei*

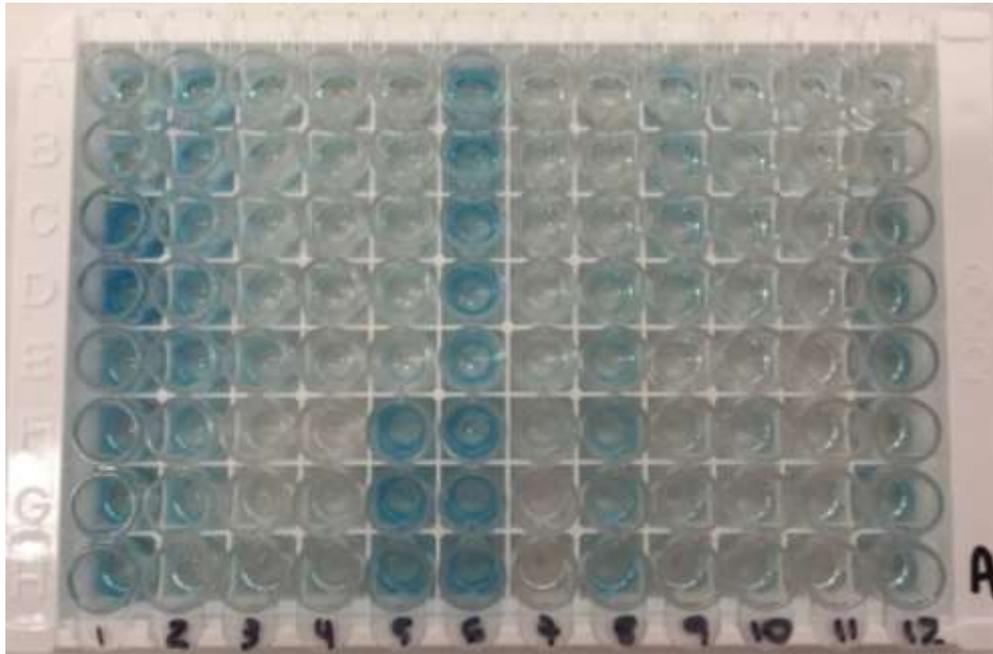
WB - Teste confirmatório, a ser realizado apenas nos soros que resultarem positivos no ELISA, apresenta melhor especificidade que o teste de triagem.



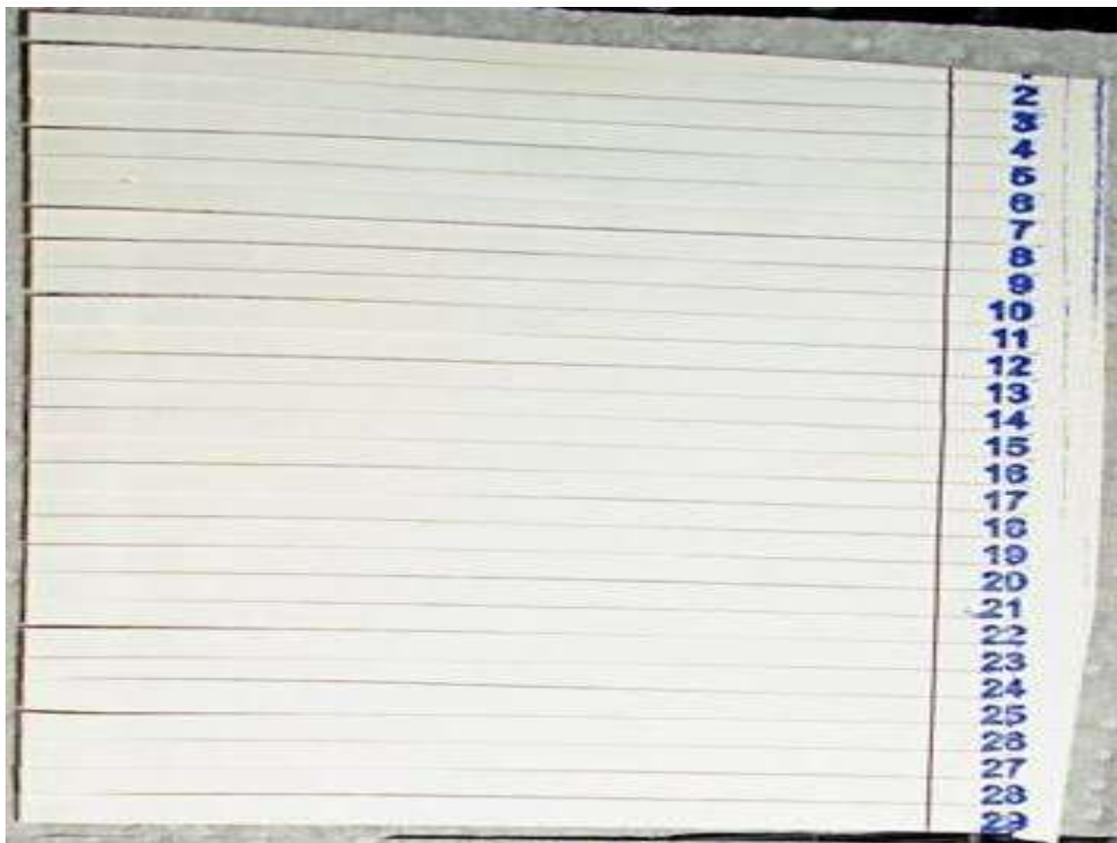
ELISA PANAFTOSA



ELISA PANAFTOSA



WESTERN BLOTTING – TESTE CONFIRMATÓRIO - MORMO



Proteína LPS da *B.mallei* com peso molecular 30 KDA, produzidas em *E. coli*, pelas técnicas de DNA recombinante, purificadas por eletroforese (PANAFTOSA)

WESTERN BLOT- MORMO


 Organização Pan-Americana da Saúde
 
 Organização Mundial da Saúde
 CENTRO REGIONAL PARA as Américas

PANAFTOSA
 Centro Pan-Americano de Febre Aftosa
 Saúde Pública Veterinária

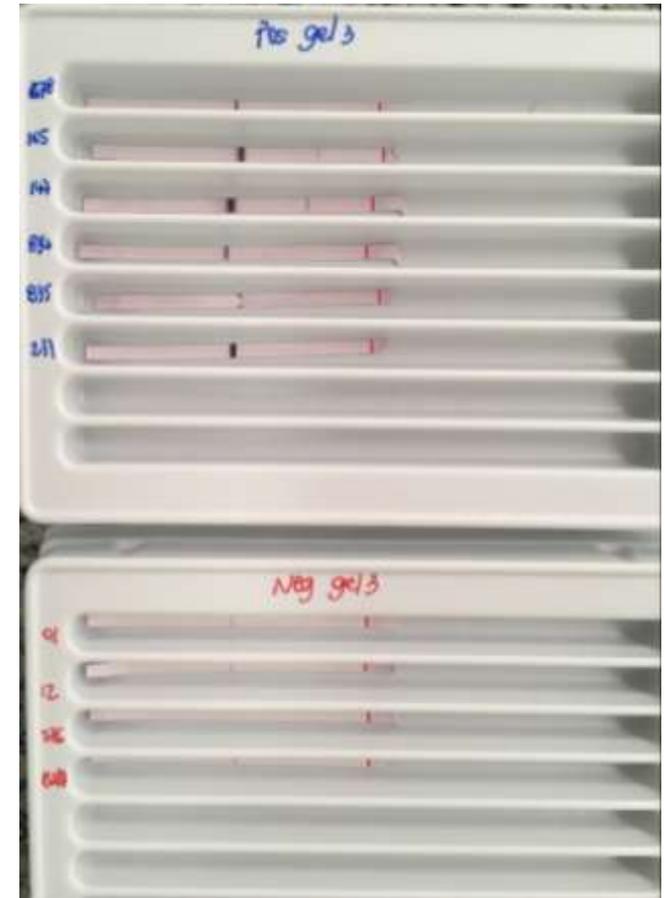

WB - MORMO
 Lote: WB-01-16

COMPONENTES	QUANTIDADE	LOTE
NC	Tiras Sensibilizadas	145 (5 gest)
RL	Tampão de Lavagem 10X	3 (200 mL)
EC	E. coli	1 (450 µL)
LP	Leite em pó	1 (25g ± 2g)
CN	Controle Negativo	1 (150 µL)
CP	Controle Positivo	1 (150 µL)
BC	BCIP	1 (440 µL)
CJ	Conjugado 100x	1 (1,5 mL)
DS	Diluyente de Substrato	1 (130 mL)
NB	NBT	1 (880 µL)
BL	Buta	1

Fabricação: 06/16
Validade: 06/17

Uso veterinário. Somente para diagnóstico. **Manter em geladeira entre 2 e 8°C**
Antes de iniciar o teste, ler as instruções em anexo

PANAFTOSA / SPV
 OPS / OMS



Western Blotting MORMO

 INSTITUTO BIOLÓGICO	FORMULÁRIO DE LEITURA - WB - B. MALLEI - AC.	LVB REG LPA 069 Revisão: 00 Página: 1 de 1 Aprovação: 17/05/2016
	LABORATÓRIO DE PROCESSOS ANALÍTICOS	ISO 17025

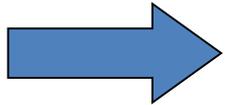
Data da prova: 23/08/2016

Histórico amostras: Banco de soros de equinos (positivos, negativos e inconclusivos na Fixação de complemento).

POSITIVO	11
NEGATIVO	12

SOROS	GEL VERMELHO	WB Lote 01/16	RES.
3834	11		Pos
5222	11		Pos
6653	11		Pos
9361	11		Pos
17485	11		Pos
19921	11		Pos
20743	11		Pos

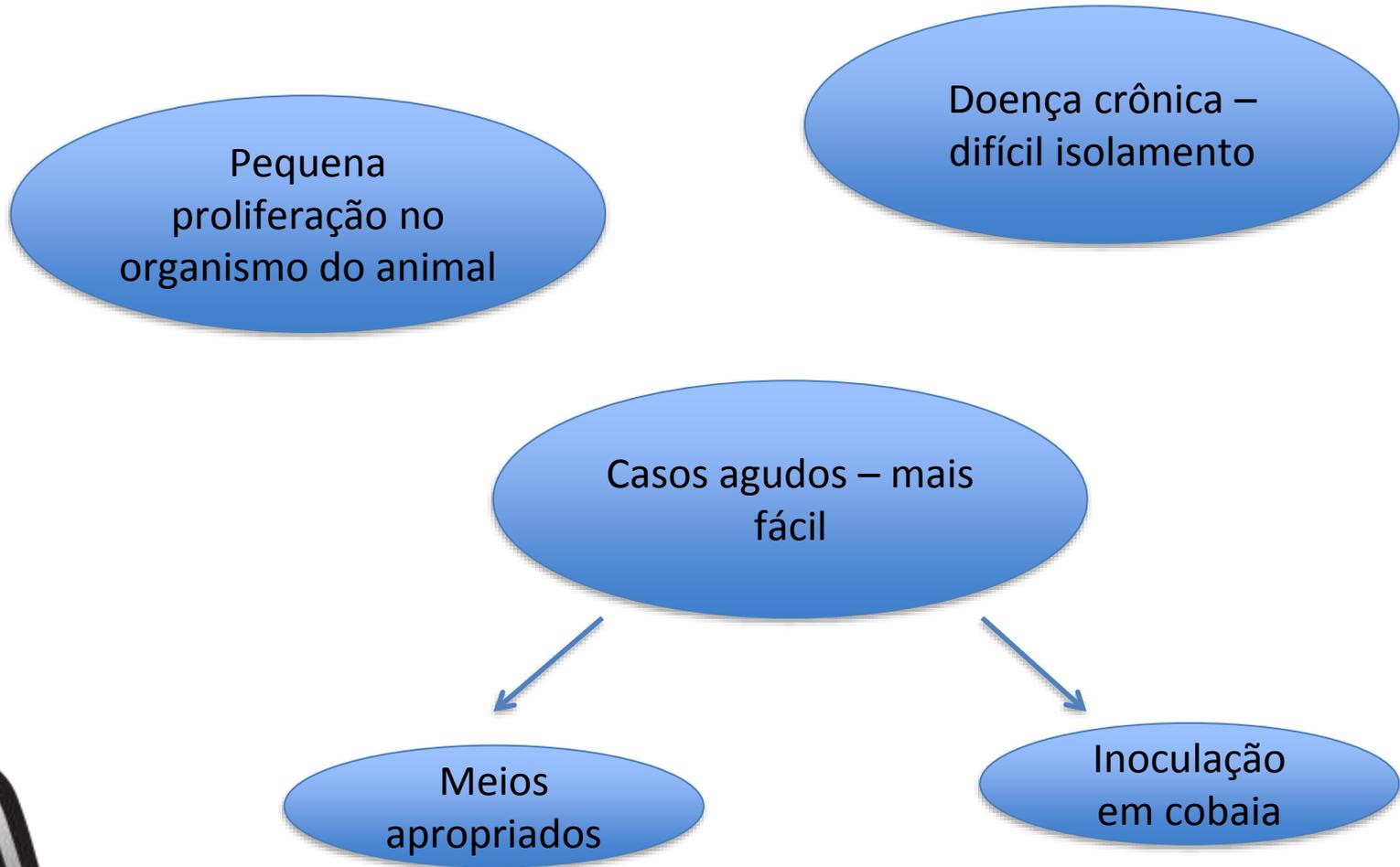
Especificidade do WB



Teste confirmatório ideal para esclarecer os falso-positivos no ELISA e FC



B. Mallei - dificuldade de isolamento



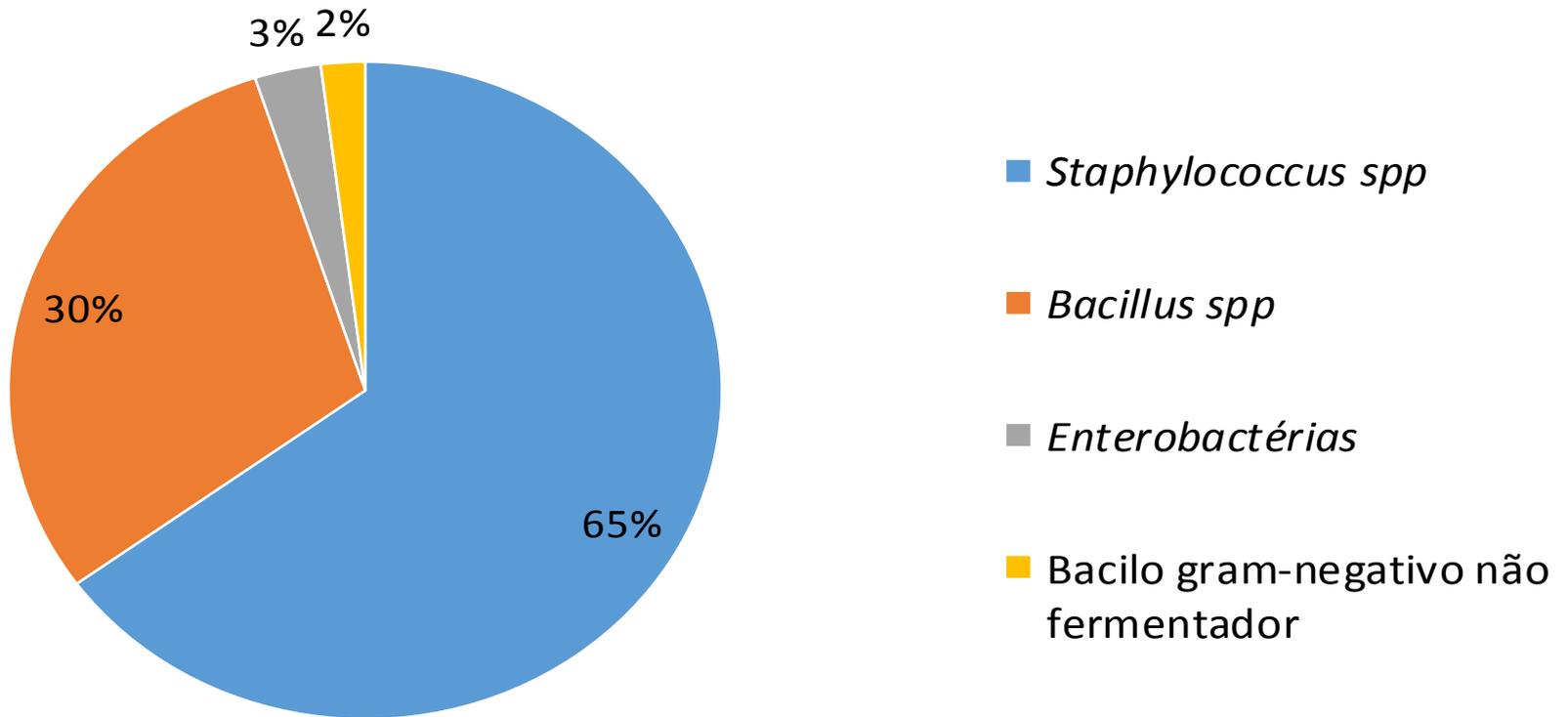
CULTIVO MICROBIOLÓGICO

Difícil isolamento da *B. mallei* devido interferência de bactérias oportunistas isoladas das vias aéreas superiores.

Isolamento *B. mallei* pode ser obtido com maior sucesso em amostras de conteúdo purulento coletadas dos abscessos cutâneos fechados



Cultivo Microbiológico



Projeto Cananeia: resultado microbiológico em 683 amostras de secreções nasais. **Não foi isolada a *B. mallei***

FUTURO

- Sequenciamento do genoma completo
- Estudar virulência das cepas
- Estabelecer o mecanismo preciso envolvendo transmissão transplacental e disseminação pelo sêmen
- Comparar resultados com outros laboratórios

O diagnóstico precoce de mormo constitui um dos mais importantes e difíceis que enfrentam médicos e médicos veterinários no trabalho sanitário que ainda dependem de provas sorológicas.



LVB/IB



“Arte Palavra Alimento” - Uma viagem no tempo em fulldome