



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
MÉDICAS

***BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* NO ESTADO DO**
CEARÁ: CARACTERIZAÇÃO DE RESERVÁRIAS

DIONNE BEZERRA ROLIM

FORTALEZA

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
MÉDICAS

***BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* NO ESTADO DO**
CEARÁ: CARACTERIZAÇÃO DE RESERVÁRIAS

Tese submetida ao Programa de Pós- Graduação
em Ciências Médicas da Universidade Federal do
Ceará como requisito parcial para obtenção do
título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim

Orientanda: Dionne Bezerra Rolim

FORTALEZA

2009

R653b Rolim, Dionne Bezerra

Burkholderia pseudomallei no Estado do Ceará :
caracterização de reservárias / Dionne Bezerra Rolim. –
Fortaleza, 2009.

156 f. : Il.

Orientador: Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza-
Ce, 2009

1. *Burkholderia pseudomallei* 2. Melioidose. 3.
Estudos soropidemiológicos 4. Meio ambiente I.
Sidrim, José Júlio Costa (orient.) II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI NO ESTADO DO CEARÁ:
CARACTERIZAÇÃO DE RESERVÁRIAS

DIONNE BEZERRA ROLIM

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará como
requisito parcial para obtenção do título de Doutor

Aprovada em 16 / 01/ 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim - Orientador
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Aparecida Nagao Dias
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari
Universidade Federal de São Paulo

Prof. Dr. Pedro Luiz Tauil
Universidade de Brasília

À sagrada memória de meu pai – Edgard Rangel Rolim – com
imensa saudade
À minha querida mãe – Francisca Bezerra Rolim

AGRADECIMENTOS

À minha família: minha mãe Francisca; meus irmãos Jonas, Alfredo e Leonardo; minhas cunhadas Maria Augusta, Marineide e Alexia; meus sobrinhos, Jonas, Christiane e Lara e aos demais familiares.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelos ensinamentos e pela imensa dedicação em proporcionar todas as condições para realização do trabalho.

À Professora Aparecida Tiemi Nagao Dias, pela inestimável colaboração e apoio decisivo nos momentos certos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas e às funcionárias Ivone e Rita, pela presteza e atenção.

Aos professores Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, Dr. Antonio Carlos Pignatari e Dr. Pedro Luiz Tauil por aceitarem o convite para participar da banca examinadora.

À Dra. Dina Feitosa Cortez Lima Vilar e ao Dr. Jorge Luis Nobre Rodrigues, pelo apoio irrestrito, motivação e imensa amizade.

Ao Dr. Anastácio Queiroz de Sousa, grande amigo e conselheiro; ao Dr. Timothy Inglis pela amizade, sugestões e colaboração além-mar e ao Prof José Wellington Oliveira pelo apoio estatístico.

Aos meus amigos da “equipe de campo”: Kátia, Viviane, Vânia, Paulo, Ivanclebio e Rosana, e em especial, à Lourdes e à minha prima Joelma, pela amizade e imensa colaboração; e a todos os motoristas da SESA, que me acompanharam e ajudaram nas viagens de campo.

À todos os moradores das comunidades de Tejuçuoca e Banabuiú pela confiança e carinho que me acolheram, e em especial, à Sra.Ceci e Sr. Francisco e seus filhos e netos: Renata, Conceição, Ana Carolina, Caio e Cauã; ao Sr. Silveira e à Rosa; à Sra.Damiana e sua família; à Leina e às agentes comunitárias de saúde, Sra. Mazé e Rosa.

Aos meus amigos da UFC, Everardo, Daniel e Olavo, e em especial, à Terezinha pelo gigantesco apoio no laboratório.

Aos amigos da Secretaria da Saúde, e em especial, à Gláucia pela dedicação, atenção e amizade e ao Luciano Pamplona, pelo grande apoio estatístico, ajuda e amizade.

À Dra. Olívia Bessa e ao Dr. Henrique Sá, coordenadores do curso de medicina da Unifor e aos meus colegas de trabalho: Professoras Adriana, Ana Cláudia, Carina, Andrea, Hildênia, Luciana, Kelly, Professor Antonio, e em especial a Paola, pelo imenso apoio na etapa final, e ao Alexandre, pela amizade e grandiosa colaboração na formatação e trabalho fotográfico.

Aos colegas do Hospital São José, em especial à Dra. Airtes Vitoriano, Dr. Robério Dias, Dra. Melissa Medeiros e aos colegas médicos que me substituíram durante minha ausência.

Aos estagiários, mestrandos e doutorandos do Centro Especializado de Micologia Médica e do laboratório de e imunologia da UFC, pelo convívio, em especial à Ana Karoline pela amizade e atenção; à Enói, Paula e Cynara pela colaboração.

Aos amigos sempre presentes: Renata, Rocileide, Sabrina, Márcia, Braúlio, Fabíola, Christiane e Eurico.

À Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, pelo apoio constante ao trabalho.

Às Secretarias da Saúde dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

À Fundação Cearense de Amparo à Pesquisa (FUNCAP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Acadêmico e Tecnológico (CNPQ) pelo suporte financeiro ao trabalho.

*Chegando o tempo do inverno,
Tudo é amoroso e terno,
Sentindo o Pai Eterno
Sua bondade sem fim.
O nosso sertão amado,
Estrumicado e pelado,
Fica logo transformado
No mais bonito jardim.*

PATATIVA DO ASSARÉ

RESUMO

A melioidose, uma enfermidade causada pelo bacilo Gram-negativo, *Burkholderia pseudomallei*, é endêmica no sudeste da Ásia e na Austrália e tem distribuição esporádica em outras partes do mundo. A doença é descrita nas Américas, sendo emergente no Brasil desde que casos em humanos são bem documentados no Estado do Ceará. Esta pesquisa pretendeu compreender melhor a ecologia da bactéria por meios da caracterização de suas reservárias. O estudo foi realizado em uma pesquisa ambiental de *B. pseudomallei* no solo dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú e na realização de inquérito soro-epidemiológico para a população rural residente nesses locais. Para o estudo ambiental, foram coletadas amostras mensais de solo da superfície até 40 cm de profundidade durante o período de janeiro a dezembro do ano de 2007. Cinco sítios de coleta em cada município, delimitados na residência de pessoas que tiveram melioidose. Para a realização do estudo sorológico, foram coletadas amostras de soro de 321 residentes nessas áreas e efetivado inquérito, que incluiu informações sobre dados demográficos, história de doenças prévias e atividades com exposição relativas a solo e água. A determinação dos títulos sorológicos de anticorpos foi realizada mediante teste imunoenzimático, utilizando microplacas adsorvidas com antígeno filtrado de *B. pseudomallei*. A bactéria foi encontrada no solo dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú em 4,3 % (26/600) das amostras investigadas. As duas regiões apresentaram aspectos geoclimáticos e componentes ambientais, como tipo de solo e vegetação, índice pluviométrico, temperatura similares entre si. A detecção de *B. pseudomallei* ocorreu em clima tropical semi-árido, com índice pluviométrico anual baixo e vegetação de caatinga arbustiva, demonstrando influência de fatores locais que facilitam a sobrevivência e multiplicação do microorganismo. O inquérito sorológico evidenciou 51, 27% (161/327) para o isotipo IgM e 58,49 % (186/317) para o isotipo IgG. A frequência dos títulos de IgM foi maior em crianças do que em adultos, enquanto a frequência de IgG aumentou com a idade. Houve associação significativa entre a ocupação em atividades de agricultura e os títulos de IgM (44.15%, $p<0.005$) e de IgG (44.15%, $p<0.005$) e entre trabalhadores de construção civil e os títulos de IgG (84.6%, , $p=0.005$). A maioria das amostras com títulos elevados mostrou reatividade com as banda na posição 33 a 45 kD que correspondem ao polissacarídeo O da cadeia do lipossacarídeo da bactéria.

Palavras-Chave: Melioidose; *Burkholderia pseudomallei*; ambiente; inquérito sorológico.

ABSTRACT

Melioidosis, a disease caused by the Gram-negative bacteria *Burkholderia pseudomallei*, is endemic in southeast Asia and in Australia and shows a sporadic distribution in other parts of the world. The disease has been described in the Americas, it is an emergent illness in Brazil, as human cases are well documented in Ceará state. This research aims to better understand the ecology of the bacteria. The study was carried out by means of an environmental search for *B. Pseudomallei* in the ground of the cities Tejuçuoca and Banabuiú and by an epidemiological surveillance on the local rural population. For the environmental study, soil samples were collected monthly from the surface down to 40 cm depth from January to December 2007. Five sampling sites in each municipality were chosen near to the homes of people who had melioidosis. For the serological study, serum samples of 321 inhabitants of those areas were collected, and an inquiry was taken that included data about demography, previous illnesses and activities related to exposition to water and soil. Serological titers were determined by means of an immunoenzymatic test, using microplates adsorbed with filtered antigen of *B. Pseudomallei*. The bacteria was found in the soil of Tejuçuoca and Banabuiú municipalities in 4.3% (26/600) of the samples. Both regions show similar geoclimatic and environmental aspects, such as soil and vegetation, rainfall index, and temperatures. Detection of *B. Pseudomallei* occurred in tropical semi-arid climate, with low annual pluviometric index and a shrubby “caatinga” vegetation, showing an influence of local factors enabling the survival and multiplication of the microorganism. Epidemiological surveillance showed 51.27% (161/327) for the IgM isotype and 58.49% (186/317) for IgG isotype. Frequency of IgM titers was higher among children than adults, while IgG frequency raised with age. There was a significant association between agricultural occupations and IgM (44.15%, $p < 0.005$) and IgG titers (44.15%, $p < 0.005$) and between construction workers and IgG titers (84.6%, $p = 0.005$). Most samples with high titers showed reactivity to the 33 and 45 kD bands, which correspond to the polysaccharide O of the liposaccharide chain of the bacteria.

Keywords: Melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*, environmental, epidemiological survey.

Lista de Figuras

Figura 1. Localização geográfica dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú.	39
Figura 2. Sítios de coleta no Município de Tejuçuoca	43
Figura 3. Esquema dos sítios de coleta no Município de Tejuçuoca.....	43
Figura 4. Sítios de coleta no Município de Banabuiú	44
Figura 5. Esquema dos sítios de coleta no Município de Banabuiú.....	44
Figura 6. Sítios de coleta georefenciados nos Municípios de Banabuiú e Tejuçuoca.....	45
Figura 7. Profundidade do sítio de coleta de amostra do solo.....	46
Figura 8. Modelo de coleta de amostra de solo.....	47
Figura 9. Processamento primário das amostras	48
Figura 10. Identificação microbiológica das amostras	49
Figura 11. Produção do antígeno de <i>B. pseudomallei</i>	52
Figura 12. Teste de oxidase e colônias resistência a colistina.....	57
Figura 13. Morfologia das colônias de <i>B. pseudomallei</i> em meios seletivos.....	58
Figura 14. Identificação de <i>B. pseudomallei</i> pelo API20NE	61
Figura 15. Identificação de cepas de <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. violaceum</i> pelo API20NE	61
Figura 16. Isolamento de <i>B. pseudomallei</i> e relação com pluviometria em Banabuiú, 2007.....	64
Figura 17. Isolamento de <i>B. pseudomallei</i> e relação com pluviometria em Banabuiú, 2007.....	65
Figura 18. Soropositividade para IgG e IgM anti- <i>B. pseudomallei</i> , de acordo com a faixa etária.....	68
Figura 19. Eletroforese em gel de poliacrilamida de dois preparados obtidos por filtração de <i>B. pseudomallei</i> . As tiras 1 e 2 mostram detecção de LPS específico após coloração do gel com nitrato de prata. As tiras 3 e 4 mostram detecção de proteínas após coloração com reagente <i>comassie blue</i> . .	72
Figura 20. Análise de amostras de soro de indivíduos residentes em Banabuiú com títulos baixos de anticorpos IgG e de IgM anti- <i>B. pseudomallei</i> . A tira 9 representa um controle positivo para IgG e IgM anti- <i>B. pseudomallei</i>	73
Figura 21. Análise de amostras de soro de indivíduos residentes em Tejuçuoca com títulos elevados de anticorpos IgG e valores variáveis de IgM anti- <i>B. pseudomallei</i>	73
Figura 22. Detecção de subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 contra antígenos de <i>B. pseudomallei</i> obtidos por filtrado de cultura em indivíduos soropositivos por meio de <i>Immunoblotting</i>	74

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Resultado do Sistema de Identificação API20NE do estudo ambiental nos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, CE.....	59
Tabela 2 - Bactérias identificadas pelo Sistema de Identificação API20NE do estudo ambiental nos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, CE.....	60
Tabela 3 - Perfil de Identificação de <i>B. pseudomallei</i> pelo Sistema de Identificação API20NE do estudo ambiental nos municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, CE.....	60
Tabela 4 - Pesquisa de <i>B. pseudomallei</i> em solo dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, CE.....	62
Tabela 5 - Sítios de isolamento de <i>B. pseudomallei</i> no estudo ambiental realizado nos Municípios de Banabuiú e Tejuçuoca, CE.....	63
Tabela 6 - Profundidade de isolamento de <i>B. pseudomallei</i> no estudo ambiental realizado nos Municípios de Banabuiú e Tejuçuoca, CE.....	64
Tabela 7- Frequência de positividade para os anticorpos anti- <i>B.pseudomallei</i> e atividades de ocupação.....	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	Histórico.....	17
1.2	O Agente Etiológico.....	18
1.3	Aspectos Epidemiológicos	18
1.3.1	Epidemiologia Descritiva da Melioidose	18
1.3.2	Distribuição da Melioidose no Mundo.....	19
1.3.3	Melioidose na Austrália e Região do Pacífico	20
1.3.4	Melioidose na Ásia.....	21
1.3.5	Melioidose na Europa, África e Oriente Médio	24
1.3.6	Melioidose nas Américas	24
1.3.7	Melioidose no Brasil e no Estado do Ceará	26
1.4	Fatores de Risco para Aquisição da Doença	27
1.5	Transmissão da melioidose	28
1.6	Período de Incubação da Doença	28
1.7	Manifestações Clínicas em Humanos.....	29
1.8	Diagnóstico	30
1.9	Tratamento	32
1.10	Prognóstico.....	33
1.11	Prevenção e Controle	34
1.12	Pergunta de Partida.....	37
1.13	Hipótese.....	37
2	OBJETIVOS DO ESTUDO	38
2.1	Objetivo geral.....	38
2.2	Objetivos específicos.....	38
3	MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1	Estudo Ambiental.....	40
3.1.1	Caracterização Geográfica dos Locais de Estudo	40

3.1.2	Descrição do Estudo.....	42
3.1.3	Delimitação da Amostra do Solo.....	42
3.1.4	Tipo de Coleta e Transporte de Amostras do Solo.....	46
3.1.5	Processamento Primário das Amostras do Solo	47
3.1.6	Estocagem de Amostras Suspeitas	47
3.1.7	Identificação Microbiológica e Bioquímica das Amostras	48
3.1.8	Estocagem de Amostras de <i>B. pseudomallei</i>	50
3.1.9	Dados Meteorológicos e Componentes Ambientais.....	50
3.2	Estudo sorológico.....	51
3.2.1	Produção do Antígeno.....	51
3.2.2	Delimitação do Melhor Produto.....	52
3.2.3	Padronização do Ensaio Imunoenzimático.....	53
3.2.4	Local do Inquérito Soroepidemiológico.....	53
3.2.5	Operacionalização do Estudo de Campo.....	53
3.2.6	Delimitação da População.....	54
3.2.7	Realização do Inquérito Soroepidemiológico	55
3.2.8	Caracterização do Antígeno	55
3.2.9	Análise Estatística	56
4	RESULTADOS.....	57
4.1	Estudo Laboratorial.....	57
4.1.1	Isolamento de Cepas Suspeitas de <i>B. pseudomallei</i>	57
4.1.2	Identificação de <i>B. pseudomallei</i> pelo Sistema de Identificação API20NE.....	59
4.2	Estudo ambiental.....	62
4.3	Dados meteorológicos e componentes ambientais.....	66
4.4	Inquérito Soroepidemiológico.....	67
4.4.1	Padronização do Teste Sorológico	67
4.4.2	População do Estudo	67
4.4.3	Títulos de Anticorpos anti <i>B. pseudomallei</i>	67
4.4.4	Caracterização do Antígeno	72

4.4.5	Reconhecimento Antigênico de Filtrado de Cultura de <i>B. pseudomallei</i>	72
5	DISCUSSÃO.....	75
5.1	Parte 1 - Estudo Ambiental	75
5.2	Parte 2 - Inquérito Soroepidemiológico	83
6	CONCLUSÕES.....	95
6.1	Recomendações.....	96
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICES.....	115
	ANEXOS.....	135

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2005, a revista *Nature* publicou um artigo cujo título foi “Medicina tropical: Melioidose? Nunca ouvi falar nisso...” (ALDHOUS, 2005). Entre nós tal exclamação é bastante comum, pois a melioidose é uma doença emergente no Brasil, pouco conhecida. Os primeiros casos em humanos foram diagnosticados no Estado do Ceará no ano de 2003 (ROLIM *et al.*, 2005).

A melioidose é uma doença bacteriana causada pelo bacilo Gram-negativo *Burkholderia pseudomallei*. O microorganismo é encontrado no ambiente, em solo e água de áreas tropicais, particularmente no sudeste da Ásia e norte da Austrália (CHENG; CURRIE, 2005). A bactéria é classificada como pertencente ao grupo B pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) e considerada agente potencial de bioterrorismo (ROTZ *et al.*, 2002). Aldhous (2005) acentua que em virtude da atual preocupação com o bioterrorismo é que uma doença assassina que pode matar dentro de 48 horas e foi ignorada por décadas, somente agora é levada a sério. Ainda segundo esse autor, em algumas partes da Ásia, onde a *B. pseudomallei* é endêmica, “essa assassina em série comete muitos crimes sem nem mesmo ser identificada como suspeita”. Tal ocorre porque a doença é considerada “mimetizadora” por poder simular muitas outras infecções (POE *et al.*, 1971).

A melioidose é havida como doença enigmática, mesmo em regiões conhecidamente endêmicas. De forma intrigante, a *B. pseudomallei* apresenta capacidade de se adaptar e sobreviver em ambientes como solo, água destilada e no corpo humano (STONE, 2007). Essa plasticidade genética da bactéria permitindo adaptações a diferentes ambientes e causando infecção multifacetada em humanos (STEPHENSON, 2004) torna a melioidose uma doença muito peculiar.

Do ponto de vista de saúde pública, a melioidose apresenta impacto importante. A doença é considerada o “inimigo público número um no Nordeste da Tailândia”, quando em único hospital há cerca de 200 admissões ao ano e até 50% dos pacientes internados morrem (ALDHOUS, 2005). Como a *B. pseudomallei* apresenta resistência aos antibióticos comumente utilizados em infecções comunitárias (INGLIS; ROLIM; RODRIGUES, 2006), seu tratamento exige antimicrobianos de custo elevado, o que onera os sistemas de saúde, particularmente em áreas endêmicas menos desenvolvidas.

No Estado do Ceará, os casos clínicos registrados apresentaram-se com as formas graves da doença e a letalidade foi elevada. Sete casos foram documentados até o momento e somente uma pessoa sobreviveu. A enfermidade foi considerada como potencial problema de

saúde pública para o Estado do Ceará e os profissionais e serviços de saúde em todos os níveis de complexidade devem estar preparados (ROLIM, 2004). Por esse motivo, seu conhecimento é fundamental, sendo necessário o desenvolvimento de pesquisa sobre essa doença, que é a finalidade do presente estudo.

1.1 Histórico

B. pseudomallei foi descrita pela primeira vez em Rangum, Myanmar (antiga Birmânia), no ano de 1911. Em interessante relato, o patologista britânico Alfred Whitmore e seu assistente, C.S. Khishnaswami, descreveram a identificação de um novo bacilo semelhante ao bacilo do mormo, conhecido na época como *Bacillus mallei* e que causava doença em animais. Durante necropsia de indigentes usuários de drogas, observaram que o bacilo presente era móvel, o que o diferenciava do bacilo imóvel do mormo. Esse fato permitiu a identificação de um novo microorganismo ao qual chamaram de *Bacillus pseudomallei* (WHITMORE, 1913).

No ano de 1932, na Malásia, foi escrita a primeira monografia sobre a doença por Stanton e Fletcher. Eles documentaram casos em humanos e animais suficientes para produzir o manuscrito sobre a enfermidade e a denominaram de melioidose que deriva dos termos gregos *melis* (“doença de asno”) e *eido* (“semelhante” ao mormo) (STANTON; FLETCHER, 1932).

A *B. pseudomallei* tornou-se conhecida nas Américas, quando soldados dos Estados Unidos apresentavam a doença após retornarem da guerra do Vietnã. Em muitas ocasiões a enfermidade se manifestava muitos anos após a exposição, o que a levou a ser conhecida como Doença Bomba-Relógio (BRUNDAGE; THUSS; WALDEN, 1968; HOWE; SAMPATH, 1971; SANFORD, 1977).

Previamente a bactéria teve vários nomes: *Bacilo pseudomallei*; *Bacilo de whitmorii* (ou *Bacilo de Whitmore*); *Malleomyces pseudomallei* e *Pseudomonas pseudomallei*. Este último permaneceu da metade final do século XX até o ano de 1992, quando a bactéria foi reclassificada, junto com outras espécies, no novo gênero *Burkholderia*, em homenagem ao microbiologista britânico Walter Burkholder, quem primeiro descreveu a *Burkholderia cepacea* (YABUUCHI *et al.*, 1992; CURRIE, 2003).

1.2 O Agente Etiológico

A *B. pseudomallei* pertence à família *Pseudomonadaceae* e ao grupo II de RNA do gênero *Burkholderia* (YABUUCHI *et al.*, 1992). Tradicionalmente, muitas espécies de *Burkholderia* são associadas a plantas ou estão presentes em solo e raramente causam doença em humanos. Três espécies do gênero conhecidamente causam doença em humanos: *Burkholderia cepacea*, *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei* (INGLIS; MEE, CHANG, 2001; COENYE; VANDAMME, 2003). A *B. pseudomallei* é estreitamente relacionada a outros patógenos do mesmo gênero, como a *Burkholderia mallei* e *Burkholderia thailandensis*. Essa última espécie tem a capacidade de assimilar L-arabinose e apresenta baixa virulência. O gênero *Burkholderia* possui cerca de 30 espécies e cada vez mais, novas bactérias ambientais estão sendo descobertas e são a ele acrescentadas (CURRIE, 2003).

A *B. pseudomallei* é um bacilo Gram-negativo não-fermentador de glicose, móvel, aeróbico, não formador de esporos e que mede 5µm de comprimento e 0,5 a 1,0 µm de largura. A bactéria é um dos mais metabolicamente versáteis membros do gênero *Burkholderia*, pois utiliza diversos componentes orgânicos como fontes de carbono e energia para seu crescimento (ELLIS; TITBALL, 1999). O armazenamento de carbono é atingido sob condições de excesso de substrato pela formação de inclusões citoplasmáticas compostas de polihidroxibutirato, que confere a aparência da forma bipolar, conhecida como alfinete de fralda, à bacterioscopia (INGLIS; MEE, CHANG, 2001). A *B. pseudomallei* apresenta crescimento em meios de cultura convencionais e pode produzir colônias dentro de 24 horas (média 48-72 horas) a uma temperatura de 37°C. As colônias caracteristicamente adquirem aparência rugosa em meios sólidos com o passar dos dias. Algumas cepas podem ser mucóides (PITT, 1995; HOWARD; INGLIS, 2003). Provas bioquímicas incluem reação oxidase positivo, nitrito positivo, arginina desidrolase positiva, OF glicose e lactose positiva, gelatina positiva e lisina descarboxilase negativa (RAO; DHAWAN; SHIVANANDA, 2002).

Recentemente seqüenciado no Wellcome Trust Sanger Centre, o genoma da *B. pseudomallei* é relativamente grande e compreende dois cromossomas (4.07 Mb e 3.17 Mb) com conteúdo de G +C de 68% (HOLDEN; TITBALL; PEACOCK, 2004).

1.3 Aspectos Epidemiológicos

1.3.1 Epidemiologia Descritiva da Melioidose

A *B. pseudomallei* é um habitante natural do solo e água em regiões tropicais e subtropicais e foi reconhecido ambientalmente, pela primeira vez, em Hanói e Saigon

(VAUCEL, 1937; CHAMBON, 1955). Em regiões endêmicas do sudeste da Ásia foi recuperada em áreas de campos de arroz (STRAUSS *et al.*, 1969a; GALIMAND; DODIN, 1982, SUPUTTAMONGKOL *et al.*, 1994; WUTHIEKANUN *et al.*, 1995). As pessoas e os animais contraem a infecção por exposição à bactéria presente em solo e superfície da água de locais endêmicos (DANCE, 2000a).

A melioidose é descrita em vários animais: ovelhas, cabras, bovinos, porcos, cavalos, cães, gatos, golfinhos, macacos, pássaros, camelos, búfalos, cangurus, coalas (SPRAGUE; NEUBAUER, 2004). Os animais domésticos, cães e gatos, parecem ser mais resistentes à infecção pela bactéria (CHOY *et al.*, 2000).

Os casos em animais já foram relatados na Austrália, Tailândia, Cingapura, China, Índia subcontinental, Taiwan, França, Irã, Arábia Saudita, Emirados Árabes, Chad e África do Sul (SPRAGUE; NEUBAUER, 2004). O transporte de animais pode representar risco de transmissão para áreas não endêmicas, principalmente a apresentação clínica da doença variável em diferentes animais, que dificulta o diagnóstico (SPRAGUE; NEUBAUER, 2004). Alguns surtos foram bem documentados em animais importados. Na França, um acontecimento peculiar ilustrou bem esse risco potencial a disseminação. Em 1975, um panda doado por Mao-Tse-Tung ao Presidente francês Pompidou foi o caso-índice para a epidemia em animais, que acometeu vários zoológicos franceses com mortes de animais (MOLLARET, 1998). Dance (1992) relatou outro surto na Inglaterra, em primatas importados das Filipinas e da Indonésia.

A melioidose apresenta importantes aspectos ambientais. Diversos fatores climáticos como temperatura, chuvas, luz solar e composição física, biológica e química do solo influenciam a distribuição, proliferação e sobrevivência da *B. pseudomallei*, embora o conhecimento nessa área seja restrito (TONG *et al.*, 1996; INGLIS; MEE, CHANG, 2001, DANCE, 2000a). A bactéria é capaz de sobreviver de forma viável na ausência de nutrientes e persistir em água destilada por muitos anos (WUTHIEKANUN; SMITH; DANCE, 1995). A relação da doença com chuvas é bem evidenciada. Na Tailândia e na Austrália, a melioidose ocorre no período chuvoso em 75% e 85% dos casos (CURRIE; JACUPS, 2003).

1.3.2 Distribuição da Melioidose no Mundo

A melioidose é uma doença que ocorre predominantemente em regiões tropicais do globo (DANCE, 1991). Howe (1971) primeiramente relatou sua ocorrência a 20° N e 20° S da linha do equador, embora esse limite já tenha sido ultrapassado (COTTEW, 1950;

KETTERER; DONALD; ROGERS, 1975). Todos os continentes já registraram casos ou a presença da *B. pseudomallei* no ambiente, como ilustra a figura 1. A Tailândia e o norte da Austrália são áreas consideradas endêmicas (CHENG; CURRIE, 2005). Dance (1991, 2000b) realizou duas grandes revisões sobre a distribuição da melioidose. A primeira no ano de 1990, cujo título foi “melioidose: a ponta do iceberg”, já chamava a atenção para o desconhecimento da real distribuição em todo o mundo. Dez anos depois, outra extensa revisão reafirmou a moléstia como um problema de saúde pública emergente em todo o mundo. O autor já alertava para o fato de que nos últimos anos, a melioidose vinha sendo reconhecida em países do sudeste da Ásia não considerados endêmicos e em novas áreas como ilhas do Pacífico e América do Sul.

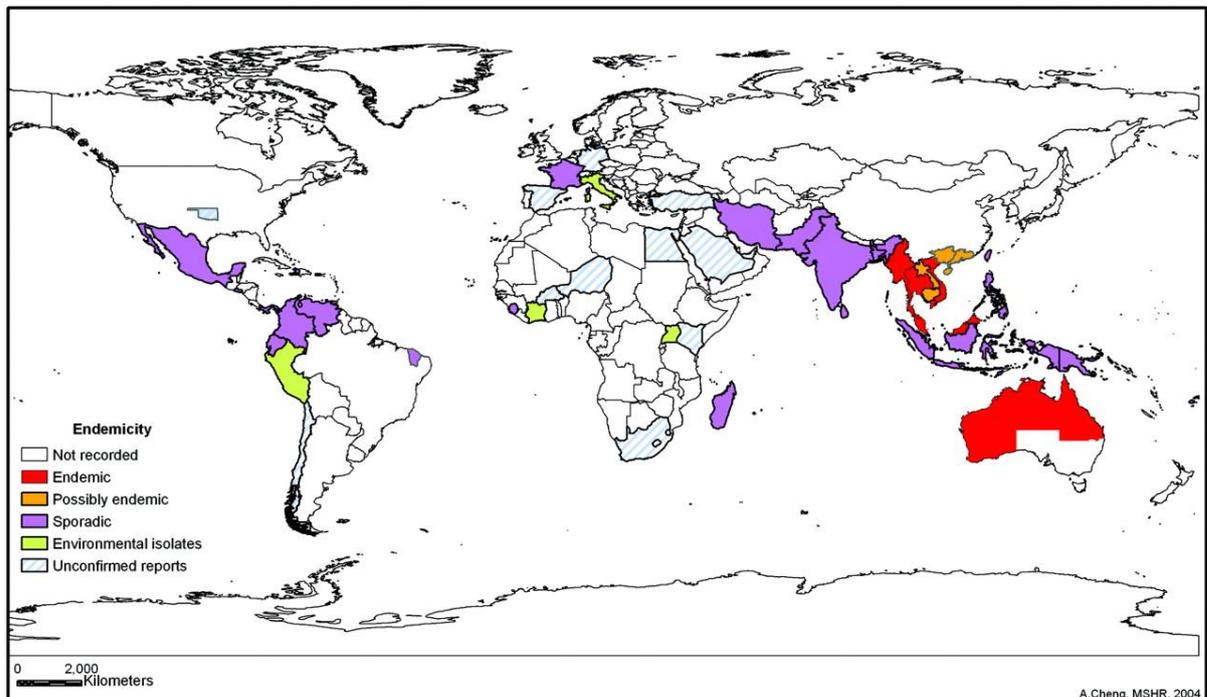


Figura 1. Distribuição da melioidose no mundo. Fonte: Cheng, 2005.

1.3.3 Melioidose na Austrália e Região do Pacífico

A melioidose foi primeiramente reconhecida em ovelhas na Austrália no ano de 1949, em Winton, região norte de Queensland (COTTEW, 1950). No ano seguinte, foi descrito o primeiro caso humano em Townsville (RIMINGTON, 1962). O primeiro caso no território norte do País ocorreu em 1960, embora seja essa a região que apresenta a maior incidência da doença. Na região do Top End, nesse mesmo território norte, a taxa de

incidência anual foi de 16,5 por 100.000 habitantes entre o período de 1989 a 1999 (CURRIE *et al.*, 2000) mas apresentou pico de 41,5 por 100.000 habitantes em 1998, relacionado a eventos climáticos (CURRIE *et al.*, 2004). Além das regiões do território norte, Top End e Darwin, outros locais do País onde a doença ocorre são a região norte do Estado de Queensland, principalmente Torres Strait e Townsville, e a região de Kimberley, localizada na região norte do Estado do Oeste da Austrália (CURRIE, 2003). Na região de Torres Strait, a taxa foi de 40 casos por 100.000 habitantes no período entre 2000 a 2002 (FAA; HOLT, 2002). Já na região do oeste da Austrália, casos esporádicos são descritos, principalmente na região de Kimberley, sendo o primeiro surto no oeste da Austrália nessa região descrito somente em 1997 (INGLIS *et al.*, 1998). O País, por apresentar dimensão continental, exhibe casos provenientes de áreas remotas transferidos para hospitais de referência em Darwin, território norte; Kimberley, região oeste e Torres Strait, região norte de Queensland (CHENG; CURRIE, 2005).

Embora a área considerada endêmica se encontre na área restrita de latitude a 20°N e 20°S (HOWE; SAMPATH, 1971), alguns surtos ultrapassam esse limite, como o primeiro caso em Winton (22°S) (RIMINGTON, 1962) e um surto em suínos na região do rio Burnett (25,5°S), por contaminação de suprimento de água (KETTERER; DONALD; ROGERS, 1975). Outros casos autóctones ocorreram além desse limite de latitude: região sudoeste do Oeste da Austrália, vale do rio Brisbane, em Queensland (27°S) Alice Springs e Mackay (CHENG; CURRIE, 2005).

Ilhas do Pacífico

Outros países do Pacífico, onde casos esporádicos de melioidose foram relatados, foram Nova Zelândia (CASTLE; WONG; HOLLAND, 1999), Guam (DANCE, 1991), Fiji (DANCE, 2000b), a região de Port Moresby, na Papua Nova Guiné (CURRIE, 1993, 2000a), Mauritius (ISSACK; BUNDHUN; GOKHOOL, 2005), Timor Leste (ARMSTRONG *et al.*, 2005) e Nova Celedonia (LE HELLO *et al.*, 2005).

1.3.4 Melioidose na Ásia

Tailândia

A Tailândia é o país que apresenta o maior número de casos de melioidose no mundo, tendo sido relatado o primeiro caso no País no ano de 1955 (LEELARASAMME, 2000). Numa revisão no sudeste da Ásia, Leelarasamme (2000) relatou estimativa de cerca de

2000 a 3000 casos da doença por ano numa população de 60.000.000 habitantes. A taxa de incidência é 4,4 casos por 100.000 habitantes (SUPUTTAMONGKOL, 1994). Os estudos sorológicos também mostraram elevadas taxas de soroprevalência na população, com 80% das crianças apresentando sorologia positiva após quatro anos de idade (KANAPHUN *et al.*, 1993). Na região de Ubon Ratchathani, nordeste da Tailândia, a melioidose é a principal causa de pneumonia comunitária e septicemia (CHAOWAGUL *et al.*, 1989). A *B. pseudomallei* foi isolada de solo e água em várias partes do País, no entanto observou-se que não havia distribuição da bactéria uniformemente em suas regiões (LEELARASAMME, 2000). Outra cepa isolada na Tailândia é a *Burkholderia thailandensis*, considerada de menor virulência e possivelmente relacionada com a diferença na distribuição da doença no País (TRAKULSOMBOON *et al.*, 1999). A região nordeste da Tailândia apresenta maior incidência de melioidose. Além de Ubon Ratchathani, outros centros da região nordeste da Tailândia relataram casos da moléstia como Khon Kaen, Nakhon Ratchasima, Buri Bam e Udon Thani (LEELARASAMEE *et al.*, 1997).

Malásia

Os primeiros casos de melioidose animal na Malásia foram observados no ano de 1913 por Stanton e Fletcher (1932). Strauss (1969a,1969b) realizou importantes estudos por meio da pesquisa de *B. pseudomallei* em solo e água e de anticorpos contra a bactéria na população. O inquérito sorológico realizado no País, no período de 1964 a 1966, evidenciou 7,3 % de soropositividade na população estudada (STRAUSS *et al.*, 1969a, 1969b). Puthucheary (1992), durante o período de 1976 a 1991, revisou 85 casos de melioidose em centro de referência em Kuala Lumpur, com 50 desses casos secundários à sepse. Recentemente, outros 83 casos foram revisados em hospital universitário entre 1995 e 2005 (RAJA, 2008).

Cingapura

A melioidose foi relatada pela primeira vez em Cingapura em 1920, mas a doença não foi reconhecida como problema de saúde pública importante até 1989, quando três tiveram sepse fatal, levando a ser de notificação obrigatória (HENG *et al.*, 1998). Entre 1987 e 1994, 23 casos foram relatados em militares do País (LIM *et al.*, 1997). Heng (1998) relatou que, durante o período de 1989 a 1996, houve documentação de 372 casos, com 147

óbitos e incidência média anual de 1,7 casos por 100.000 habitantes (HENG *et al.*, 1998). Desde o ano de 1998, quando 104 casos foram relatados, os números notificados são elevados. Na primeira metade do ano de 2004, 57 casos foram relatados com letalidade incomum de 40%, provavelmente relacionada a chuvas anormais intensas e enchentes (CHENG; CURRIE, 2005).

Vietnã

O primeiro caso de melioidose no sul do Vietnã foi relatado em 1925 (DANCE, 1991). A primeira descrição da *B. pseudomallei* em solo e água foi realizada por Vaucel, em Hanói (VAUCEL, 1937), e por Chambon, em Saigon (CHAMBON, 1955). Em 1973, 343 casos de melioidose foram descritos em tropas estadunidenses que tiveram exposição ambiental no Vietnã (SANFORD, 1985).

Taiwan

Em Taiwan, o primeiro caso ocorreu em 1985, quando foi diagnosticado um caso de pneumonia em adulto sadio após afogamento nas Filipinas (LEE *et al.*, 1985). Posteriormente, 17 casos foram descritos no período de 1982 e 2000 (HSUEH *et al.*, 2001). A partir do ano 2000, a doença passou a ser de notificação obrigatória em Taiwan. Um surto com diagnóstico de 40 casos ocorreu em 2005, após chuvas e ventos intensos (SHIH *et al.*, 2008).

Outras partes da Ásia

O Laos, embora seja adjacente à Tailândia, jamais havia diagnosticado caso de melioidose até 1999, quando sete eventos foram descritos. Posteriormente, a *B. pseudomallei* também foi isolada em solo em 1998 e dois casos foram relatados em Vientiane em 2001 (PHETSOUVANH *et al.*, 2001; WUTHIEKANUN *et al.*, 2005).

Na China continental, a *B. pseudomallei* foi isolada em 4,2% de amostras de solo e água em Hainan Island e províncias costeiras do norte, além de casos em humanos e soroprevalência de 34 % em agricultores da região (CHENG; CURRIE, 2005). Em Hong Kong, um surto foi descrito em animais marinhos de um parque oceânico (HICKS *et al.*, 2000), além de pequeno número de casos em humanos (DANCE, 2000b; CHENG; CURRIE, 2005).

Na Índia, alguns casos clínicos de melioidose foram relatados em humanos (DANCE, 2000b), além de inquérito sorológico numa área de cultivo de arroz próximo a Vellore, que mostrou taxa de 7% (KANG *et al.*, 1996).

Outros locais da Ásia, onde houve relato de casos esporádicos, foram: casos diagnosticados na Inglaterra com origem em Bangladesh e Paquistão (DANCE, 1999); Indonésia e Filipinas (DANCE, 1991;); Sri Lanka (VAN PEENEN *et al.*, 1976); Nepal (NABIN *et. al.*, 2005); Coréia (LEE *et. al.*, 2005) e Camboja (WUTHIEKANUN *et al.*, 2008).

1.3.5 Melioidose na Europa, África e Oriente Médio

Na Europa, os casos de melioidose descritos foram relacionados a viagens para outros países da Ásia, Oceania ou América do Sul. Na Finlândia, há relato de caso provavelmente adquirido na Tailândia (CARLSON; SEPPNEN, 2000). Após a tsunami em 2004, foi documentado caso na Suíça em turista que havia viajado para a Tailândia (SVENSSON *et al.*, 2006). Na Bélgica, há relato de casos adquiridos no Sri Lanka e em Bangladesh (EZZEDINE *et al.*, 2007; PEETERMANS *et al.*, 1999). Há ocorrências relatadas em humanos na Alemanha e em animais na Espanha, que não foram confirmados (DANCE, 1991). Há ainda relato de isolamento ambiental de *B. pseudomallei* na Itália (CHENG; CURRIE, 2005).

No Continente Africano, há relatos esporádicos de melioidose humana em Serra Leoa, Gâmbia e Kênia, e em animais em Madagascar, Nigéria, Chade e Burkina Faso. O encontro de *B. pseudomallei* foi ainda relatado no solo da Costa do Marfim e Ilhas Reunião (FOURNIER, 1965; GALIMAND; DODIN, 1982; DANCE, 1991; DANCE, 2000b). Casos esporádicos também foram relatados no Oriente Médio. No Irã, foram relatados casos em humanos e animais. Há ainda eventos não confirmados em animais no Egito e nos Emirados Árabes, e, casos humanos na Turquia e Arábia Saudita (DANCE, 1991; DANCE, 2000b).

1.3.6 Melioidose nas Américas

Na América do Norte, os casos de melioidose geralmente são relacionados a viagens de pessoas que visitam áreas endêmicas a lazer, trabalho ou atividade militar. A maioria dos casos de melioidose dos Estados Unidos (EUA) é relatada em veteranos da guerra ou em turistas. (INGLIS; ROLIM; SOUSA, 2006; CDC, 2006). A enfermidade foi

documentada em soldados ianques após retornarem do Vietnã (SANFORD, 1977; MACKOWIAK; SMITH, 1978). Há relato de intervalo para o início da doença aguda tão longo quanto 29 anos (CHODIMELLA *et al.*, 1997). Outro longo intervalo de 62 anos foi relatado em veterano da Guerra do Pacífico que teve exposição entre 1941 a 1945 (NGUAY; LEMESHEV, Y; SADKOWSKI, 2005). Outros eventos suspeitos autóctones também já foram noticiados nos EUA, mas ainda não confirmados (INGLIS; ROLIM; RODRIGUES, 2006). O primeiro caso relatado nos EUA foi em 1945 (MACDOWELL; VARNEY, 1947), mas a infecção provavelmente ocorreu no Canal do Panamá (BIEGELEISEN; MOSQUERA; CHERRY, 1964). Outros três casos controversos foram narrados (BEAMER *et al.*, 1948, 1954; GARRI *et al.*, 1951), porém não confirmados e permanecem controversos (BIEGELEISEN; MOSQUERA; CHERRY, 1964; DANCE, 1991; DORMAN *et al.*, 1998). Em 1960, artrite séptica por *B. pseudomallei* foi diagnosticada nos Estados Unidos (EUA) (JOY; SCALETTAR, R; SODEE, 1960), mas a provável aquisição ocorreu no Panamá (DORMAN *et al.*, 1998). Um caso de melioidose diagnosticado também nos EUA ocorreu em Oklahoma (MCCORMICK *et al.*, 1977), mas investigação posterior levou a resultados controversos (YABUUCHI *et al.*, 1992; GODOY *et al.*, 2003). Acredita-se que uma ocorrência de infecção facial grave após acidente de veículo pode ter sido contraída nos EUA (NUSSBAUM; HULL; CARTER, 1980). Ainda na América do Norte, há relato de um caso de melioidose cuja infecção ocorreu possivelmente no México (BARNES *et al.*, 1986).

Na América Central, foi documentado surto animal em Aruba (SUTMOLLER; KRANEVELD; VAN DER SCHAAF, 1957). Além dos casos já citados de provável aquisição no Panamá, esporadicamente, a doença já foi relatada em humanos nos seguintes países: Porto Rico (CHRISTENSON-BRAVO *et al.*, 1986, 2003; DORMAN *et al.*, 1998); Martinica (OLIVE *et al.*, 1995); Guadalupe (PEREZ *et al.*, 1997); El Salvador (DANCE, 1991); Costa Rica (JULIO; VILLAREAL 2000) e Honduras (DANCE, 2004). Há ainda relato de isolamento de *B. pseudomallei* em solo no Haiti (GALIMAND; DODIN, 1982).

Na América do Sul, o primeiro acontecimento bem documentado ocorreu no Equador (BIEGELEISEN; MOSQUERA; CHERRY, 1964) No Chile, houve relato de isolamento de *B. pseudomallei*, embora tenha sido contestado em razão de sensibilidade antimicrobiana com padrão atípico (DANCE, 1991). Em 1977, pesquisadores franceses isolaram a *B. pseudomallei* no solo do Peru e do Brasil (GALIMAND; DODIN, 1982). Em 2003, melioidose humana no Brasil foi documentada (ROLIM *et al.*, 2005). A Colômbia e a Venezuela também já descreveram a doença (MAGALHÃES *et al.*, 2003; REDONDO *et al.*, 2004; DANCE, 2004; CHENG; CURRIE, 2005).

1.3.7 Melioidose no Brasil e no Estado do Ceará

No Brasil, a melioidose é uma doença emergente, pois somente em 2003 foi diagnosticada em humanos (ROLIM *et al.*, 2005). Anteriormente, no Brasil, alguns estudos ambientais já tinham sido realizados para investigação da *B. pseudomallei* em solo e água. O primeiro ocorreu em 455 amostras de água de arrozais das regiões de Pindamonhangaba e Campinas, em São Paulo, mas os autores não detectaram a presença da *B. pseudomallei* (PESTANA DE CASTRO *et al.*, 1973). No ano de 1977, pesquisadores franceses relataram o isolamento da bactéria em solo do Peru e em duas cidades da Bahia, São Félix e Santo Antonio (GALIMAND; DODIN, 1982). No ano de 1991, há relato de isolamento de *B. pseudomallei* em ambiente de unidade de terapia intensiva em Belo Horizonte (SILVA *et al.*, 1991).

As primeiras ocorrências confirmadas da doença foram no Estado do Ceará, em março de 2003, no Município de Tejuçuoca, quando um surto ocorreu com quatro crianças irmãs. Esse surto apresentou alta letalidade e três crianças faleceram em consequência de sepse e pneumonia grave num intervalo de apenas sete dias. A investigação epidemiológica identificou o fato de que a provável infecção ocorreu por exposição à água durante banho numa barragem (ROLIM *et al.*, 2005).

No ano de 2004, foi evidenciada outra ocorrência com evolução para óbito no Município de Banabuiú. Uma mulher de 39 anos apresentou evolução para pneumonia e sepse secundários a abscesso vulvar extenso. Posteriormente, um estudo soropidemiológico preliminar em Tejuçuoca e Banabuiú mostrou que pessoas tiveram exposição a *B. pseudomallei* sem infecção sintomática. Houve ainda isolamento ambiental da bactéria em água e solo no Município de Banabuiú (ROLIM *et al.*, 2005).

Em outubro de 2005, foi relatado óbito por melioidose em turista holandês cuja infecção provavelmente ocorreu no Estado do Ceará, em julho de 2003 (AARDEMA *et al.*, 2005). Nesse mesmo ano, no município de Aracoiaba, um homem de 30 anos apresentou quadro de pneumonia aspirativa e sepse após infecção em águas do rio Aracoiaba, conseqüente a um acidente automobilístico. A evolução para óbito ocorreu nove dias após a exposição (INGLIS; ROLIM; RODRIGUES, 2006).

No ano de 2008, a doença foi diagnosticada em um adolescente de 17 anos que apresentou quadro de pneumonia grave e sepse com evolução rápida para óbito após 8 dias do início dos sintomas. O jovem tinha feito viagem durante feriado prolongado tendo exposição em solo e água durante visitas a quatro municípios da Serra de Ibiapaba: Ubajara, Ipu,

Guaraciaba do Norte e Carnaubal. Os locais prováveis de infecção identificados foram a Cachoeira do Boi Morto, em Ubajara, e a Bica do Ipu, conhecidos espaços turísticos da região (Dados ainda não publicados).

Em dezembro foi confirmado outro caso de melioidose no Estado do Ceará. Um homem de 69 anos teve diagnóstico de aneurisma de aorta abdominal e sepse por *B. pseudomallei*. O paciente era agricultor e residia no Município de Granja na região norte do Estado do Ceará (Dados ainda não publicados).

Além desses registros de melioidose no Estado do Ceará, outro caso foi descrito recentemente no Brasil. A *B. pseudomallei* foi isolada em hemocultura de uma adolescente com fibrose cística, no Estado do Rio Grande do Sul. A paciente nunca viajou para outros países e reside no Estado do Mato Grosso do Sul (BARTH *et al.*, 2007).

1.4 Fatores de Risco para Aquisição da Doença

Estudos controlados na Austrália e Tailândia evidenciaram vários fatores de risco para o desenvolvimento de melioidose. Pacientes com diabetes apresentam elevada incidência de melioidose. Foi observado o fato de que até 60% dos pacientes com melioidose tinham Diabetes *mellitus* do tipo 2, previamente diagnosticado (CURRIE *et al.*, 2000b; SUPUTTAMANGKOL *et al.*, 1999). Estudo tailandês evidenciou os seguintes fatores de risco: Diabetes *mellitus*, doença renal crônica (definida como insuficiência renal ou litíase), talassemia e exposição ocupacional a solo e água (SUPUTTAMANGKOL *et al.*, 1999).

Além do diabetes e doença renal crônica, outro estudo australiano identificou os seguintes fatores de risco: sexo masculino, idade igual ou superior a 45 anos, australianos aborígenes, doença pulmonar crônica, uso excessivo de álcool (CURRIE *et al.*, 2004). Outros possíveis fatores de risco baseados em série ou relato de casos foram: uso de “kava”, uma planta comumente consumida em bebidas por aborígenes na Austrália, esplenectomia (frequentemente relatada na talassemia), anemia aplástica, neutropenia febril, doença granulomatosa crônica, infecção por micobactéria, febre hemorrágica do dengue, neutropenia, transplante renal, lúpus eritematoso sistêmico, uso de corticosteróides, deficiência de glicose-6-fosfatodesidrogenase (G6PD), hemosiderose, fibrose cística e porfiria cutânea tardia (CHENG; CURRIE, 2005). Embora a imunidade celular tenha sido implicada na patogênese da doença, a infecção por HIV não parece ser fator de risco para melioidose (CHENG; CURRIE, 2005).

1.5 Transmissão da melioidose

A melioidose apresenta os seguintes mecanismos de transmissão: inalação, inoculação, e possivelmente ingestão (CURRIE *et al.*, 2000b;). A transmissão da infecção, provavelmente ocorre principalmente por inalação de partículas ou inoculação em pele. Embora a transmissão por inoculação seja considerada freqüente, apenas em 6 a 25% dos casos foi identificado incidente de exposição específico (DANCE, 2005). A transmissão por inalação de partículas de aerossóis é postulada principalmente quando a infecção em geral é adquirida durante período de fortes chuvas (CURRIE; JACUPS, 2003). Esta foi a possível forma de infecção em tripulações de helicópteros, durante a guerra do Vietnã, expostas a aerossóis gerados pela movimentação das hélices (HOWE; SAMPATH, 1971). Outras formas já relatadas foram a transmissão por aspiração ocorrida após afogamentos (LEE *et al.*, 1995) e a provável transmissão por ingestão relacionada a dois surtos em suprimentos de água potável contaminados (INGLIS *et al.*, 2000; CURRIE *et al.*, 2001).

Algumas formas incomuns também descritas foram: dois casos de transmissão ocupacional por acidente em laboratórios (GREEN TUFFNELL, 1968; SCHLECH *et al.*, 1981); infecção em neonatos adquirida por transmissão perinatal (LUMBIGANON *et al.*, 1988; HALDER *et al.*, 1998) um caso de transmissão vertical (ABBINK; ORENDI; BEAUFORT, 2001); dois casos por meio de leite materno, cujas mães tinham mastite (RALPH; MCBRIDE; CURRIE, 2004), um caso por via sexual transmitido por militar para sua esposa (MCCORMICK *et al.*, 1975); possível transmissão humana epizoonótica em três pessoas que trabalhavam com animais na Austrália (LOW *et al.*, 2000); um surto de transmissão nosocomial por intermédio de detergente contaminado em comunidade pequena e remota da Austrália (GAL *et al.*, 2004) e outra possível transmissão nosocomial em quatro animais por administração de solução injetável contaminada (LOW *et al.*, 2000).

1.6 Período de Incubação da Doença

O período de incubação é consideravelmente variável e é provável que dependa do tamanho e do sítio do inóculo, da virulência da cepa e estado imunológico do hospedeiro (CHENG; CURRIE, 2005). Estudo australiano mostrou que o período médio de incubação foi de 9 dias, variando de 1 a 21 dias (CURRIE *et al.*, 2000a). Quando ocorre após a episódios de afogamento, geralmente, manifestações de sepsse geralmente ocorrem em até 4 dias, embora seja possível suceder dentro de 24 horas (CURRIE, 2003), provavelmente relacionado a elevado inóculo (CHENG; CURRIE, 2005). A infecção, entretanto, pode permanecer latente

por muitos anos e as manifestações clínicas podem ocorrer muitos anos depois. O intervalo maior já registrado entre a exposição e o diagnóstico da doença foi 62 anos (NGUAY; LEMESHEV; SADKOWSKI, 2005).

1.7 Manifestações Clínicas em Humanos

A melioidose apresenta amplo espectro de apresentação clínica. A maioria das infecções é assintomática, embora melioidose possa ser fulminante, de evolução muito rápida e fatal, particularmente em pacientes imunocomprometidos (DANCE, 2005). A infecção assintomática foi bem evidenciada em estudo tailandês, ao mostrar que 80% das crianças após 4 anos de idade tinham anticorpos contra a *B. pseudomallei* (KANAPHUN *et al.*, 1993). Nenhuma classificação é completamente satisfatória. A infecção pode ser aguda ou crônica e localizada ou disseminada, mas uma forma da doença pode progredir para a outra, sendo freqüentemente difícil caracterizar pacientes individualmente em categorias (DANCE, 2005).

Uma forma desse amplo espectro da doença que pode ser classificada como subaguda é a infecção localizada e superficial de partes moles sem nenhuma outra doença associada (LEELARASAMEE; BOVORNKITTI, 1989). Qualquer órgão ou tecido pode ser afetado na melioidose e a presença de abscessos, além da pele e tecido subcutâneo, foi descrita em pulmão, linfonodos, fígado, baço, rim, cérebro, ossos e articulações, próstata, testículo (DANCE, 2005).

Diferenças importantes são observadas entre pacientes da Tailândia e da Austrália. Em crianças tailandesas, uma forma localizada observada é parotidite supurativa aguda, presente em um terço dos casos pediátricos e ausente da Austrália (SRIROMPOTONG; SAENG-SA-ARD, 2004). Já o acometimento neurológico e a infecção geniturinária apresentam elevada incidência na Austrália (WEBLING, 1980; HALDER *et al.*, 2000).

Na infecção aguda, a forma bem mais freqüente é a pneumonia e sepse. A pneumonia é a forma de manifestação mais comum da melioidose e envolve metade de todos os casos (CHENG; CURRIE, 2005). O acometimento pulmonar pode apresentar-se desde um quadro indiferenciado de pneumonia com febre alta, cefaléia, mialgia generalizada, dor torácica, associada ou não a tosse seca (SHORT, 2002), até pneumonia necrotizante fulminante e choque séptico (CHENG; CURRIE, 2005). Os pacientes com sepse apresentam-se agudamente doentes com febre alta, prostração e freqüentemente tosse seca inicial ou dor pleurítica. Podem existir também abscessos em órgãos abdominais. A radiografia de tórax comumente apresenta infiltrados nodulares difusos em ambos os pulmões, os quais coalescem

e cavitam rapidamente, consistindo na necrose caseosa e múltiplos abscessos metastáticos encontrados em necropsias. Alguns pacientes, contudo, têm predominantemente tosse com escarro produtivo, dispnéia e radiografia do tórax, mostrando consolidação discreta em um ou mais lobos pulmonares, embora progressiva. A presença de derrame pleural não é comum, embora efusão e empiema possam ocorrer, especialmente quando há comprometimento de lobos pulmonares inferiores (CURRIE, 2003).

Outra forma descrita é uma pneumonia de evolução crônica com febre, perda de peso e tosse produtiva, algumas vezes com presença de escarros hemoptóicos. A evolução costuma ser lentamente progressiva e a radiografia do tórax pode mostrar cavitações, simulando tuberculose pulmonar (CURRIE, 2003).

Os pacientes com sepse adquirida na comunidade geralmente apresentam história de febre alta e calafrios de poucos dias de duração. Confusão, estupor, icterícia e diarreia podem também ser fatores proeminentes. A evolução costuma rapidamente progredir com acidose metabólica e respiração de Kussmaul. Uma vez instalado choque séptico, a letalidade é bastante elevada e os pacientes evoluem para óbito dentro de 48 horas após a hospitalização (DANCE, 2005).

Outras formas mais raras de apresentação clínica de melioidose já foram descritas como endoftalmite, aneurisma micótico de aorta, acometimento em medula espinhal simulando abscesso epidural, acometimento musculoesquelético simulando amiotrofia diabética (BARTLEY *et al.*, 1999; LOW *et al.*, 2005; KOW *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2007). A doença também já foi descrita em pacientes com doenças como lúpus eritematoso sistêmico, poliarterite nodosa, doença granulomatosa crônica e fibrose cística (DORMAN *et al.*, 1997; CHOONHAKARN; JIRARATTANAPOCHAI, 1998; BADSHA *et al.*, 2001; HOLLAND *et al.*, 2002).

1.8 Diagnóstico

O diagnóstico de melioidose é essencialmente laboratorial pelo isolamento de *B. pseudomallei* em cultura de sangue, escarro, líquido ou qualquer outro material humano. espécime bacteriológico. A bactéria cresce facilmente em meios de cultura convencionais, sendo esses eficazes para estabelecer um diagnóstico bacteriológico. Existem, no entanto, meios seletivos desenvolvidos para facilitar o isolamento de *B. pseudomallei* mediante a inibição de crescimento de bactérias comensais, principalmente em sítios não estéreis (INGLIS; ROLIM; RODRIGUES, 2006). Estes meios usados são o ágar seletivo de Ashdown

(ASA) (ASHDOWN, 1979) ou o ágar seletivo BPSA (*Burkholderia pseudomallei* selective agar) (HOWARD; INGLIS, 2003). O ASA foi desenvolvido para uso clínico bacteriológico, mas pode inibir o crescimento de algumas cepas de *B. pseudomallei*, particularmente aquelas mais mucóides. O BPSA foi desenvolvido para melhorar a recuperação de cepas mucóides sem reduzir a recuperação do tipo clássico enrugado. Uma rotina de investigação laboratorial seqüenciada para encontrar *B. pseudomallei* foi sugerida por Inglis (2006). Esta compreende três etapas: um *screening* inicial por intermédio de testes facilmente realizáveis, métodos fenotípicos confirmatórios e finalmente métodos genotípicos definitivos.

Provas bioquímicas convencionais ou painéis de utilização de substratos também são utilizados para o diagnóstico (DANCE, 1989). Alguns *kits* disponíveis comercialmente são utilizados para identificação da *B. pseudomallei* como o sistema de testes bioquímicos manual API20NE, que demonstrou bom resultado (DANCE, 1989; LOWE; ENGLER; NORTON, 2002). Outros testes utilizados foram o API20E e os sistemas automatizados VITEK 1 E 2 (LOWE; ENGLER; NORTON, 2002).

A suspeita de infecção por *B. pseudomallei* pode ser feita diante da cultura de um bacilo Gram-negativo nos espécimes investigados com as seguintes características: teste de oxidase positivo, resistência à gentamicina e resistência à polimixina (colistina). Para o diagnóstico definitivo, deve ser evidenciado um ou mais dos seguintes achados: anticorpo aglutinante positivo para *B. pseudomallei*; PCR específico positivo para *B. pseudomallei* e seqüência de DNA 16s positivo para *B. pseudomallei* (INGLIS; ROLIM; RODRIGUES, 2006).

A evidência sorológica da infecção pode ser obtida pelo teste sorológico. Vários deles foram desenvolvidos para o diagnóstico de melioidose: hemaglutinação indireta (HIA), ELISA, imunofluorescência indireta (IFAT), aglutinação em látex baseado em anticorpos monoclonais e testes rápidos por imunocromatografia (ASHDOWN, 1987; YAP *et al.*, 1991; VADIVELU *et al.*, 1995; ANUNTAGOOL *et al.*, 2000; O'BRIEN *et al.*, 2004). Não há uma padronização internacional para esses testes (DANCE, 2005). Além disso, durante a fase de admissão de uma infecção aguda e grave, é pouco provável ocorrer soroconversão cedo o bastante para indicar tratamento de escolha. Como os resultados falso-negativos podem ocorrer, os testes sorológicos são mais utilizados como exame de suporte que uma evidência definitiva de melioidose (INGLIS; ROLIM; RODRIGUES, 2006). Embora os testes sorológicos tenham melhorado a sensibilidade e a especificidade em alguns centros, não resolveram completamente este problema (VADIVELU *et al.*, 1995). Além disso, em áreas endêmicas, a soroprevalência na população é elevada limitando o uso desses testes.

Atualmente os testes sorológicos são bastante utilizados como ferramenta epidemiológica em inquéritos sorológicos (CHENG; CURRIE, 2005). O teste mais utilizado tem sido a hemaglutinação indireta (HIA), que detecta anticorpo IgM, mas apresenta variação de títulos considerados positivos entre laboratórios em razão da sua limitada padronização (DANCE, 2005). Apesar de permanecer como o teste mais amplamente utilizado, o HIA apresenta sensibilidade e especificidade baixas (CHENG; CURRIE, 2005). Um estudo australiano encontrou inadequada utilidade do teste HIA (CHENG *et al.*, 2006). O ELISA é outro teste também utilizado. Além da facilidade de realização, tem a vantagem de detectar anticorpos IgM e IgG, além de ter sido mais sensível e específico em processo de doença ativa do que a HIA, sendo mais recomendado em investigação clínica (ASHDOWN *et al.*, 1989, SIRISINHA *et al.*, 2000). Vários testes sorológicos que utilizam antígenos purificados são desenvolvidos, mas nenhum foi submetido à análise multicêntrica em larga escala (DANCE, 2005). Pesquisas são necessárias para o desenvolvimento e melhora dos testes sorológicos, embora a utilidade para diagnóstico clínico deva permanecer baixa em áreas endêmicas (PEACOCK *et al.*, 2006).

1.9 Tratamento

Estudos evidenciaram que o uso de antimicrobiano precocemente reduz significativamente a mortalidade da melioidose. A ceftazidima foi o primeiro antibiótico que apresentou redução em 50% da mortalidade em infecções graves (WHITE; DANCE; CHAOWAGUL, 1989). O uso de carbapenem mostrou ser tão eficaz quanto a ceftazidima (SIMPSON *et al.*, 1999; CHENG *et al.*, 2004), no entanto, um estudo mostrou que deve ser utilizado preferencialmente por apresentar melhor concentração inibitória mínima (MIC) para inibir a *B. pseudomallei* (INGLIS, 2004). Outra evidência que pode reforçar o uso de carbapenem foi a evidência de resistência a ceftazidima (DANCE *et al.*, 1991). A adição de sulfametoxazol-trimetropim à ceftazidima no início do tratamento não reduziu a taxa de letalidade da doença aguda (CHIERAKUL *et al.*, 2005).

O tratamento da enfermidade é feito em duas fases em situações graves. A fase inicial tem duração de 14 dias com terapia endovenosa com uma das seguintes drogas: ceftazidima, meropenem ou imipenem. A fase de erradicação é feita com antibióticos orais por tempo prolongado para reduzir o risco de recidiva. As drogas geralmente recomendadas para tratamento oral são sulfametoxazol-trimetropin e doxiciclina por 12 a 20 semanas (INGLIS; ROLIM; RODRIGUES, 2006; WUTHIEKANUN; PEACOCK, 2006). O

cloranfenicol pode ser associado à sulfametoxazol-trimetropin e doxiciclina, embora sua adição não tenha mostrado diferença significativa (CHAOWAGUL *et al.*, 2005).

Em caso de contra-indicações, especialmente em grávidas ou crianças, a amoxicilina-clavulanato pode ser utilizada em substituição. Não há consenso quanto à duração exata da terapia antibiótica endovenosa nem a cerca do que deve ser utilizado para a terapia oral de erradicação. Estudos bem planejados são aguardados para buscar essas respostas (INGLIS; ROLIM; RODRIGUES, 2006).

O uso de G-CSF foi utilizado no tratamento da melioidose e, embora inicialmente tenha evidenciado possível redução na letalidade por sepse (CHENG *et al.*, 2004), recentemente estudo randomizado e controlado não demonstrou associação com redução da letalidade (CHENG *et al.*, 2007).

O tratamento de suporte adequado, mediante a correção de acidose metabólica, cetose, controle glicêmico e oxigenação, é medida que também pode ser importante para pacientes específicos com infecção aguda e grave (INGLIS *et al.*, 2001).

1.10 Prognóstico

A taxa de letalidade nas formas graves de melioidose variou de 14% a 74% em diferentes estudos (WHITE, 2003). A letalidade na Tailândia varia entre 40 a 50%, sendo superior à da Austrália que é de 10 a 20% (CHENG *et al.*, 2008) Um estudo prospectivo de 5 anos em 1999 em Ubon Ratchatani, nordeste da Tailândia, mostrou letalidade de 42% (CHAOWAGUL *et al.*, 1993). Na Austrália, um estudo prospectivo indicou letalidade de 19% (CURRIE *et al.*, 2004). A taxa de letalidade para melioidose com sepse grave foi de 50% em Cingapura quando comparada com 90% em um estudo tailandês (CHENG *et al.*, 2008).

Um sistema de escore foi proposto para prever a letalidade por melioidose. Foram avaliados os seguintes parâmetros: pneumonia, tempo do diagnóstico, nível sérico de uréia, nível sérico de bilirrubina, nível sérico de bicarbonato e contagem de linfócitos. Esse sistema, embora sem validação externa, ajuda a identificar grupos para intervenção intensiva, tais como admissão precoce em unidade de terapia intensiva e uso de meropenem (CHENG *et al.*, 2003).

A recorrência de melioidose pode se dar em razão da recidiva em consequência da terapia de erradicação inicial inapropriada ou reinfecção (CHAOWAGUL *et al.*, 1993; LIMMATHUROTSAKUL *et al.*, 2006, 2008). Na Tailândia, estudo mostrou recidiva em 23%

dos casos e os fatores que diminuíram o risco foram: uso inicial de ceftazidima e duração prolongada da terapia (CHAOWAGUL *et al.*, 1993). Na Austrália foi relatada recidiva em 13% dos casos de melioidose (CURRIE, 2003c). Recente estudo na Tailândia, entre o período de 1996 e 2005, mostrou que reinfecção é responsável por um quarto dos casos de recorrência de melioidose (MAHARJAN *et al.*, 2005).

Recentemente, um sistema simples de escore foi desenvolvido para diferenciar recidiva e reinfecção em pacientes com melioidose recorrente. Um estudo prospectivo foi conduzido no nordeste da Tailândia entre os anos de 1986 e 2005. Restou evidência de que 144 pacientes com melioidose apresentaram recorrência. Desses, 92 pacientes tiveram recidiva e 49 tiveram reinfecção comprovada por técnicas de genotipagem. Foi demonstrado que recidiva foi associada com tratamento prévio e por tempo breve para fatores clínicos de recorrência, enquanto reinfecção foi associada à insuficiência renal e apresentação clínica durante estação chuvosa. O sistema de escore simples pode fornecer informação importante à beira do leito do paciente em locais onde rápida genotipagem não está disponível (LIMMATHUROTSAKUL *et al.*, 2008).

Alguns fatores bioquímicos também foram relatados como marcadores preditivos de mau prognóstico em pacientes com sepse por *B. pseudomallei*: deficiência de proteína C; deficiência de proteína S e deficiência de antitrombina (LAROSA *et al.*, 2006).

1.11 Prevenção e Controle

Como a *B. pseudomallei* é ubíqua no ambiente de áreas endêmicas, é difícil para as pessoas cujas ocupações envolvem contato com solo e água evitarem a exposição. Para aquelas que apresentam maior risco, como, por exemplo, diabéticos, é recomendado o uso de proteção das extremidades e evitar o cultivo de arroz, embora a eficácia dessa medida não tenha sido avaliada (DANCE, 2005). O CDC (2008) recomenda que pessoas com diabetes e lesões cutâneas evitem contato com solo e águas paradas em áreas contaminadas. Além disso, recomenda também o uso de botas de cano longo durante trabalho na agricultura. Durante o surto em zoológicos franceses, tentou-se descontaminar o solo, mas provavelmente é uma medida inútil (DANCE, 2005). O *guidelines* da Health Protection Agency (HPA) não recomenda a descontaminação ambiental exceto em casos de elevada contaminação localizada como em laboratórios. Nessas situações a desinfecção deve ser realizada de acordo com as normas preconizadas (HPA-UK, 2008).

O manuseio de *B. pseudomallei* deve ser feito em laboratório de biossegurança de nível 3 (ROTZ *et al.*, 2002,). Em recente estudo, Peacock (2008) assinala que as boas práticas recomendadas em laboratório prevenirá a maioria dos acidentes envolvendo exposição à bactéria. Mesmo em laboratórios clínicos de nível 2, que podem isolar a bactéria durante seu trabalho de rotina, recomenda-se adaptar as práticas preconizadas para o manuseio da *B. pseudomallei* com o objetivo de minimizar o risco de exposição dos profissionais. O estudo orienta também a conduta para os casos de acidentes pós-exposição à bactéria. Nessas situações, é recomendada a lavagem imediata com água abundante, seguida por desinfecção de acordo com a rotina local. A profilaxia com antibiótico é preconizada para todos os acidentes considerados de elevado risco e também para os acidentes de baixo, quando há fatores de risco para melioidose. A droga de escolha recomendada é sulfametoxazol-trimetropim durante 3 semanas. Em caso de resistência da *B. pseudomallei* ou intolerância à droga, a escolha deverá ocorrer entre doxiciclina ou amoxicilina-clavulanato. O protocolo ainda prevê monitoramento pós-exposição para a detecção de sintomas da doença e coleta de amostras de soros no primeiro dia e posteriormente nas semanas 1, 2, 4 e 6. Todos os laboratórios onde há manuseio de *B. pseudomallei* deverão elaborar consenso de suporte ocupacional bem como contar com orientação de médico especializado que tenha experiência no tratamento de melioidose (nacional ou internacional) (PEACOCK *et al.*, 2008).

Vários candidatos à vacina como proteína flagelar, lipopolissacarídeos e polissacarídeos capsulares vem sendo desenvolvidos. Até o momento não há nenhuma vacina contra *B. pseudomallei* licenciada para uso em humanos (PEACOCK *et al.*, 2006).

Após esta revisão sobre a doença, pode-se refletir sobre a situação atual da melioidose no Brasil. Observem-se os acontecimentos a partir de março de 2003, quando houve a primeira identificação da presença da bactéria no Ceará. No início, ante a uma doença totalmente desconhecida, o problema poderia ser encarado como um evento inusitado e raro de uma pequena cidade do interior do Nordeste do Brasil.

Bastava leitura mais aprofundada sobre a doença, no entanto, para se ter a percepção de que somente o acaso não explicava a ocorrência do surto de Tejuçuoca. As características epidemiológicas da melioidose, como sua distribuição mundial pouco esclarecida e a estreita relação que mantém com o ambiente físico, já davam pistas de que não podia se tratar de um episódio isolado. A investigação epidemiológica do surto realizada em 2003 alertava para o fato de que se estava diante de uma nova doença tropical no País (ROLIM, 2004).

O início do ano de 2004 já comprovava que a doença não estava limitada à Tejuçuoca, região norte do Estado. Desta vez, foi diagnosticada na região central do Ceará, em Banabuiú, e novamente acontecia sem que fosse possível estabelecer seu entendimento. No mesmo ano, também foi identificada a presença da bactéria em solo e de algumas pessoas assintomáticas com evidência de anticorpos anti-*B. pseudomallei* (ROLIM *et al.*, 2005). No ano de 2005, outro caso acontecia no Município de Aracoiaba que, embora pertença à região norte do Ceará, fica localizado em região distinta dos casos anteriores, o maciço de Baturité. Assim, os indícios que a *B. pseudomallei* estava realmente presente no Ceará iam ficando ainda mais evidentes.

Além disso, a falta anterior de registros de melioidose, apesar de poder ser atribuído à ausência real da doença, também pode ser explicada pela falta de conhecimento sobre ela. Uma observação a esse respeito reside no fato da enfermidade ser desconhecida no Brasil e não fazer parte das doenças comumente inseridas no planejamento das ações de saúde pública e no ensino médico do Brasil. Essa possibilidade é reforçada quando se verifica que não há um quadro clínico patognômico quando a doença se manifesta, sendo considerada uma grande mimetizadora, que pode simular outras infecções mais comuns na Região. Acrescente-se que a ocorrência da melioidose é freqüente em área rural, onde o acesso a serviços médicos é difícil ou ocorre de forma precária. O diagnóstico da melioidose é laboratorial e a maioria dos municípios do Estado não dispõe de estrutura laboratorial mínima para confirmação de casos. Todas essas considerações reforçam a existência da melioidose no Ceará.

Uma vez estabelecido esse conhecimento, entretanto, é necessário buscar melhor entendimento sobre a ocorrência da *B. pseudomallei* no Estado do Ceará. Observa-se que todos os casos documentados até agora tiveram relação com a exposição em solo e água e ocorreram em quatro diferentes locais, todavia não havia vínculo epidemiológico entre eles. A evidência sorológica de infecção assintomática por *B. pseudomallei* mostra que as pessoas têm exposição ao microorganismo, uma vez que a bactéria é adquirida sob exposição ambiental.

1.12 Pergunta de Partida

Como a *B. pseudomallei* ocorre no solo do Ceará e que implicação apresenta para as pessoas que são expostas ao ambiente?

1.13 Hipótese

1) O ambiente local deve ter papel fundamental na distribuição da bactéria no Ceará. É sabido que a melioidose apresenta aspecto ambiental singular e exibe ecologia complexa, pois fatores físicos, químicos e biológicos parecem influenciar sua ocorrência no ambiente. É possível perceber essa influência quando se constata o fato de que todos os casos de melioidose em seres humanos ocorridos no Ceará aconteceram em períodos com pluviometria elevada e em região rural ou próxima a cursos de água, em quatro municípios distintos. As pessoas que apresentaram melioidose tinham histórias de exposição ambiental bem evidenciada, embora os mecanismos de infecção e o grau de intensidade de exposição tenham mostrado diferenças.

2) Uma vez que a *B. pseudomallei* esteja presente no ambiente, as pessoas expostas a solo e água devem ter infecção pela bactéria, não necessariamente desenvolvendo a doença, mas apresentando infecção não aparente.

2 OBJETIVOS DO ESTUDO

2.1 Objetivo geral

Caracterizar reservárias para o entendimento da *B. pseudomallei* em dois municípios do Estado do Ceará que apresentam registros de casos humanos e avaliar o nível de infecção humana.

2.2 Objetivos específicos

1. Identificar *B. pseudomallei* em amostras de solo coletadas no período de janeiro a dezembro de 2007, nos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú;
2. analisar aspectos geoclimáticos das áreas estudadas e comparar com outras regiões endêmicas de ocorrência da melioidose no mundo;
3. produzir antígeno com base em cepas locais de *B. pseudomallei* e desenvolvimento de teste sorológico; e
4. realizar inquérito soro-epidemiológico da população residente nessas regiões, para identificação de infecção por *B. pseudomallei*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi desenvolvido em dois municípios do Estado do Ceará que têm casos notificados de melioidose - Tejuçuoca e Banabuiú (Fig. 1). A seleção desses locais para estudo ocorreu porque foram os primeiros a apresentarem casos da doença, o que ocasionou conseqüentes contatos prévios com a população, facilitando o desenvolvimento da pesquisa. Levou-se em consideração também o fato de estarem situados em diferentes regiões do Estado do Ceará.



Figura 1. Localização geográfica dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú.

O estudo foi dividido em duas partes bem definidas:

1. Estudo ambiental mediado por pesquisa da *B. pseudomallei* em solo dessas regiões; e
2. inquérito soro-epidemiológico das suas populações.

Ambas as partes foram desenvolvidas nos dois municípios no período de março de 2006 a maio de 2008 e, embora algumas etapas tenham sido desenvolvidas simultaneamente, cada parte da pesquisa será descrita separadamente para facilitar a compreensão.

PARTE 1

3.1 Estudo Ambiental

3.1.1 Caracterização Geográfica dos Locais de Estudo

Tejuçuoca

O Município de Tejuçuoca, palavra originária do tupi, que significa lugar onde residem os teiús (lagartos) grandes, foi criado no ano de 1987 e originou-se do Município de Itapajé (IPECE, 2007a).

Geograficamente fica situado na região norte do Estado do Ceará nas seguintes coordenadas: 3° 59' 20'' latitude (S) e 39° 34' 50'' longitude (W). Os municípios limítrofes são Itapajé e Irauçuba, ao norte; Irauçuba e Canindé, ao sul; General Sampaio, Apuiarés, Pentecoste e Itapajé ao leste, e Irauçuba ao oeste (IPECE, 2007a; IBGE, 2008).

O Município compreende uma área de 750,60 km², altitude de 140,3 metros e fica localizado, em linha reta, a 127 km de distância de Fortaleza, capital do Estado do Ceará. As características ambientais são o clima tropical quente semi-árido, precipitação média anual de 659,9 mm, temperatura média de 26 a 28°C e período chuvoso concentrado entre os meses de janeiro a abril. Em relação aos componentes ambientais, as formas de relevo são suaves e pouco dissecadas da depressão sertaneja. Os solos encontrados são bruno não cálcico, solos litólicos, planossolos solódicos, podzólicos vermelho-amarelos, cobertos por vegetação típica de caatinga arbustiva aberta e densa (IPECE, 2007a; FUNCEME, 2008a, 2008b; IBGE, 2008).

A população do Município é 13.519 habitantes, com a concentração predominante na área rural, que possui 9.592 habitantes. A faixa etária de 0 a 14 anos é de 38,67%; entre 15 a 64 anos é 55,04% e maior ou igual a 65 anos é de 6,29% (IPECE, 2007a).

A principal atividade econômica reside na agricultura, destacando-se plantação de feijão, milho e mandioca. Na pecuária extensiva, destaca-se a criação de bovinos, ovinos, caprinos, suínos e aves. O turismo ecológico e o artesanato de redes e bordados assumem papel de destaque no Município (IPECE, 2007a; IBGE, 2008).

A pesquisa ambiental em Tejuçuoca foi realizada numa área rural situada a 20 quilômetros da Sede, que compreendeu quatro comunidades: Santa Luzia, onde ocorreu o surto de melioidose no ano de 2003, além das circunvizinhas São Gonçalo, São Bento e Alegre. A região é banhada pelo rio Caxitoré, que margeia todas as comunidades. A principal

atividade econômica dessa região é a agricultura de subsistência com o cultivo de milho e feijão e da pecuária de caprinos, ovinos e bovinos (IPECE, 2007a; IBGE, 2008).

Banabuiú

O Município de Banabuiú, termo proveniente da denominação de afluente do rio Jaguaribe, foi criado no ano de 1988 e originou-se do Município de Quixadá (IPECE, 2007b).

Geograficamente fica situado na região Centro-Leste do Estado do Ceará, conhecida como região do Sertão Central, nas seguintes coordenadas: 5° 18' 35" latitude (S) e 38° 55' 14" longitude (W). Os municípios limítrofes são Quixadá ao norte; Milhã, Solonópole e Jaguaretama, ao sul; Jaguaretama e Morada Nova, ao leste, e Quixeramobim, ao oeste (IPECE, 2007b; IBGE, 2008).

O Município compreende uma área de 1.079 km² com altitude de 170 metros e fica localizado, em linha reta, a 179 km de distância de Fortaleza, capital do Estado do Ceará. As características ambientais são o clima tropical quente semi-árido, precipitação pluviométrica média de 815,4 mm, temperatura média de 26 a 28°C e período chuvoso concentrado entre os meses de fevereiro a abril. Os componentes ambientais são relevos de depressões sertanejas e maciços residuais. Os solos encontrados são solos aluviais, solos litólicos, planossolos solódicos, podzólicos vermelho-amarelos e cambissolos que são cobertos por vegetação de caatinga arbustiva aberta e densa e por floresta mista dicotillo-palmácea (IPECE, 2007b; FUNCEME, 2008a, 2008b; IBGE, 2008).

A população do Município é 16.173 habitantes, com número discretamente maior na área rural, com 8.551 habitantes. A faixa etária de 0 a 14 anos é de 38,31%; entre 15 a 64 anos é 55,16% e maior ou igual a 65 anos é de 6,53% (IPECE, 2007b).

O local do estudo ambiental em Banabuiú foi a comunidade rural de Jurema de Baixo que apresentou o caso de melioidose no ano de 2004 e fica situada a 25 quilômetros da Sede do Município. A região é banhada pelo rio Banabuiú, que fica à margem das casas da população local. A principal atividade econômica dessa região é a agricultura de subsistência com o cultivo de milho e feijão, a pecuária de bovinos e caprinos, e o comércio de leite e derivados (IPECE, 2007b; IBGE, 2008).

3.1.2 Descrição do Estudo

O estudo ambiental compreendeu a pesquisa mensal da *B. pseudomallei* em solo e pesquisa dos aspectos climáticos e componentes ambientais das áreas de coleta - temperatura, pluviometria, composição do solo e vegetação.

A pesquisa da bactéria em solo foi realizada durante 12 meses no período de janeiro a dezembro de 2007. Em cada mês, foram coletadas 50 amostras em cada município, totalizando 600 recolhas. Antes do início das coletas mensais, duas visitas prévias foram feitas em cada município para o planejamento detalhado do estudo. Na primeira visita foi feito o reconhecimento das áreas, foram identificados os sítios para coleta e procedido ao contato com líderes comunitários e moradores para explicação da pesquisa. Na segunda visita desenvolveu-se o estudo piloto para coleta, transporte, determinação do tempo de deslocamento e testes laboratoriais preliminares.

3.1.3 Delimitação da Amostra do Solo

Em cada município foram definidos cinco sítios de recolha coleta dentro de um raio de 2 km da residência dos pacientes. Foi registrado o posicionamento geográfico de todos os sítios por meio do equipamento *Global Positioning System* (GPS), consoante está representado nas figuras 3 e 4.

Esses sítios de coleta foram selecionados levando-se em consideração características semelhantes das circunjunções de cada residência que, desta forma, ficaram assim distribuídos: o quintal da casa, um local sombreado por árvore, um rio, um local em área de alagamento durante as chuvas e outro onde havia criação de animais (Figuras 2, 3, 4, 5 e 6).

Cada um dos cinco sítios recebeu numeração de 1 a 5. Convencionou-se também que o Tejuçuoca seria representado pelo número 1 e Banabuiú pelo número 2. Todas as amostras coletadas recebiam codificação com três dígitos, baseados nos seguintes parâmetros: o primeiro dígito correspondia ao número do município, o segundo ao número do sítio e o terceiro ao número da amostra. O último obedecia seguia a sequência mensal de coleta. Em cada mês, a numeração iniciava com o sítio mais profundo. Um exemplo da codificação está representado abaixo (Quadro 1):

2. 2. 10	A codificação significa que a amostra é de Banabuiú (2), foi coletada no sítio 2 e corresponde a amostra 10
----------	---



Figura 1. Sítios de coleta no Município de Tejuçoca

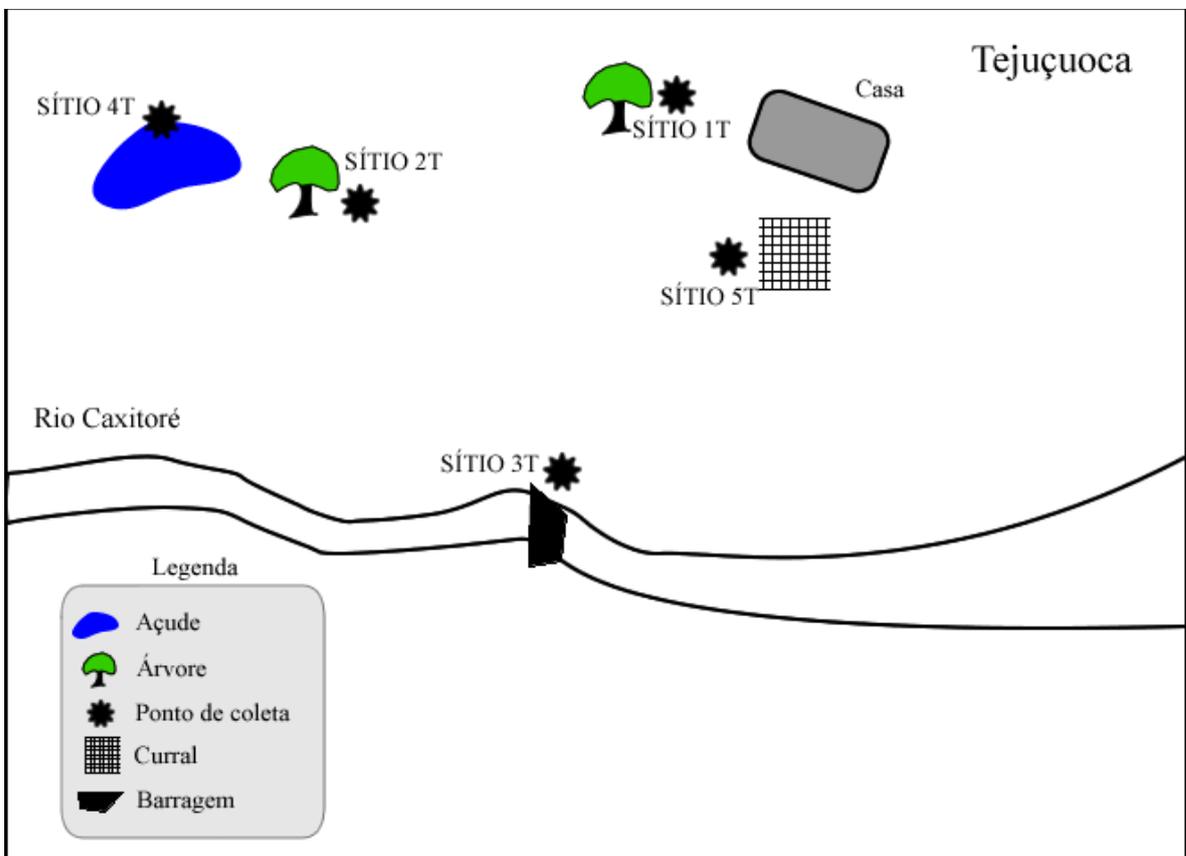


Figura 2. Esquema dos sítios de coleta no Município de Tejuçoca



Figura 3. Sítios de coleta no Município de Banabuiú

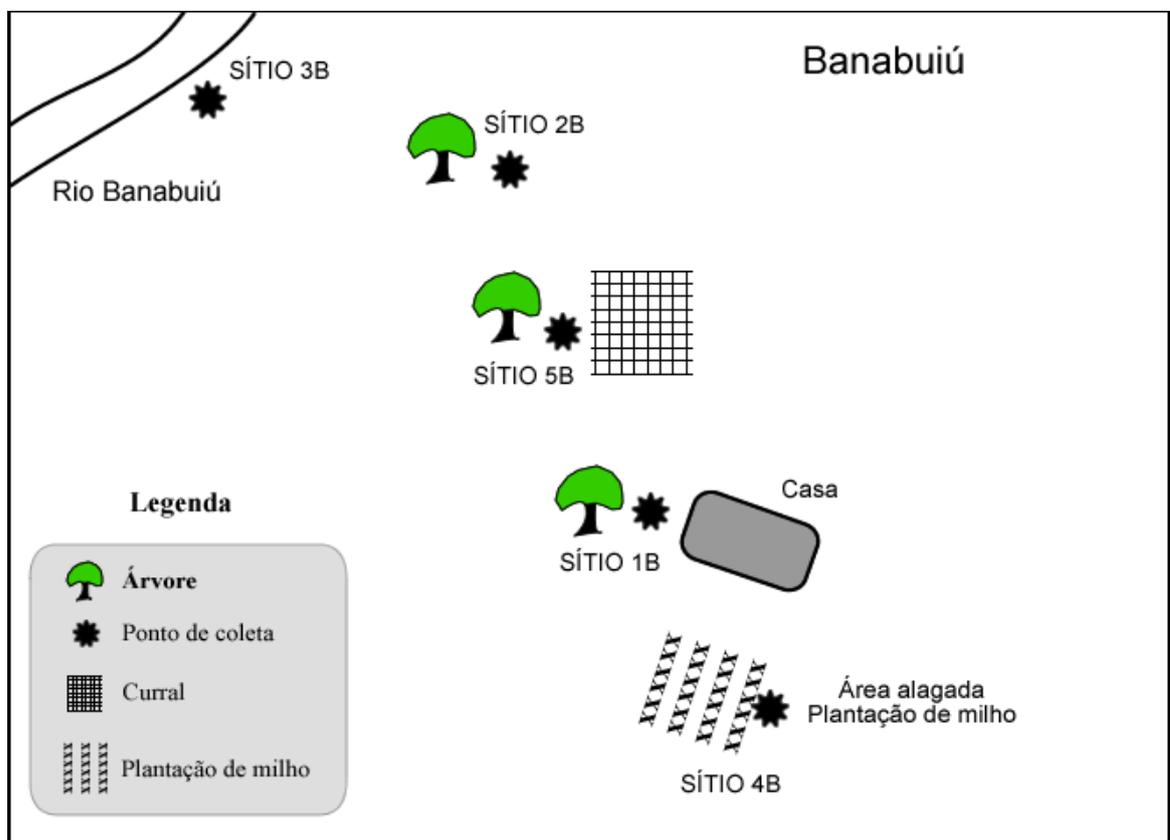


Figura 4. Esquema dos sítios de coleta no Município de Banabuiú

BANABUIÚ

TEJUÇUOCA

**Sítio 1:
quintal da
casa**

Banabuiú:
S 05 11'425''
W 38 43' 567''



Tejucuoca:
S 03 58'461''
W 39 42' 462''



**Sítio 2:
árvore**

Banabuiú:
S 05 11'501''
W 38 43' 594''



Tejucuoca:
S 03 58'377''
W 39 42' 497''



Sítio 3: rio

Banabuiú:
S 05 11'419''
W 38 43' 455''



Tejucuoca:
S 03 58'474''
W 39 42' 636''



**Sítio 4:
local de
alagamento**

Banabuiú:
S 05 11'414''
W 38 43' 553''



Tejucuoca:
S 03 58'384''
W 39 42' 506''



**Sítio 5:
local de
criação de
animais**

Banabuiú:
S 05 11'459''
W 38 43' 467''



Tejucuoca:
S 03 58'467''
W 39 42' 457''



Figura 5. Sítios de coleta georefenciados nos Municípios de Banabuiú e Tejucuoca

3.1.4 Tipo de Coleta e Transporte de Amostras do Solo

A coleta de amostra ocorreu durante o ano de 2007. A equipe deslocou-se para os municípios uma vez por mês, até completar um ciclo chuva/seca durante os doze meses. Em cada sítio, cinco amostras foram coletadas em cinco diferentes profundidades: na superfície e a cada 10cm, 20cm, 30cm e 40cm (Figura 7). A coleta do solo foi feita através da abertura de um buraco em forma de cunha, na profundidade de 0 a 40 cm que deixava uma parede vertical (Figura 8).

Após a abertura do buraco, em cada profundidade, com a ajuda de uma pá pequena, a terra foi coletada e colocada em tubos de Falcon estéreis de 50ml. Entre as coletas foi feita assepsia da pá com álcool a 70%. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos, mantidas em temperatura ambiente e transportadas para o processamento primário num máximo de 24 horas. Mensalmente foram coletadas 50 amostras, sendo 25 em cada município.



Figura 6. Profundidade do sítio de coleta de amostra do solo.

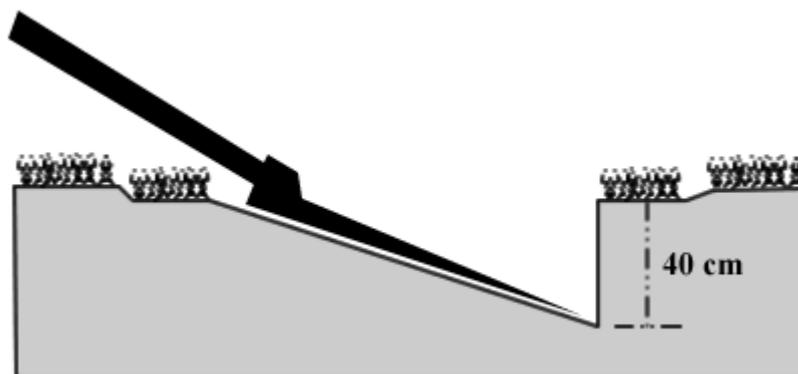


Figura 7. Modelo de coleta de amostra de solo

3.1.5 Processamento Primário das Amostras do Solo

O processamento das amostras seguiu o protocolo utilizado pelo Western Australian Centre for Pathology and Medical Research - (PathWast), laboratório do Universidade do Oeste da Austrália, que foi gentilmente cedido pelo Dr. Timothy Inglis. Utilizou-se a seguinte técnica: procedeu-se a pesagem de 5g de terra de cada amostra, tendo por adição 5ml de água destilada em tubo de Falcon estéril. Foram feitas pequenas modificações no protocolo e estas amostras foram agitadas durante uma noite. Após 1 hora para sedimentação, 0,5µl do sobrenadante de cada amostra foi inoculado em meio de cultura caldo triptona de soja (TSB) suplementado com gentamicina por 48 horas a 37°C. Deste meio, as amostras foram repicadas em dois meios seletivos, BPSA e Ashdown (ASHDOWN, 1979; HOWARD; INGLIS, 2003;), por 48 horas a 37°C, para observação primária (Figura 9).

3.1.6 Estocagem de Amostras Suspeitas

As placas de BPSA e Ashdown, que apresentaram crescimento bacteriano após 48 horas, foram examinadas para visualização e seleção de colônias a fim de investigar *B. pseudomallei*. Nessa etapa, foram selecionadas colônias provenientes de todas as amostras que não apresentaram contaminação. Embora tenha sido preferida a seleção de colônias que apresentaram morfologia rugosa característica da bactéria, colônias mucóides também foram selecionadas. As placas foram reexaminadas diariamente durante 4 dias, uma vez que a colônia tende a apresentar aspecto enrugado com o passar dos dias. Essas colônias suspeitas foram semeadas em ágar-estoque (Anexo II).

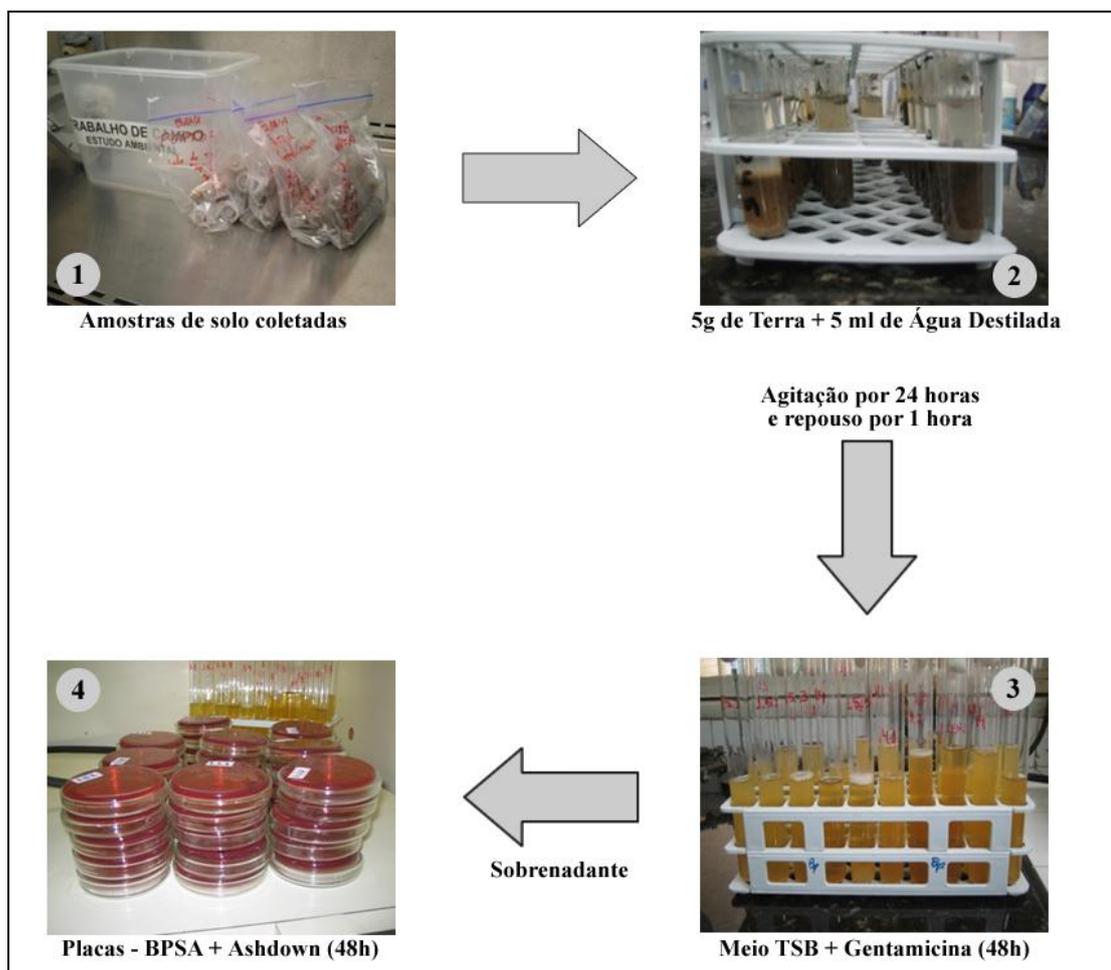


Figura 8. Processamento primário das amostras

3.1.7 Identificação Microbiológica e Bioquímica das Amostras

As colônias selecionadas aos o isolamento primário foram retiradas do agar-estoque, inoculadas em BIH e submetidas à triagem para identificação de cepas de *B. pseudomallei*. Foram realizados o teste de oxidase e a prova de sensibilidade a colistina, que utilizou o método difusão em disco usando o meio Müeller-Hinton, utilizando 10 μ g/ml do antibiótico. Após etapa de triagem, as colônias foram isoladas, repicadas em placas de Agar-sangu para serem identificadas por meio do painel de identificação bioquímica API20NE (bioMerieux, França) (Figura 10).

Segundo o fabricante (2005), o API 20 NE é um sistema padronizado para a identificação de bacilos Gram-negativos não enterobactérias e não fastidiosos que combina 8 testes convencionais, 12 testes de assimilação e uma base de dados. Algumas bactérias identificadas pelo sistema são: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas* etc.

O painel API 20 NE possui galeria para identificação do microorganismo. Esta galeria possui 20 microtubos que contêm substratos desidratados. Conforme instrução, preparou-se uma solução salina da bactéria, diluindo 1 a 4 colônias da bactéria em 2 ml de NaCl a 0,85%, ajustando a opacidade ao ponto 0.5 da escala de McFarland. Posteriormente inoculou-se a suspensão bacteriana salina, enchendo-se os tubos dos 8 testes convencionais que reconstituiu os meios. As cúpulas de três testes (GLU, ADH, URE) foram cobertas com óleo de parafina. Para a inoculação dos 12 testes de assimilação, foram transferidos 200µl da suspensão salina bacteriana para diluir uma ampola de API AUX medium. Cada tubo e cada cúpula do teste de assimilação foram preenchidos com cuidado, mantendo-se um nível horizontal ou ligeiramente convexo. As caixas dos testes foram incubadas a $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 48 horas.

A leitura dos testes foi feita por meio das viradas de tonalidade espontânea ou reveladas com a adição da adição de reagentes. Utilizou-se o Quadro de Leitura dos testes. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se por viragens de tonalidade espontâneas ou reveladas sob adição de reagentes. A identificação foi obtida com base em perfil numérico. Os testes foram separados por grupos de três e um valor 1, 2 ou 4 foi indicado para cada um. Adicionaram-se em cada grupo os valores que correspondem às reações positivas e obteve-se número com 7 algarismos. A reação de oxidase constituiu o 21° teste e foi assinalada com o valor 4, quando positiva. Por fim, a identificação foi efetuada com suporte na base de dados (v 6.0).

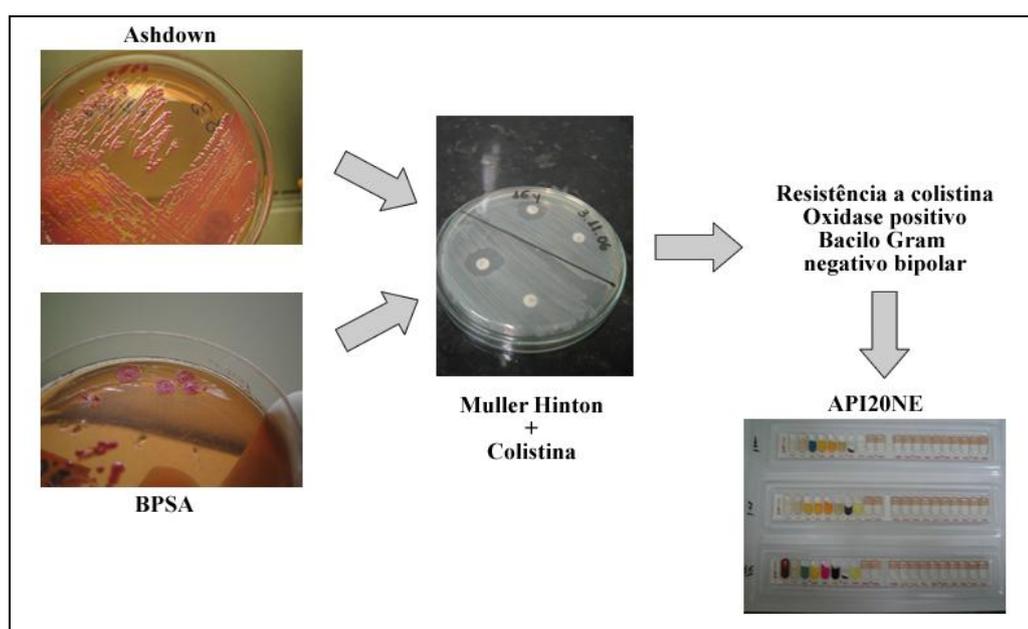


Figura 9. Identificação microbiológica das amostras

3.1.8 Estocagem de Amostras de *B. pseudomallei*

Todas as cepas identificadas como *B. pseudomallei* pelo painel de identificação manual API20NE foram semeadas em ágar-estoque para estudos adicionais. Cepas suspeitas com colônias morfológicas características da bactéria e que não foram identificadas pelo API20NE também foram estocadas para realização de testes complementares posteriores.

3.1.9 Dados Meteorológicos e Componentes Ambientais

Os dados dos componentes ambientais, como solo e vegetação e os de pluviosidade do período, foram obtidos das seguintes fontes:

- Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME) – informações pluviométricas e condições climáticas, bem como tipos de solo dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú;
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) – informações censitárias, características geográficas e mapas dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú;
- Instituto de Pesquisa e Estratégia Econômica do Ceará (IPECE) – informações sobre perfis socioeconômicos dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú; e
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) – mapas e informações a cerca do aspectos geológicos dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú.

Essas informações foram obtidas de documentos e *sites* disponibilizados na internet, bem como em visitas locais a duas dessas instituições, FUNCEME e IBGE, quando foram discutidos os principais aspectos climáticos e dos componentes ambientais com profissionais especializados dessas instituições.

PARTE 2

3.2 Estudo sorológico

O estudo sorológico compreendeu o desenvolvimento dos testes laboratoriais e o trabalho de campo para coleta de dados epidemiológicos e amostras de soro da população residente nas áreas pesquisadas nos dois municípios.

3.2.1 Produção do Antígeno

Os testes sorológicos não estão disponíveis comercialmente e são produzidos somente em áreas endêmicas. Dessa forma, a etapa inicial para o desenvolvimento do estudo sorológico consistiu na produção do antígeno. As cepas de *B. pseudomallei* utilizadas foram isoladas em hemoculturas de pacientes com melioidose diagnosticados no Estado do Ceará. Dois protocolos de extração de antígeno foram produzidos.

O primeiro protocolo seguiu a metodologia utilizada por Tiyawisutsri (2005). As cepas de *B. pseudomallei* foram incubadas em ágar-sangue por 72 horas a 37°C. As placas foram coletadas, suspensas em solução salina e agitadas vigorosamente em vórtex e então autoclavadas a 121°C durante 15 minutos. Em seguida, as preparações foram centrifugadas a 4.000 rpm durante 30 minutos. Os sobrenadantes foram filtrados através de filtro Millipore 0,22-µm e armazenados a 4°C até o uso.

O segundo protocolo de extração de antígeno seguiu a padronização do Western Australian Centre for Pathology and Medical Research - (PathWast), gentilmente fornecido por Dr. Timothy Inglis. Resumidamente, as cepas *B. pseudomallei* foram incubadas em placas de ágar-sangue por 48 h a 37°C. Após análise da pureza das colônias e identificação da espécie por métodos bioquímicos (API20NE, bioMerieux, França), algumas colônias foram selecionadas e transferidas para frascos contendo meio líquido sintético livre de proteínas (anexo III) e incubadas durante 2 semanas a 37°C. As culturas foram agitadas diariamente por 2 vezes, uma vez que condições aeróbicas são essenciais para seu crescimento. Após incubação, um inóculo foi cultivado em placas de ágar-sangue para checagem da pureza das colônias. A seguir, os caldos de cultura foram autoclavados por 15 min a 121°C. O material foi filtrado em papel de filtro e colocado sob agitação magnética, acrescentando-se lentamente solução de sulfato de amônio. Após 24 h, o material precipitado foi dialisado e submetido a ultracentrifugação durante 15 min a 10.000 rpm e o precipitado finalmente ressuspenso em salina e mantido a -20° C em alíquotas (Figura 11).

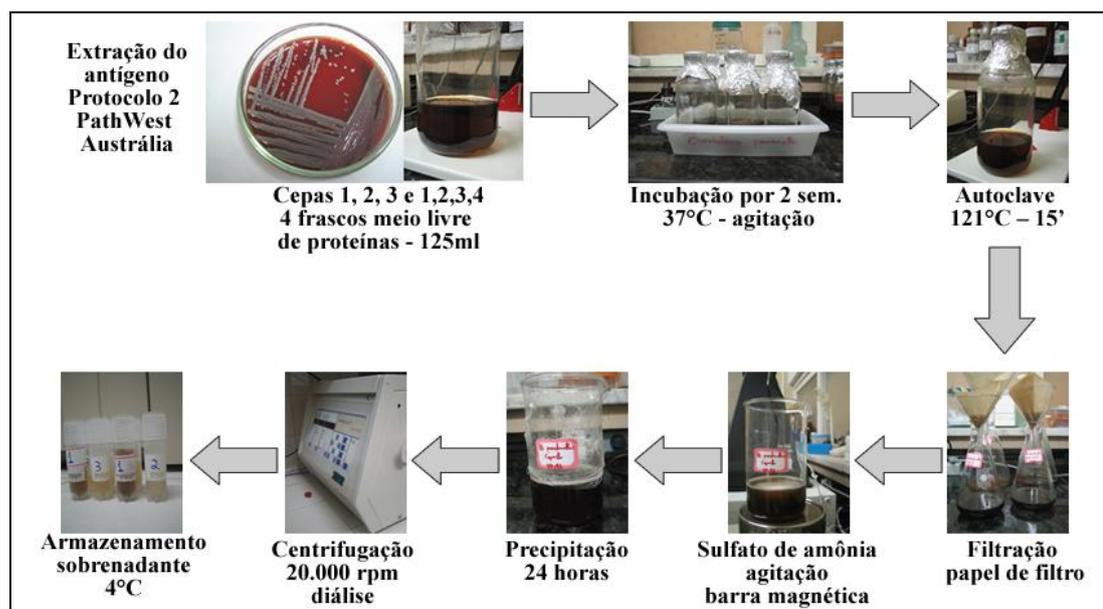


Figura 10. Produção do antígeno de *B. pseudomallei*

3.2.2 Delimitação do Melhor Produto

Imunodifusão Radial Dupla

Os antígenos produzidos foram testados utilizando-se o teste de imunodifusão radial dupla. Em lâminas de vidro (25 x 75 mm), foram colocados 3ml de agarose 1% em salina. Após esfriamento, foram feitos orifícios de 3mm com a ajuda de um molde perfurador, que fez 1 molde central e 6 periféricos, distantes 6mm entre si. Em seguida, foram colocados 10 μ L do antígeno de *B. pseudomallei* no orifício do centro. Nos demais foram colocados soros de pessoas residentes em Tejuçuoca, testados previamente em laboratório de referência, na seguinte ordem: 1 soro de paciente que teve a doença, 1 soro de paciente com infecção assintomática e 4 soros de pessoas sem a infecção. As lâminas foram então incubadas por uma noite em câmara úmida. Após esse período, foram lavadas em citrato de sódio a 5% durante 1 hora e deixadas em solução salina a 0,85% durante 24 horas com 4 trocas da solução. Encerrada essa etapa, as lâminas foram envolvidas por papel de filtro umedecido por H₂O e secadas por 24 horas a 37°C. Na última etapa, as lâminas foram molhadas para retirada cuidadosa do papel de filtro e, em seguida, após nova lavagem para retirar os fragmentos de papel, foram coradas com *comassie blue* durante 5 minutos. A visualização das linhas de precipitação foram, então, observadas após uso de solução descorante.

3.2.3 Padronização do Ensaio Imunoenzimático

O teste padronizado para o desenvolvimento do estudo sorológico foi o ELISA. Para o desenvolvimento do teste de ELISA, as microplacas (Costar, USA), foram sensibilizadas com 50 ng/poço do filtrado de cultura de *B. pseudomallei*. Após 16 h a 4°C, as placas foram incubadas com quatro amostras de soro em diluição seriada de 1:100 a 1:800 (em duplicatas) em PBS- NaCl 0,5M e tween 20 a 0,2%. Após 1 h 30 min a 37°C, as placas foram lavadas (4 x) com PBS-contendo tween 20 a 0,05% e incubadas com conjugado anti-IgM ou anti-IgG humano peroxidase nas diluições de 1:2000 (Sigma, USA). Após 1 h a 37°C, as placas foram lavadas e incubadas com solução de substrato contendo ortofenilenodiamina 0.4 mg/ml em solução citrato-fosfato 0,1M, pH5,0 e H₂O₂ na concentração final de 0,01%. Após 30 min, a reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 2,5 N. A leitura foi feita pela medida de absorbância em 492 nm. Os títulos foram considerados como a maior diluição próxima ao valor do *cut-off*. O valor do *cut-off* foi considerado, por sua vez, pela média de leitura de absorbância em 492 nm de um controle negativo.

3.2.4 Local do Inquérito Soroepidemiológico

O estudo sorológico foi realizado nos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, nas áreas rurais que registraram casos de melioidose (ROLIM *et al.*, 2005). Em Tejuçuoca, a área selecionada para o estudo foi comunidade de Santa Luzia, onde ocorreu o surto de melioidose no ano de 2003. O rio Caxitoré foi o provável local de contaminação do surto identificado em investigação epidemiológica prévia. Considerando que várias casas se distribuíam ao longo do rio Caxitoré e formam comunidades pouco distantes entre si, três comunidades vizinhas foram incluídas: São Gonçalo, São Bento e Alegre. Em Banabuiú, foi realizado na comunidade rural de Jurema de Baixo, onde ocorreu o caso de melioidose no ano de 2004. Além dessa, que também possui casas distribuídas ao longo do Rio Banabuiú, a contígua comunidade de Caraúba de Baixo foi incluída.

3.2.5 Operacionalização do Estudo de Campo

A equipe de campo foi composta pela pesquisadora responsável e por oito técnicos que atuaram na aplicação de questionários e na coleta de sangue para exames. Todos os técnicos foram devidamente treinados pela pesquisadora do estudo.

A forma de chamado da população para se realizar este estudo ocorreu por meio de reuniões prévias com líderes das comunidades, quando foram apresentados os objetivos e a metodologia da pesquisa. Foi esclarecido que o estudo não oferecia qualquer risco aos participantes e que seria mantido sigilo quanto à identificação dos sujeitos da pesquisa. Colaboraram na divulgação do projeto profissionais do Programa de Saúde da Família, em particular, os agentes de saúde das localidades estudadas.

O trabalho de campo ocorreu durante os meses de fevereiro e março do ano de 2006, no Município de Tejuçuoca, e no mês de agosto do ano de 2006, no Município de Banabuiú.

3.2.6 Delimitação da População

A população residente nessas áreas rurais foi submetida a um inquérito soropidemiológico para avaliação de contato com *Burkholderia pseudomallei*. Como não havia nenhum estudo prévio que estimasse uma prevalência de infecção assintomática e o universo era pequeno, o estudo incluiu todos os moradores que aceitaram participar da pesquisa. A equipe de campo visitou todos os domicílios localizados nas áreas definidas geograficamente para o estudo, com o objetivo de cobrir o maior número de participantes. As visitas foram realizadas em fins de semana e, quando os moradores estavam ausentes, era oferecido agendamento de segunda visita ao domicílio. Participaram do estudo 321 pessoas das comunidades rurais dos dois municípios. Em Tejuçuoca foram 217 pessoas componentes. Em Banabuiú, 104 pessoas fizeram parte, uma vez que as comunidades eram menores.

Critérios de inclusão e de exclusão

Como critério de inclusão, foram considerados os moradores que residiam em uma das localidades por um mínimo de dois anos. Foram excluídas do estudo crianças menores de 2 anos de idade, moradores contando menos de dois anos de residência e pessoas com permanência temporária ou inconstante nas localidades avaliadas.

Aspectos éticos

Todos os participantes foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e assinaram termo de consentimento legal e esclarecido segundo a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do

Hospital das Clínicas Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará e aprovado em 31 de janeiro de 2005, of. 09/05, processo COMEPE nº16/2005.

3.2.7 Realização do Inquérito Soroepidemiológico

A equipe de campo durante as visitas aos domicílios aplicou questionário a cada participante ou responsável, após assinatura do termo de consentimento legal e esclarecido e coleta de sangue para exame sorológico.

Dados Epidemiológicos

O questionário continha as seguintes informações epidemiológicas: idade, sexo, escolaridade, localidade de residência, ocupação, doenças preexistentes, internação hospitalar anterior, consumo de álcool ou uso de drogas imunossupressoras, atividades em contato com solo (agricultura, jardinagem, lazer); atividades em contato com água de açudes, represas e rios, local de residência anterior, deslocamentos ou viagens (apêndice I).

Coleta e Transporte de Material

A coleta de sangue (volume de 3 ml) foi realizada por punção venosa, com auxílio de materiais descartáveis individuais e respeitando as precauções universais de biossegurança. O sangue foi coletado em tubos de coleta a vácuo com gel separador (*vacutainer*) e deixado em decantação até o final do turno de coleta. Sem ultrapassar o tempo máximo de 5 horas, as amostras foram centrifugadas durante 5 minutos a 1000 rpm. Após a separação, o soro que foi transferido em alíquotas para tubos do tipo *Eppendorf*, os quais foram devidamente identificados individualmente e congelados a -20°C em *freezer*. Posteriormente, as amostras de soro foram encaminhadas em recipiente de isopor e gelo ao Laboratório de Micologia Médica da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Estado do Ceará.

3.2.8 Caracterização do Antígeno

Para análise da presença de proteínas e de lipopolissacarídeos (LPS), o filtrado de cultura de *B. pseudomallei* foi submetido à digestão com solução contendo dodecil sulfato de sódio e β -mercaptoetanol e submetido a eletroforese em géis de poliacrilamida 10%. Um dos géis foi corado com solução de coomassie blue para detecção de proteínas e o outro gel foi

corado com solução de nitrato de prata para detecção de LPS, segundo protocolo de Tsai e Frasch (1983). A concentração de proteínas do extrato foi determinada pelo método Lowry.

Immunoblotting

Após digestão de um filtrado de cultura de *B. pseudomallei* com solução contendo dodecil sulfato de sódio e β -mercaptoetanol, essa amostra foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. A seguir, foi realizada transferência eletroforética das proteínas para membranas de nitrocelulose. Posteriormente, as membranas foram cortadas a tiras e os sítios não cobertos pelas proteínas foram bloqueados por incubação das tiras solução de tris-leite desnatado 5% durante 2 h a temperatura ambiente. A seguir, as tiras foram incubadas com amostras de soros diluídas a 1:100 da mesma solução de bloqueio e deixadas por 16 h a temperatura ambiente sob agitação. Após lavagens com tris-tween 20 0,1%, as tiras foram incubadas por 1h30min a temperatura ambiente com conjugados imunoenzimáticos anti-IgM e anti-IgG humanos marcados com fosfatase alcalina e diluídos a 1:1000 em solução contendo tris-leite desnatado 1%-tween 20 0,1% (Sigma, USA). Após novas lavagens, procedeu-se à etapa de revelação da tonalidade por incubação com solução de tris-HCl 0,1M, pH 9,5, contendo nitroblue tetrazolium- bromo-cloro-indolil-fosfato a 1 mg/ml (Bio-Rad, USA). Para detecção das subclasses, as tiras de nitrocelulose foram incubadas com amostras de soro diluído a 1:100 em tris-leite desnatado 1%- tween 20 0,1% durante 16 h a temperatura ambiente. Após lavagens, as tiras foram incubadas com anticorpos monoclonais IgG1 humana (clone HP 6012), IgG2 humana (clone HP 6002), IgG3 humana (clone HP 6050), IgG4 humana (clone HP 6101) (CDC, Georgia, USA). Após incubação por 1h a temperatura ambiente e novas lavagens, as tiras foram incubadas com conjugado anti- IgG de camundongo marcado com fosfatase alcalina (Sigma, USA) na diluição de 1:1000 na solução diluente. As tiras foram lavadas e a coloração foi revelada conforme procedimento mencionado anteriormente.

3.2.9 Análise Estatística

Os dados epidemiológicos e laboratoriais coletados foram analisados por meio dos “pacotes” estatísticos Epi Info 2000, versão 3.3, e pelo STATA (Stata Statistical Software - Release 5.0 College Station, 1997).

4 RESULTADOS

Parte 1 - Estudo Ambiental

4.1 Estudo Laboratorial

4.1.1 Isolamento de Cepas Suspeitas de *B. pseudomallei*

As colônias isoladas em meios Ashdown e BPSA que apresentaram teste de oxidase positivo e resistência à colistina foram consideradas suspeitas de serem *B. pseudomallei* (Figura 12). Essa triagem demonstrou que 30,5% (183/600) das amostras coletadas tiveram isolamento de colônias consideradas suspeitas.

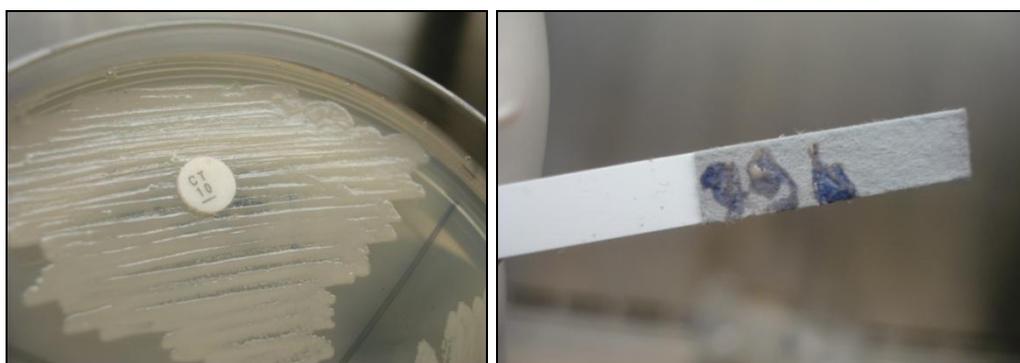


Figura 11. Teste de oxidase e colônias resistentes a colistina

Diferentes morfologias foram observadas entre estas colônias. Algumas apresentaram morfologia enrugada, enquanto outras eram lisas. A coloração das colônias foi variável, mas geralmente apresentavam coloração rósea no meio BPSA e roxa no meio Ashdown.

Ainda durante essa etapa de triagem, algumas colônias se destacaram pela morfologia característica de *B. pseudomallei*. Essas colônias apresentaram aspecto enrugado que assumiram diferentes formas. Foi também observada a presença de colônias com dois tons que tinham distinção melhor no meio BPSA. Nessas placas o caráter enrugado foi observado com 48 horas de incubação e aumentavam com o decorrer dos dias. O aspecto rugoso não foi restrito a nenhum dos meios seletivos. A figura 13 ilustra as colônias com morfologia típica de *B. pseudomallei* que conduzia a elevado grau de suspeição. Posteriormente todas foram confirmadas pelo sistema API20NE.

Foram ainda observadas colônias de coloração amarela em diversos meses. Um tipo de colônias chamou a atenção durante a observação das placas. Seis placas, em mês único, apresentaram colônias pretas e brilhantes.

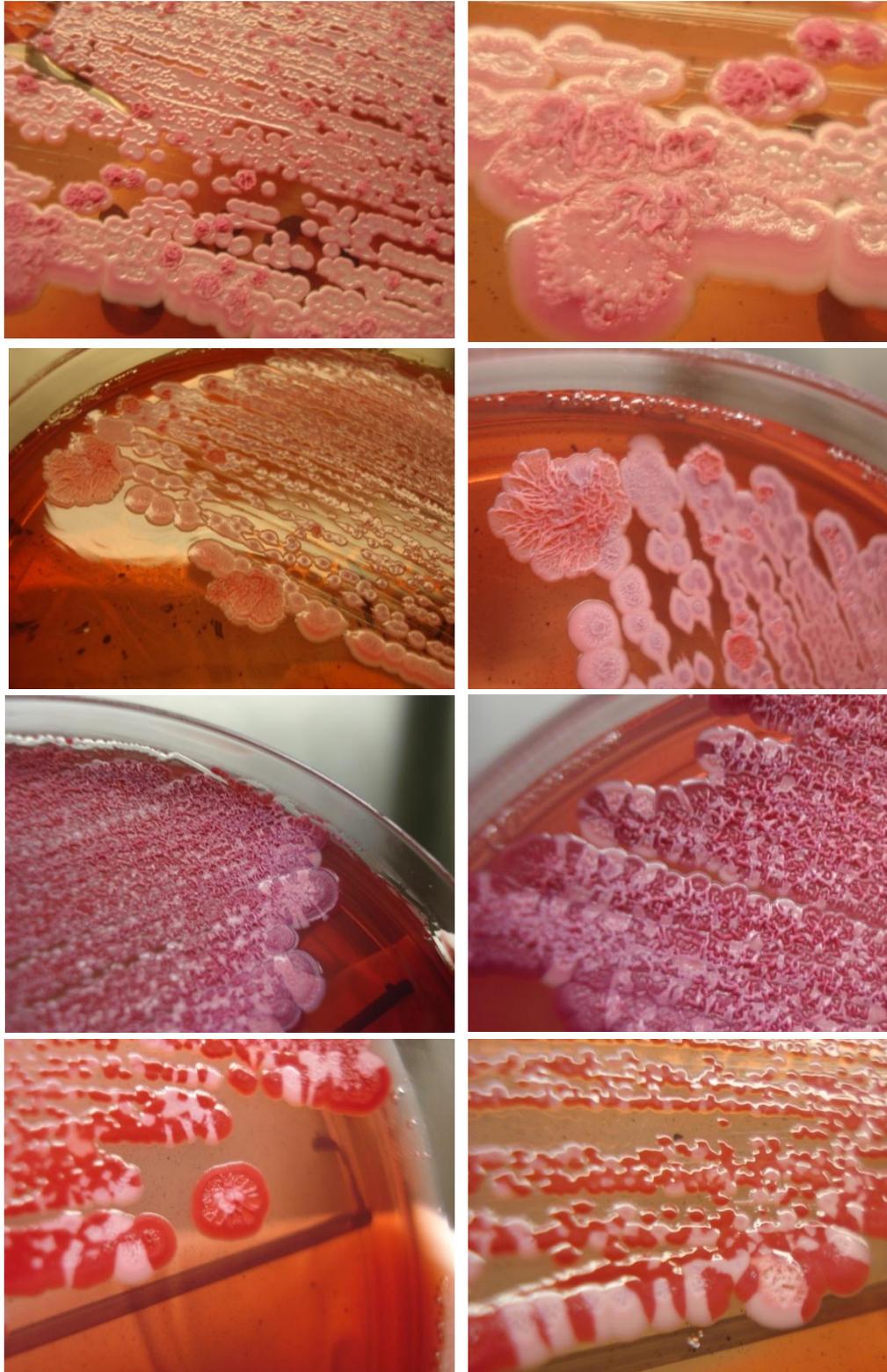


Figura 12. Morfologia das colônias de *B. pseudomallei* em meios seletivos

4.1.2 Identificação de *B. pseudomallei* pelo Sistema de Identificação API20NE

A identificação por intermédio do painel API20NE foi realizada em 183 cepas consideradas suspeitas pela triagem inicial (Tabela 1). Dessas, 26 cepas (14,2%) foram identificadas como *B. pseudomallei*. Outra bactéria do gênero *Burkholderia*, a *B. cepacea*, com 28 (15,3%) cepas identificadas.

Tabela 1 - Resultado do Sistema de Identificação API20NE do estudo ambiental nos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, CE

API20NE	Tejuçuoca	Banabuiú	Total e %
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	20	06	26 (14,2)
<i>Burkholderia cepacea</i>	14	14	28 (15,3)
Outras	27	20	47 (25,7)
Não Identificadas	50	32	82 (44,8)
Total de Cepas Investigadas	111 (58,7%)	72 (41,3%)	183 (100)

Outras 47 cepas foram identificadas entre diversas espécies e entre essas as mais prevalentes foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Ochrobactrum anthropi*, *Wautersia paucula* e *Pseudomonas fluorescens* (Tabela 2) A lista completa de identificação das outras espécies que não do gênero *Burkholderia* encontra-se na tabela 2. Embora somente uma cepa de *Cromhobacterium violaceum* tenha sido identificada pelo API20NE, outras 6 placas apresentaram morfologia idêntica com colônias pretas. O restante das cepas suspeitas (82) não foi identificado pelo painel API20NE, cujo resultado foi considerado como inaceitável pelo programa utilizado.

Embora o teste permitisse alto grau de suspeição em todas as amostras na 1ª leitura após 24 horas de incubação, foram necessárias 48 horas para que algumas reações fundamentais ocorressem e a completa identificação fosse realizada. A Figura 14 ilustra as reações dos testes evidenciadas na identificação de *B. pseudomallei*. Alguns testes apresentaram viragens de tonalidade dos testes diferentes como a *P. aeruginosa* e o *C. violaceum*.

Tabela 2 - Bactérias identificadas pelo Sistema de Identificação API20NE do estudo ambiental nos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, CE

Cepas Identificadas	Tejuçuoca	Banabuiú	TOTAL
<i>P. aeruginosa</i>	8	6	14
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	4	4	8
<i>Wautersia paucula</i>	3	3	6
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1	3	4
<i>Sphingomonas paucimob</i>	1	-	1
<i>Achromobacter xyloso</i>	2	1	3
<i>Chormobacterium violaceum</i>	1	-	1
<i>Photobacterium danselae</i>	2	-	2
<i>Brevundimonas meningos</i>	-	1	1
<i>Oligella ureolytica</i>	-	1	1
<i>Sphingobacterium multiv</i>	-	1	1
<i>Mannheimia haemolytica/ P. trehalosi</i>	1	-	1
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	1	-	1
<i>Chryseobacterium meningosepticu</i>	1	-	1
<i>Comamoma testoteroni/P. alcaligenes</i>	1	-	1
<i>Rizhobium radiobacter</i>	1	-	1
TOTAL	27	20	47

O percentual do perfil numérico de identificação de *B. pseudomallei* pelo painel API20NE foi variável. Oito perfis numéricos foram identificados e os mais comuns foram 1356577 (9 cepas) e 1756577 (7 cepas). A percentagem de identificação entre 98,4 a 99,9% de *Burkholderia pseudomallei* ocorreu em 20 cepas (76,9%). Somente uma cepa apresentou identificação inferior a 80% (Tabela 3).

Tabela 3 - Perfil de Identificação de *B. pseudomallei* pelo Sistema de Identificação API20NE do estudo ambiental nos municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, CE

Perfil Numérico	Identificação Bacteriana	Percentagem da Identificação	Número de cepas
1356577	<i>B. pseudomallei</i>	98,4	9
1756577	<i>B. pseudomallei</i>	98,4	7
1156577	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	2
1156576	<i>B. pseudomallei</i>	99,9	1
1556577	<i>B. pseudomallei</i>	99,8	1
1352577	<i>B. pseudomallei</i>	82,8	4
1056577	<i>B. pseudomallei</i>	81,7	1
1346577	<i>B. pseudomallei</i>	58,8	1
Total			26



Figura 13. Identificação de *B. pseudomallei* pelo API20NE



Figura 14. Identificação de cepas de *P. aeruginosa* e *C. violaceum* pelo API20NE

4.2 Estudo ambiental

No estudo de campo ambiental, as amostras foram coletadas nos 5 sítios respectivos nos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, assim codificadas: amostras de Tejuçuoca (1T, 2T, 3T, 4T, 5T) e amostras de Banabuiú (1B, 2B, 3B, 4B, 5B). Foram isoladas *B. pseudomallei* em 4,3% (26) das 600 amostras coletadas nos dois municípios. A tabela 4 mostra o resumo completo do estudo.

Tabela 4 - Pesquisa de *B. pseudomallei* em solo dos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, CE.

Amostras	<i>B. pseudomallei</i>		Total isoladas
	Banabuiú (300)	Tejuçuoca (300)	
SÍTIO 1	1B	1T	3
Superfície	02	-	
10 cm	-	-	
20 cm	-	01	
30 cm	-	-	
40 cm	-	-	
SÍTIO 2	2B	2T	1
Superfície	01	-	
10 cm	-	-	
20 cm	-	-	
30 cm	-	-	
40 cm	-	-	
SÍTIO 3	3B	3T	15
Superfície	-	02	
10 cm	-	02	
20 cm	-	04	
30 cm	-	03	
40 cm	-	04	
SÍTIO 4	4B	4T	5
Superfície	-	-	
10 cm	-	01	
20 cm	01	-	
30 cm	01	01	
40 cm	01	-	
SÍTIO 5	5B	5T	2
Superfície	-	-	
10 cm	-	-	
20 cm	-	-	
30 cm	-	02	
40 cm	-	-	
Total	6	20	26

Inicialmente serão descritos os principais aspectos relacionados ao isolamento da *B. pseudomallei* nos dois locais investigados - sítio, profundidade e relação com pluviometria - para em seguida se descrever os achados em cada município, isoladamente.

Sítios de isolamento

Os sítios 3 e 4 apresentaram 76,9% (20/26) das cepas de *B. pseudomallei* isoladas no estudo. O sítio 4 (área de alagamento em período chuvoso) apresentou isolamento nos dois municípios (4B e 4T). O sítio 3 (rio) somente mostrou isolamento em Tejuçuoca (3T) e apresentou o maior número de cepas isoladas do estudo, com 57,6% (15/26). (Tabela 5).

Os outros sítios evidenciaram isolamentos esporádicos da bactéria: o sítio 1 (quintal da casa); o sítio 2 (sombra de árvore) e o sítio 5 (criação de animais). O sítio 1 apresentou isolamento de 11,5% (3/26) nos dois municípios (1B e 1T). O sítio 2 exibiu isolamento em Banabuiú (2B), com uma cepa isolada, que corresponde a 3,4% (1/26). O sítio 5 evidenciou 7,7% (2/26) em Tejuçuoca (5T). (Tabela 5).

Tabela 5 - Sítios de isolamento de *B. pseudomallei* no estudo ambiental realizado nos Municípios de Banabuiú e Tejuçuoca, CE

Sítios de coleta	<i>Burkholderia pseudomallei</i>		Total
	Banabuiú (300)	Tejuçuoca (300)	
SÍTIO 1	2	1	3
SÍTIO 2	1	-	1
SÍTIO 3	-	15	15
SÍTIO 4	3	2	5
SÍTIO 5	-	2	2
Total	06	20	26

Profundidade de isolamento

O isolamento das cepas de *B. pseudomallei* variou da superfície até profundidade de 40cm nos diferentes sítios de coleta dos dois municípios. A seguinte distribuição foi observada: 19,2% (5/26) em superfície; 11,5% (3/26) a 10 cm; 23% (6/26) a 20 cm; 26,9% (7/26) a 30cm e 19,2% (5/26) a 40cm (Tabela 6). O intervalo de 20 a 40 cm de profundidade apresentou 65,3% (17/26) do total de cepas de isoladas.

Tabela 6 - Profundidade de isolamento de *B. pseudomallei* no estudo ambiental realizado nos Municípios de Banabuiú e Tejuçuoca, CE.

Profundidade da coleta	<i>Burkholderia pseudomallei</i>		Total
	Banabuiú (300)	Tejuçuoca (300)	
Superfície	3	2	5
10 cm	-	3	3
20 cm	1	5	6
30 cm	1	6	7
40 cm	1	4	5
Total	6	20	26

Isolamento e relação com índice pluviométrico

Durante o ano de 2007, quando o estudo foi realizado, as chuvas ocorreram entre os meses de janeiro a junho, considerado o período de estação chuvosa ou quadra invernal.

No período compreendido entre os meses de julho a dezembro, não houve registro de precipitação chuvosa nos dois municípios. O isolamento foi realizado em ambos os períodos no estudo ambiental. No período sem chuvas, houve isolamento de 53,7% (14/26) das cepas isoladas. A distribuição mensal dos isolados de *B. pseudomallei* e a relação com o índice pluviométrico no estudo ambiental em cada município são mostradas nas figuras 16 e 17.

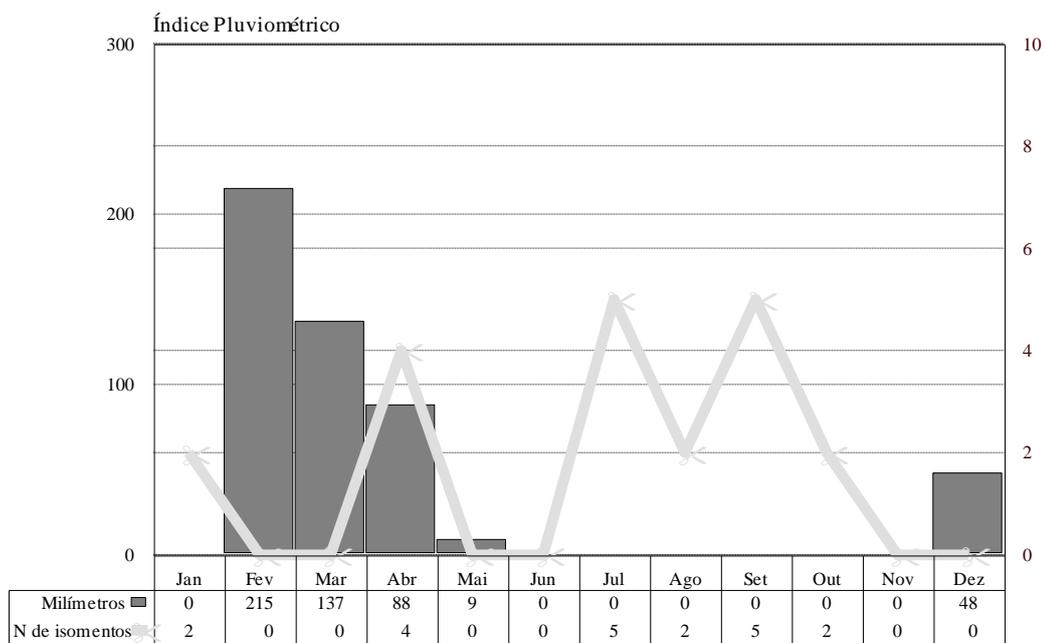


Figura 15. Isolamento de *B. pseudomallei* e relação com pluviometria em Banabuiú, 2007.

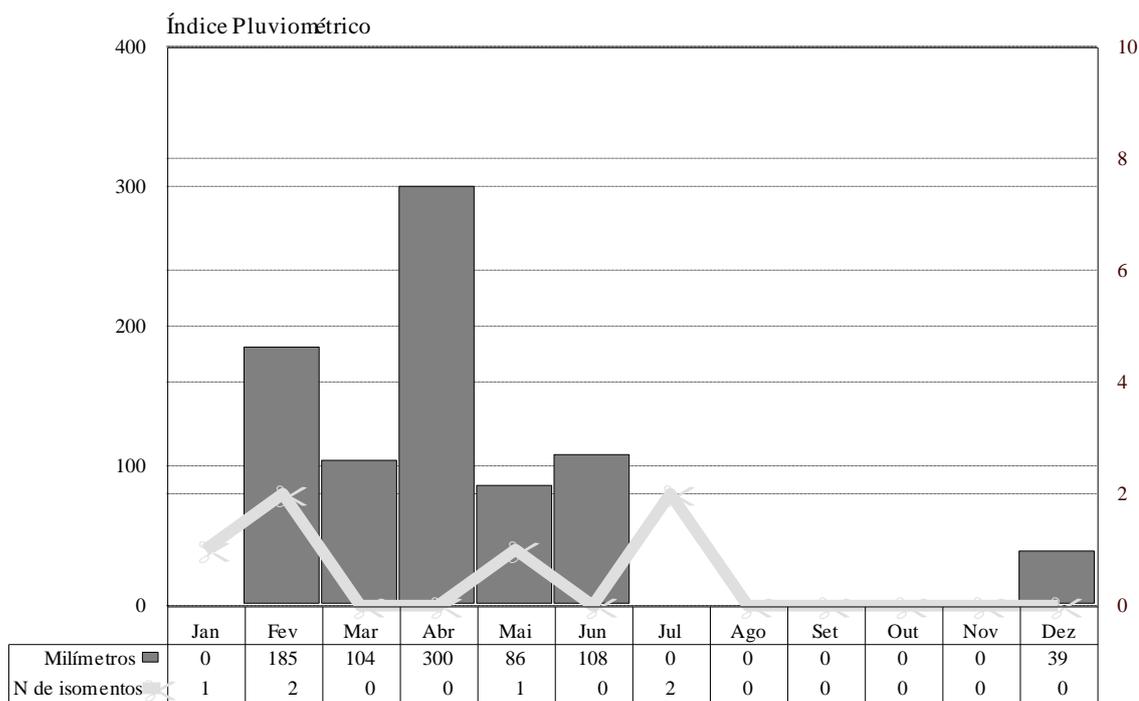


Figura 16. Isolamento de *B.pseudomallei* e relação com pluviometria em Banabuiú, 2007.

Estudo de campo em Tejuçuoca

A pesquisa no Município de Tejuçuoca mostrou isolamento de 76,9% (20/26) cepas de *B. pseudomallei*. Quatro sítios mostraram positividade (1T, 3T, 4T e 5T). A distribuição dos isolados entre esses sítios foram: 75% (15/20) no sítio 3T; 10% (2/20) no sítio 4T; 10% (2/20) no 5T; e 5% (1/20) no sítio 1T. O isolamento ocorreu em todas as profundidades, assim distribuídos: 10% (2/20) em superfície; 15% (3/20) a 10 cm; 25% (5/20) a 20 cm; 30% (6/20) a 30cm e 20% (4/20) a 40cm. O intervalo de 20 a 40cm foi responsável por 75% (15/20) dos isolados da bactéria. Embora o isolamento tenha ocorrido em seis diferentes meses, 70% (14/20) ocorreram no período sem chuvas, que compreendeu os meses de julho a dezembro (Figura 16). Nesse entretempo, somente em novembro e dezembro não foi recuperada a bactéria em solo. Durante a quadra chuvosa, o isolamento ocorreu nos meses de janeiro e abril. Além do isolamento de *B. pseudomallei*, houve isolamento de *Chomobacterium violaceum* no mês de maio em três sítios e em diferentes níveis de profundidade.

Estudo de campo em Banabuiú

A pesquisa no Município de Banabuiú mostrou isolamento de 23,1% (6/26) cepas de *Burkholderia pseudomallei*. Três sítios mostraram positividade (1B, 2B e 4B). A

distribuição dos isolados entre esses sítios foi a seguinte: 60% (3/6) no sítio 4B; 30,3% (2/6) no sítio 1B e 10,6% (1/6) no sítio 2B. Metade do isolamento ocorreu na superfície em 50% (3/6). No intervalo de 20 a 40cm de profundidade ocorreu a outra metade do isolamento, sendo 1cepa em cada intervalo de 10 cm. Todos os isolamentos ocorreram durante a quadra chuvosa, que compreende os meses de janeiro a junho (Figura 17). Nesse período, somente nos meses de fevereiro e maio não foi recuperada a bactéria em solo.

4.3 Dados meteorológicos e componentes ambientais

As informações sobre pluviometria foram referentes ao ano de coleta do estudo ambiental, ou seja, 2007. Assim, a média anual de temperatura em ambos os municípios permaneceu entre 26-28°C. Já a pluviosidade anual em Tejuçuoca foi 497 mm e em Banabuiú foi 822 mm (IPECE; FUNCEME, 2008). Em Tejuçuoca e Banabuiú existem diferentes tipos de solo: brunos-não-cálcicos, planossólicos solódicos, podzólicos vermelho-amarelos e litólicos. Em Banabuiú, entretanto, além destes, há ainda os solos aluviais e cambissolos (FUNCEME, 2008; IPECE, 2007). Especificamente nas áreas de estudo, os solos são classificados como litólicos (EMBRAPA, 1973). A vegetação característica em ambos os municípios é a caatinga, uma mata de plantas xerófilas que pode ainda ser dividida, nas duas regiões, em caatinga arbustiva aberta e caatinga arbustiva fechada (IPECE, 2007; IBGE, 2008).

Parte 2 - Inquérito Soroepidemiológico

4.4 Inquérito Soroepidemiológico

4.4.1 Padronização do Teste Sorológico

O teste de imunodifusão radial dupla apresentou resultado positivo com os antígenos produzidos pelos dois protocolos. Manifestou, entretanto, reação positiva somente com amostras de soro que tinham exibido titulação elevada em teste anterior realizado em laboratório de referência. Entre os dois protocolos, a metodologia utilizada no laboratório australiano PathWast apresentou melhor resultado por indicar positividade com antígeno puro e diluído. O ensaio imunoenzimático mostrou resultado superior ao teste de imunodifusão radial dupla por apresentar positividade com os soros de variadas titulações testados previamente em laboratório de referência. Dessa forma, o ensaio imunoenzimático foi selecionado e padronizado para a realização do estudo sorológico.

4.4.2 População do Estudo

O estudo foi realizado em 321 indivíduos sadios, residentes em uma das duas áreas rurais pesquisadas. A população de Tejuçuoca contribuiu com 67,7% da casuística, enquanto Banabuiú concorreu com 32,3% da casuística.

Cento cinquenta e nove dos entrevistados, ou seja, 50,1%, eram do sexo masculino, sendo que a idade variou de 2 a 93 anos (mediana de 24 anos em Tejuçuoca e de 31 anos em Banabuiú). As ocupações mais frequentes foram agricultores, donas de casa e estudantes. O resultado das principais variáveis pesquisadas encontra-se no apêndice II .

4.4.3 Títulos de Anticorpos anti *B. pseudomallei*

A soroprevalência geral (títulos dos isotipos e IgM e/ou IgG) contra *B. pseudomallei* foi de 80,76%, considerando ambos os títulos de anticorpos conjuntamente. A positividade para o isotipo IgM foi de 51,27 % (161/317) e para o isotipo IgG, de 58,49 % (186/317). As titulações de anticorpos estão mostrados no quadro 2.

Conforme mostra a figura 18, observa-se um decréscimo de IgM anti- *B. pseudomallei* no decorrer da idade, sendo o inverso observado para IgG, cujos títulos elevam-se com o aumento da faixa etária.

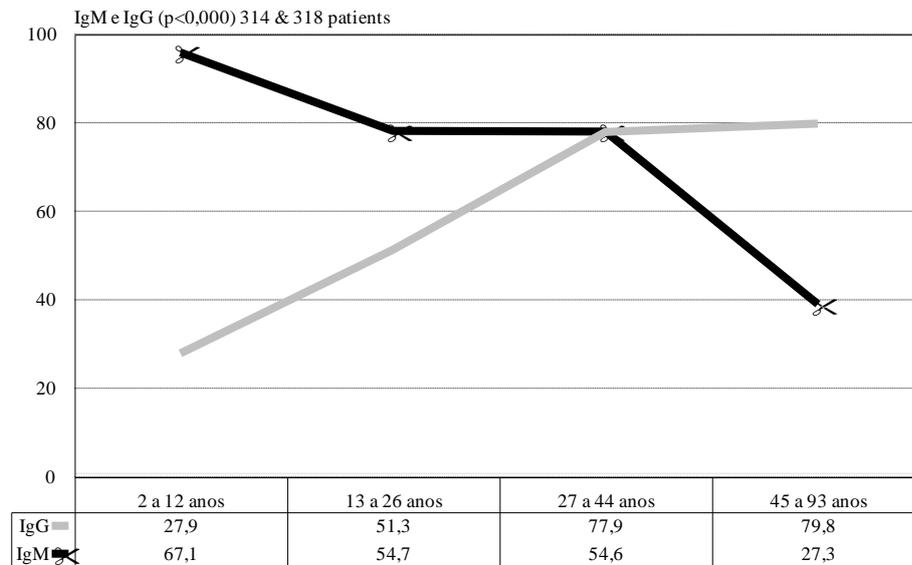


Figura 17. Soropositividade para IgG e IgM anti- *B. pseudomallei*, de acordo com a faixa etária.

A tabela 7 apresenta associação entre a frequência de positividade para os anticorpos anti-*B. pseudomallei* e atividades de ocupação. Foi verificada associação significativa entre agricultura e títulos de IgM (44,15%, $p=0,002$) e títulos de IgG (69,11%, $p=0,000$). Outras ocupações que mostraram associação significativa foram de trabalhadores em construção civil, com títulos de IgG de 84,62% (84,62%, $p=0,005$) e lavagem de roupas com títulos de IgG de 66,2% (66,2% $p=0,012$).

Tabela 7- Frequência de positividade para os anticorpos anti-*B. pseudomallei* e atividades de ocupação.

Exposição	IgG		IgM		IgG e/ou IgM	
	Posit. (%)	Valor p	Posit. (%)	Valor p	Posit. (%)	Valor P
Atividade						
Agricultura	69,11	0,000*	44,15	0,002*	82,72	0,274
Lavagem de roupa	66,21	0,012*	54,61	0,309	84,72	0,124
Construção civil	84,62	0,005*	34,62	0,073		

*Valores considerados estatisticamente significantes

Pessoas	IgM	IgG
1	1/400	1/100
2	1/200	1/100
3	1/100	1/100
4	1/100	1/400
5	1/100	NEG
6	1/200	1/200
7	1/100	1/200
8	1/100	1/200
9	1/100	1/400
10	1/200	1/200
11	1/200	1/200
12	1/200	NEG
13	1/400	1/800
14	1/200	NEG
15	1/100	1/400
16	1/200	1/100
17	NEG	1/400
18	1/200	1/1600
19	1/100*	1/200
20	1/200	1/100
21	1/200	1/200
22	1/200	1/800
23	1/200	1/400
24	1/200	NEG
25	1/200	1/200
26	NEG*	1/100
27	-	-
28	NEG	NEG
29	1/200	1/200

Pessoas	IgM	IgG
30	1/100	NEG
31	1/100	1/100
32	1/200	1/1600
33	1/100	1/200
34	1/100	1/200
35	NEG	1/100
36	1/100	1/100
37	1/200	1/200
38	1/100	1/800
39	1/400	NEG
40	1/400	1/100
41	1/200	1/100
42	1/200	1/100
43	1/400	1/200
44	1/100	1/100
45	1/200	1/100
46	1/100	1/400
47	1/200	1/800
48	1/800	1/400
49	1/200	1/400
50	NEG	1/800
51	1/400	1/100
52	1/400	1/100
53	1/200	1/400
54	1/400	NEG
55	1/400	1/800
56	1/400	1/200
57	1/100	1/400
58	NEG	1/200

Pessoas	IgM	IgG
59	1/200	1/800
60	1/100	1/200
61	1/100	NEG
62	1/400	1/800
63	1/400	1/200
64	1/200	NEG
65	1/100	1/400
66	1/200	1/100
67	1/100	1/100
68	1/100	1/200
69	1/100	1/200
70	1/100	1/400
71	1/200	NEG
72	1/200	1/200
73	-	-
74	1/200	1/100
75	1/200	1/400
76	1/200	NEG
77	1/200	1/100
78	1/400	NEG
79	1/100	1/800
80	1/100	1/200
81	NEG	NEG
82	1/400*	NEG
83	1/200	1/100
84	NEG	1/100
85	1/200	1/100
86	1/200	1/200
87	1/100	NEG

Pessoas	IgM	IgG
88	1/200	1/200
89*	-	-
90	NEG	1/400
91	1/200	1/100
92	1/100*	1/100
93	1/200	1/400
94	1/400	NEG
95	1/200	1/400
96	NEG	1/200
97	NEG	1/400
98	1/100	1/200
99	1/100	1/200
100	1/100	1/200
101	1/100	1/200
102	NEG	1/400
103	1/100	1/400
104	1/100	1/400
105	NEG	1/400
106	1/100	1/800
107	1/100	1/400
108	1/100	1/100
109	1/100	1/200
110	1/100	1/800
111	1/100	1/800
112	1/200	1/100
113	1/200	1/100
114	1/200	1/800
115	1/400	NEG
116	1/400	NEG

Pessoas	IgM	IgG
117	1/200	1/800
118	1/100	1/800
119	1/100	1/200
120	1/400	1/400
121	NEG	1/400
122	1/100	1/100
123	1/200	1/200
124	1/200	1/400
125	-	1/100
126	1/200	1/800
127	1/200	1/200
128	1/200	1/400
129	NEG	1/400
130	1/400	1/400
131	1/200	1/400
132	1/400	1/100
133	NEG	1/400
134	1/200	1/200
135	1/400	1/200
136	1/200	1/100
137	1/200	NEG
138	1/200	1/100
139	NEG	1/400
140	1/400	1/100
141	1/200	1/200
142	1/400	NEG
143	NEG	1/400
144	1/200	1/400
145	1/400	1/100

Pessoas	IgM	IgG
146	1/200	1/200
147	1/100	1/100
148	1/100	1/200
149	1/400	1/100
150	1/200	1/100
151	1/100	1/100
152	NEG	1/200
153	1/100	1/200
154	NEG	1/100
155	NEG	1/200
156	NEG	1/200
157	1/200	1/100
158	1/100	NEG
159	1/400	1/200
160	1/200	1/400
161	1/100	1/200
162	1/200	1/100
163	1/100	1/200
164	NEG	1/100
165	1/200	1/200
166	1/200	1/400
167	1/100	1/400
168	1/200	NEG
169	1/200	1/100
170	1/100	1/100
171	1/100	1/400
172	1/200	1/400
173	NEG	1/800
174	1/100	NEG

Pessoas	IgM	IgG
175	-	-
176	1/100	1/100
177	1/200	1/400
178	1/200	1/400
179	1/100	1/100
180	NEG	1/100
181	1/100	1/800
182	1/200	1/800
183	1/200	1/200
184	1/200	1/200
185	1/200	1/800
186	NEG	1/800
187	1/100	1/200
188	1/200	1/100
189	1/200	1/800
190	1/100	1/400
191	NEG	1/800
192	1/100	1/100
193	1/400	1/200
194	1/100	NEG
195	1/100	NEG
196	1/400	1/400
197	1/100	1/100
198	1/400	1/100
199	1/400	1/100
200	NEG	1/200
201	1/200	1/400
202	1/100	NEG
203	1/200	1/400

Pessoas	IgM	IgG
204	1/200	NEG
205	1/200	NEG
206	1/100	1/100
207	1/200	1/100
208	1/400	1/100
209	1/200	NEG
210	1/200	1/200
211	1/200	1/400
212	1/400	NEG
213	1/400	1/400
214	1/100	1/400
215	1/200	1/200
216	1/200	1/400
217	1/400	1/100
218	1/800	1/200
219	1/200	1/200

Pessoas	IgM	IgG
1	1/100	1/200
2	1/100	1/100
3	1/100	1/800
4	NEG	NEG
5	1/400	NEG
6	1/400	1/100
7	NEG	1/400
8	-	-
9	1/100	1/200
10	1/200	1/200
11	NEG	1/100
12	NEG	1/200
13	1/100	1/100
14	1/100	1/200
15	1/100	1/200
16	1/100	NEG
17	1/200	1/400
18	1/400	1/100
19	1/100	1/800
20	1/100	1/400
21	1/200	1/400
22	1/100	1/200
23	1/200	1/800
24	1/100	1/400
25	1/400	1/200
26	NEG	1/400
27	NEG	NEG
28	1/400	1/100
29	1/200	1/100
30	1/100	1/400
31	1/400	1/200
32	1/100	1/800
33	1/100	NEG

Pessoas	IgM	IgG
34	1/400	NEG
35	1/100*	1/200
36	NEG	NEG
37	NEG	1/400
38	NEG	1/200
39	1/200	1/800
40	1/200	1/200
41	1/800	1/400
42	1/200	NEG
43	1/100	1/200
44	1/100	1/800
45	NEG	1/400
46	1/100	1/100
47	1/100	NEG
48	1/100	1/100
49	1/200	1/200
50	1/200	1/200
51	1/400	1/100
52	1/100	1/200
53	1/100	1/400
54	1/200	1/200
55	1/800	1/100
56	NEG	1/400
57	1/400	1/200
58	1/100	NEG
59	1/100	1/100
60	1/200	1/200
61	1/200	1/400
62	1/100 NEG	1/200
63	NEG	1/400
64	NEG	NEG
65	1/200	NEG
66	1/100	NEG

Pessoas	IgM	IgG
67	NEG	1/100
68	1/100	NEG
69	1/400	1/400
70	1/400	1/200
71	1/100	1/100
72	1/200	1/100
73	NEG	1/400
74	-	1/400
75	1/200	1/200
76	1/100	1/200
77	1/100	1/1600
78	1/400	1/100
79	1/400	NEG
80	1/100	NEG
81	1/200	1/100
82	1/400	NEG
83	1/100	1/100
84	NEG	1/100
85	1/200	1/800
86	1/200	1/400
87	1/100	1/400
88	NEG	1/100
89	1/100	NEG
90	1/400	1/100
91	1/200	1/200
92	NEG	1/400
93	1/100	NEG
94	1/200	1/800
95	1/100	1/400
96	1/100	1/100
97	NEG	1/800
98	1/100	1/100
99	1/200	1/200

Pessoas	IgM	IgG
100	1/400	1/200
101	1/200	1/200
102	-	1/200
103	NEG	NEG
104	1/100	1/100

4.4.4 Caracterização do Antígeno

Análise do Filtrado de Cultura de *B. pseudomallei* por Eletroforese em Gel de Poliacrilamida

Dois preparados obtidos por filtração de cultura de *B. pseudomallei*, conforme descritos no item 3.4.1, foram submetidos à análise por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (Fig. 19). O antígeno bruto exibiu padrão típico de lipopolissacarídeo (LPS), quando o gel foi corado com nitrato de prata específico para LPS (linhas 1 e 2). O gel corado com reagente *coomassie blue* (tiras 3 e 4) apresentou duas bandas de proteínas, uma na posição 38kDa e outra na posição 21,4 kDa.

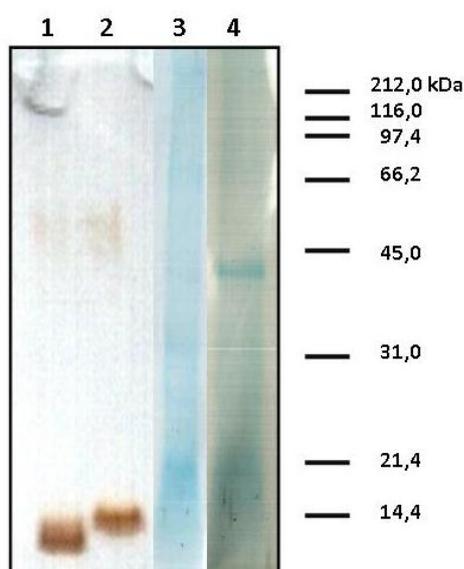


Figura 18. Eletroforese em gel de poliacrilamida de dois preparados obtidos por filtração de *B. pseudomallei*. As tiras 1 e 2 mostram detecção de LPS específico após coloração do gel com nitrato de prata. As tiras 3 e 4 mostram detecção de proteínas após coloração com reagente *coomassie blue*.

4.4.5 Reconhecimento Antigênico de Filtrado de Cultura de *B. pseudomallei*

O reconhecimento antigênico de filtrado de cultura de *B. pseudomallei* foi feito por análise sob *immunoblotting*. Para tanto, foram testadas amostras com títulos baixos (1:100 ou 1:200) (Fig. 20) e amostras com títulos elevados de anticorpos IgG (1:800) e valores variáveis de anticorpos IgM (Fig. 21). Nenhuma relação foi encontrada entre títulos de anticorpos e positividade na análise por *immunoblotting*.

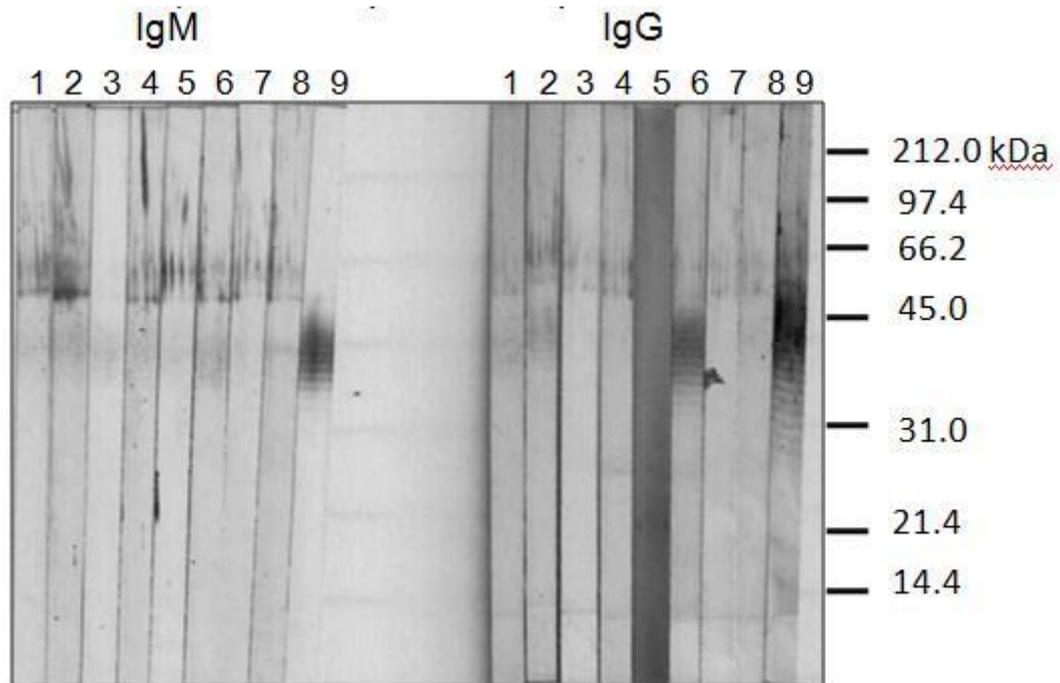


Figura 19. Análise de amostras de soro de indivíduos residentes em Banabuiú com títulos baixos de anticorpos IgG e de IgM anti-*B. pseudomallei*. A tira 9 representa um controle positivo para IgG e IgM anti-*B. pseudomallei*.

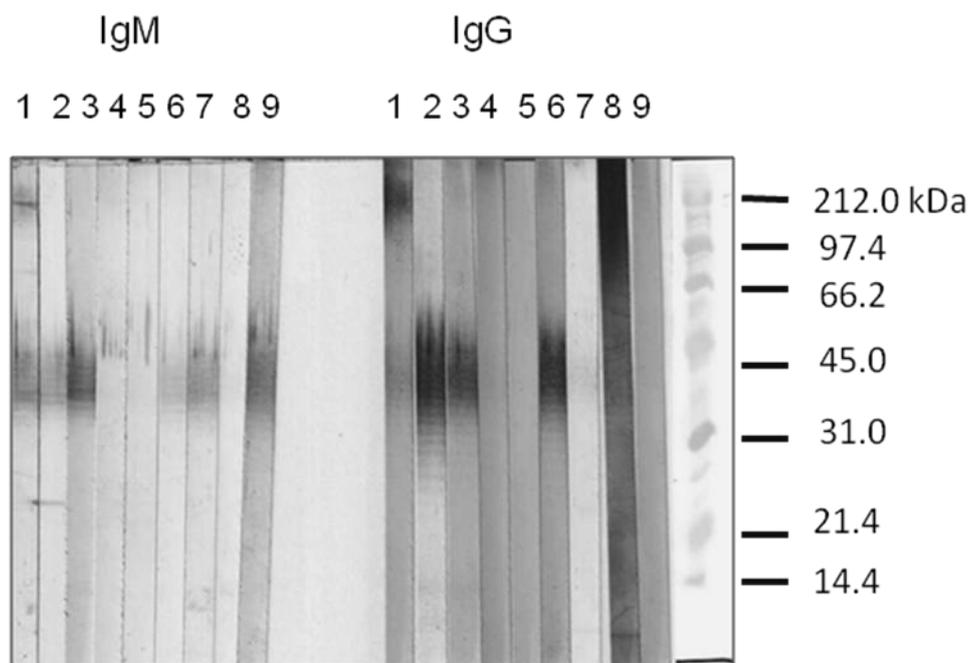


Figura 20. Análise de amostras de soro de indivíduos residentes em Tejuçoca com títulos elevados de anticorpos IgG e valores variáveis de IgM anti-*B. pseudomallei*.

Análise de bandas imuno-reativas mostrou reconhecimento de bandas de antígeno na posição 45 kDa e na posição 200kDa. A maioria das amostras com títulos elevados mostrou reatividade para as bandas próximas a 45 kDa e somente uma amostra mostrou reatividade para ambas as bandas 45kDa e 200kDa. Em relação às amostras com títulos de anticorpos baixos (Fig. 20), nenhuma banda foi encontrada para detecção de IgM e somente uma amostra (tira 6) com títulos de IgG de 1:200 mostrou reatividade para 45 kDa. A tira 9 representa uma amostra de controle positivo.

Cinco amostras com títulos elevados de IgG foram testadas quanto às subclasses de IgG (Figura 21). Três amostras indicaram anticorpos que reconheciam bandas de antígenos na posição 45kDa e dois mostraram reatividade também para a banda 200 kDa. Os anticorpos detectados eram do isotipo IgG1 e/ou IgG2 (Figura 22). Nenhuma amostra apresentou IgG3 ou IgG4 (dados não mostrados).

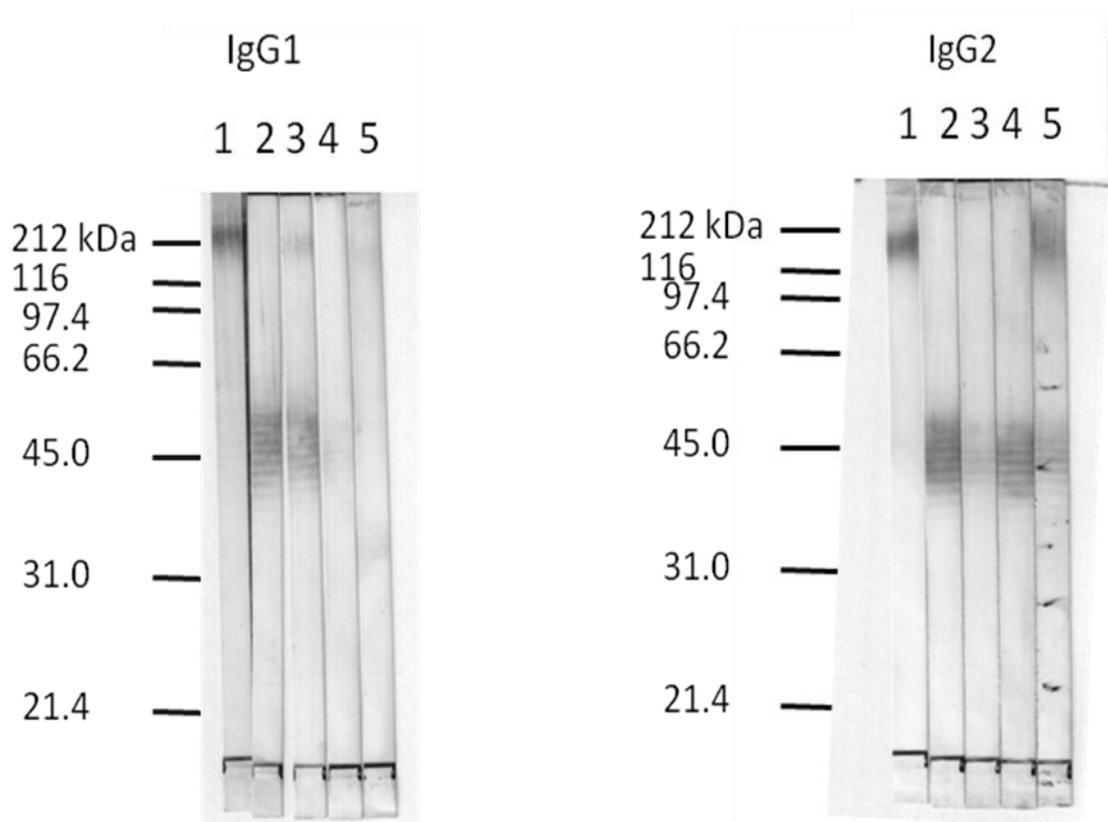


Figura 21. Detecção de subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 contra antígenos de *B. pseudomallei* obtidos por filtrado de cultura em indivíduos soropositivos por meio de *Immunoblotting*.

5 DISCUSSÃO

5.1 Parte 1 - Estudo Ambiental

O estudo mostrou que um número considerável de amostras de solo apresentou cepas suspeitas de serem *B. pseudomallei*. O sistema API20NE evidenciou 26 amostras com elevado percentual de identificação. Embora a identificação de 6 cepas tenha sido inferior a 90%, as colônias apresentaram morfologia característica de *B. pseudomallei*.

O sistema API20NE é utilizado para identificação em estudos nas regiões endêmicas e apresenta resultados variáveis. Ashdown (1979) relatou que a identificação de *B. pseudomallei* foi apropriada por esse sistema. Outro sistema do mesmo fabricante, o API20E, só identificou 50% das amostras da bactéria (THOMAS, 1983).

Estudo realizado entre os anos de 1986 e 1988 analisou 400 cepas de *B. pseudomallei* de origem na Tailândia, Cingapura, Inglaterra e Bangladesh. O resultado foi satisfatório, pois identificou 97,7% (390) das cepas no primeiro teste. Duas cepas foram identificadas como *Pseudomonas fluorescens* e *B. cepacea* no primeiro teste e outras não foram identificadas. A realização do segundo teste identificou 399 cepas da bactéria, somente uma erroneamente foi identificada como *Pseudomonas fluorescens* (DANCE, 1989). Os perfis numéricos mais comuns encontrados nesse estudo foram 1156577 e 1556577, diferindo desta pesquisa, que evidenciou os perfis 1356577 e 1756577 como os mais prevalentes. É interessante ressaltar ainda que, de forma semelhante ao experimento ambiental aqui realizado, o estudo feito por Dance evidenciou também diversos perfis numéricos (17). Outra semelhança foi relacionada ao tempo necessário para identificação para ser completada, que foi de 48 horas.

Posteriormente, Inglis (1998) relatou falsa identificação do sistema API20NE. Entre 50 cepas provenientes da Cingapura, 6 foram identificadas como outras espécies e 4 não foram identificadas. A espécie mais comumente encontrada foi *C. violaceum*. Um estudo comparou testes manuais, API20NE e API20E com sistemas automatizados Vitek 1 e Vitek 2 para a análise de 103 cepas de *B. pseudomallei*. Os sistemas API20NE e API20E apresentaram identificação de 98 e 99%, respectivamente. O Vitek 1 identificou 99% das cepas, mas o Vitek identificou somente 29% delas (LOWE; ENGLER; NORTON, 2002). Outro estudo avaliou o sistema Phoenix BD para a identificação da bactéria. Nenhuma cepa de *B. pseudomallei* foi identificada. Esse sistema identificou 34 cepas como *B. cepacea* e 12 de outras espécies. Nesse estudo, as cepas foram submetidas a API20NE, que conseguiu identificar quase todas, com exceção de 1, cuja identificação foi *C. violaceum* (KOH *et al.*, 2003).

Contrariamente, dois estudos demonstraram baixa identificação de *B. pseudomallei* pelo API20NE. Inglis (2005) identificou somente 37% (26) das 71 cepas analisadas no oeste da Austrália. Outro estudo evidenciou 0 a 60% de identificação correta da bactéria (GLASS; POPOVIC, 2005).

Novamente, outro estudo veio a demonstrar boa performance do API20NE. Dessa vez, foram testadas 800 amostras de *B. pseudomallei* e 127 outras espécies de *Burkholderia*. Foram identificadas corretamente 99% das amostras de *B. pseudomallei* (792/800). Oito espécies foram identificadas incorretamente como *C. violaceum* (4); *B. cepacea* (2) e *P. aeruginosa* (2). A repetição do teste mostrou o mesmo resultado. Para as outras espécies de *Burkholderia*, o resultado foi inferior. A *B. cepacea* foi identificada corretamente em 89% (17/19) das amostras. Duas foram identificadas erroneamente como *P. fluorescens*. A *B. mallei* apresentou 10 cepas identificadas erroneamente como *C. violaceum* (2); *P. aeruginosa* (1) e *P. alcaligenes* (1). A identificação de *B. thailandensis* foi insatisfatória, pois 98 espécies não foram identificadas. O sistema API20NE indicou que em 64%, essa espécie foi identificada como *B. cepacea* (63); em 32% como *B. pseudomallei* (31) e em 4% como *P. aeruginosa* (4) (AMORNCHAL *et al.*, 2007).

Observa-se que esses estudos mostraram resultados variáveis na identificação de *B. pseudomallei* pelo API20NE. Amornchal (2007) relata que a variação entre 37 a 99% pode decorrer da interpretação dos testes de assimilação que podem apresentar difícil leitura.

Neste trabalho, 45% das amostras submetidas ao API20NE apresentaram perfil inaceitável. Entre essas amostras não identificadas, 4 espécies mostraram possibilidade de serem *B. pseudomallei*. Ressalte-se, também, que 41,2% das amostras submetidas a esse sistema identificaram outras espécies. Entre essas, a espécie com maior número de identificação foi *B. cepacea*, com 37,3 % (28). As outras 47 espécies foram identificadas entre 16 espécies diferentes. As mais comuns foram *Pseudomonas aeruginosa*, *Ochrobactrum anthropi*, *Wautersia paucula* e *Pseudomonas fluorescens*. Os estudos mostram que o API20NE identificou *B. pseudomallei* como outras espécies. As mais relatadas foram: *C. violaceum*, *B. cepacea*, *P. aeruginosa* e *Pseudomonas fluorescens* (DANCE, 1989; INGLIS *et al.*, 1998; AMORNCHAL *et al.*, 2007). Embora, *C. violaceum* esteja entre elas, neste experimento, sua identificação não deixou dúvidas em virtude da pigmentação preta das colônias nos meios utilizados, demonstrando tratar-se de outra espécie diferente de *B. pseudomallei*.

Observe-se, portanto, a possibilidade de que outras espécies *B. pseudomallei* não terem sido identificadas ou possam ter sido identificadas erroneamente como outra espécie neste trabalho. É interessante notar que os estudos sobre a avaliação do API20NE são

realizados para cepas já confirmadas de serem *B. pseudomallei*. O sistema parece demonstrar resultados satisfatórios quando a identificação ocorre para cepas previamente confirmadas. Esse fato reforça a idéia que a identificação das 26 cepas foi correta, uma vez que morfologia das colônias encontradas foi característica da bactéria, o que permitia elevado grau de suspeição, necessitando somente de teste confirmatório. Por outro lado, este estudo foi realizado para identificação de cepas não analisadas por outro método de identificação. Nessa circunstância, o API20NE pode não ser satisfatório. Os achados de falsa identificação com outras bactérias e de perfis inaceitáveis já relatados também reforça a noção de que o API20NE pode não ter mostrado boa performance nesta pesquisa para detectar todas as cepas de *B. pseudomallei*.

Outra consideração relativa a esse sistema é que, em sua maioria, os estudos de avaliação do API20NE foram realizados em cepas de *B. pseudomallei* de origem clínica. Esta investigação foi realizada em amostras ambientais de solo. Amorncal (2007) apontou que a razão para as diferenças na avaliação dos resultados do API20NE relatadas nos estudos findos possa ser devido a diferenças fenotípicas entre isolados clínicos e ambientais.

Assim, o achado de 26 cepas de *B. pseudomallei* pelo API20NE foi relevante neste estudo, no entanto, as considerações feitas há pouco demonstram que estudos adicionais moleculares são fundamentais para melhor avaliação da identificação da bactéria neste estudo, e, conseqüentemente, para avaliar também esse sistema manual de identificação.

Quando se observa o resultado desse ensaio, torna-se essencial conhecer a realidade de outras regiões. No sudeste da Ásia, o isolamento de *B. pseudomallei* ocorre principalmente na Tailândia, onde a bactéria já foi recuperada no solo em 34,1% das amostras coletadas (114/334) (WUTHIEKANUN *et al.*, 1995). Em outros locais endêmicos, a positividade encontrada é menor e apresenta variação entre 1 a 12%. Na Austrália, foi relatado inicialmente o fato de que o isolamento ocorreu em 1,3% das amostras coletadas (9/700) (THOMAS *et al.*, 1979). Outro estudo australiano mais recente, realizado em três diferentes regiões do País, evidenciou positividade em 3% das amostras coletadas (11/360) (INGLIS *et al.*, 2004). Já na Malásia, 11,6% das amostras recolhidas foram positivas (5/43) (STRAUSS *et al.*, 1969a). Neste estudo, o isolamento foi de 4,3% das amostras coletadas (26/600), mostrando similaridade com regiões que, embora consideradas endêmicas, não apresentam isolamento ambiental elevado como a Tailândia.

A *B. pseudomallei* é difícil de ser isolada em solo (INGLIS; SAGRIPANTI, 2006). Apesar da ocorrência da doença, a bactéria nem sempre é isolada em solo ou água,

como mostram alguns estudos ambientais em áreas endêmicas. O número de isolados no estudo do Ceará, portanto, é considerado relevante quando esses aspectos são considerados.

Estudo realizado no Vietnã evidenciou que 8 oito dos 9 sítios que apresentaram isolamento de *B. pseudomallei* eram próximos as casas de pacientes que tinham sido internados com diagnóstico de melioidose (PARRY *et al.*, 1999). No norte da Austrália, um projeto de vigilância ambiental de melioidose também mostrou que sete locais de isolamento eram associados a casos da doença (INGLIS *et al.*, 2004). Neste estudo, a pesquisa da bactéria foi realizada em sítios próximos às casas dos pacientes que tiveram casos graves de melioidose. Em Tejuçuoca esses sítios foram: no quintal da casa (1T); no rio Caxitoré a 290 metros de distância da casa (3T); em local de alagamento durante quadra chuvosa, situado a 350 metros da casa (4T); e em local de criação de animais ao lado da casa (5T). Em Banabuiú os sítios foram: no quintal da casa (1B); embaixo de uma árvore há cerca de 350 metros da casa (2B); em local de alagamento durante quadra chuvosa em área adjacente à casa (4B). O Município de Tejuçuoca apresentou 76,9% (20/26) de todas as amostras positivas. O sítio 3T, o rio Caxitoré, indicou maior número de isolamentos de todos os sítios pesquisados, com o percentual de 57,6% (15/26) das amostras positivas do estudo. Neste sítio, a coleta ocorreu em uma barragem situada a 290 metros da casa. A investigação epidemiológica do surto em 2003 identificou a possibilidade de que provavelmente os pacientes tiveram uma fonte comum e simultânea de contaminação. Dois dias antes do início dos sintomas da doença, os pacientes tomaram banho na barragem logo após o escoamento das primeiras águas das chuvas, levando a ser considerado como local de contaminação (ROLIM *et al.*, 2005). O isolamento de *B. pseudomallei* nesse sítio indica que o provável local de contaminação do surto em 2003 foi a barragem.

O isolamento de *B. pseudomallei* em sítios de criação de animais foi observado em um estudo realizado em curral de caprinos em Townsville, na Austrália, que mostrou isolamento, principalmente, onde os animais buscavam abrigo embaixo de uma mangueira e uma figueira (THOMAS *et al.*, 1979). Neste estudo, a bactéria foi isolada no sítio 5T, um curral de caprinos localizado ao lado da casa do surto em Tejuçuoca. Quatro sítios que ficavam embaixo de árvores foram responsáveis por 30,7% (8/26) das amostras positivas: o sítios 1T e 1B, localizados, respectivamente, embaixo de uma árvore na parte posterior das casas em Tejuçuoca e Banabuiú; o sítio 2B, uma mangueira em Banabuiú. Nestes sítios, que ficavam à sombra de árvores, não havia presença de animais.

Em Banabuiú, o isolamento ocorreu no sítio 4B, área de cultivo agrícola de milho, ao lado da casa. A melioidose é amplamente conhecida por acometer agricultores de

plantações de arroz na Tailândia (SUPUTTAMANGKOL *et al.*, 1994). A bactéria também foi isolada em plantações de arroz nesse país (WUTHIEKANUN *et al.*, 1995). Nas duas regiões estudadas, não há plantações de arroz. A agricultura de ambas as regiões é baseada no cultivo de milho e feijão, mas somente de subsistência. O cultivo de mandioca também ocorre, embora em pouca quantidade. Dos sítios estudados somente o sítio 4B era local de cultivo e a planta existente durante o período chuvoso foi de milho. Nesse sítio, *B. pseudomallei* foi isolada em 3 ocasiões, sendo uma durante a estação chuvosa (abril) e outras duas no final da quadra chuvosa (junho). Esse campo de plantação de milho, adjacente à casa de uma paciente que teve melioidose, fica alagado no inverno, pois é leito de um riacho. Na estação seca, permaneceram somente as raízes secas da planta. Como o arroz, o milho é uma planta gramínea da família Poaceae. Várias espécies de *Burkholderia* desenvolvem interação benéfica com plantas e raízes e algumas destas espécies têm capacidade de fixar nitrogênio atmosférico ao redor das raízes de plantas (COENYE *et al.*, 2003; INGLIS; SAGRIPANTI, 2006). *Burkholderia sp* foi associada experimentalmente à plantação de milho no México em 2002 (BRÄMER *et al.*, 2001). Isolados do gênero *Burkholderia* foram encontrados em plantações de milho e cana-de-açúcar no Rio de Janeiro. Uma nova espécie, denominada provisoriamente de *Burkholderia silvatlântica SP*, foi recentemente isolada da rizosfera do milho no Rio de Janeiro (BRÄMER *et al.*, 2001). A associação da bactéria com plantas é fundamental para determinar se a vegetação pode ser utilizada como marcador de contaminação ambiental ou para bio-remediação de solos contaminados (INGLIS; SAGRIPANTI, 2006).

Quanto à profundidade de isolamento da bactéria, também se evidenciou que a *B. pseudomallei* é mais comumente isolada entre 25-45 cm em estudo realizado em Queensland, Austrália (THOMAS *et al.*, 1979). O único isolamento deste estudo em superfície ocorreu no período de chuvas (THOMAS *et al.*, 1979). Outro estudo realizado no nordeste da Tailândia mostrou que o isolamento de 44 amostras positivas no período de chuvas aumentava progressivamente com a profundidade, sendo 60cm o máximo de profundidade pesquisado neste período (WUTHIEKANUN *et al.*, 1995). Dessas 44 amostras, somente uma cepa foi isolada na superfície. Já no período seco, 70 amostras foram isoladas de maneira uniforme de 30 a 90 cm de profundidade, entretanto, com exceção de 1 sítio, todos os outros eram locais de cultivos e eram alagados (WUTHIEKANUN *et al.*, 1995). Diferentemente do estudo australiano, a pesquisa tailandesa evidenciou que a profundidade estava relacionada com a mudança do tipo de camada do solo; nesse estudo, o solo permaneceu arenoso até 120 cm (WUTHIEKANUN *et al.*, 1995). Além disso, tem sido mostrado que o isolamento da bactéria tem relação com a quantidade de água residual que aumenta com a profundidade (INGLIS;

SAGRIPANTI, 2006). Outras características físicas do solo, como tamanho das partículas, conteúdo orgânico e propriedades hidrofílicas, também parecem afetar a sobrevivência da bactéria (INGLIS; SAGRIPANTI, 2006). Neste estudo, 17(65,3%) de 26 amostras, o isolamento ocorreu também entre o intervalo 20 a 40 cm. Ademais, vale ressaltar que, destas 17 amostras, 10 (58,8%) ocorreram durante os meses secos. Diferentemente também de outras regiões, dois isolamentos na superfície ocorreram no período sem chuvas, quando a superfície estava seca.

Os isolamentos ocorridos em períodos sem chuvas foram em locais próximos à água e talvez estejam relacionados com a capacidade de retenção de umidade em camadas mais profundas do solo. Os dois isolamentos na superfície do solo também podem ter relação com outras características ainda não conhecidas que permitam a sobrevivência da bactéria.

A associação de melioidose com o período de chuvas é bem evidenciada. Nas principais áreas endêmicas, Austrália e Tailândia, há maior prevalência de casos da doença no período de chuvas (8, 30). Formas graves da doença mostraram associação com chuvas ocorrendo nos primeiros 14 dias após o início das chuvas (CURRIE; JUCUPS, 2003). Todos os casos confirmados até o momento no Brasil ocorreram durante estação chuvosa e o surto de Tejuçuoca teve importante relação com o período de chuvas (ROLIM *et al.*, 2005). Recente estudo na Malásia demonstrou que essa associação é menor do que em outras áreas endêmicas (SAM; PUTHUCHEARY, 2007). Já em Cingapura, não parece haver correlação entre a ocorrência de casos e estação chuvosa (HENG *et al.*, 1998). Além da associação de casos da doença e chuvas, o isolamento da *B. pseudomallei* em solo e água também foi demonstrado durante a estação chuvosa (NACHIANGMAI *et al.*, 1985). O estudo australiano em Townsville mostrou isolamento de 12 cepas de solo e água sendo sete durante o período de chuvas e cinco antes do início das chuvas (THOMAS *et al.*, 1979). Estudo tailandês evidenciou também o isolamento na estação seca, embora outros fatores possam ter influenciado esse resultado como os sítios de coleta em locais de cultivo (alagados) ou coleta de alíquota maior de terra no período seco (WUTHIEKANUN *et al.*, 1995). Nesse estudo, porém, o isolamento de *Burkholderia pseudomallei* ocorreu no final da quadra chuvosa e nos meses secos. Catorze amostras foram positivas (53,7%) e ocorreram durante o período seco, embora em rio ou reservatório que acumulam água no período de chuvas (pontos 3T e 4B). Sendo assim, o isolamento de *B. pseudomallei* durante o período seco poderia ser explicado pela manutenção da umidade no solo, já que os isolados ocorreram mais frequentemente nestes locais, entretanto não se pode esquecer de que características bióticas e abióticas devem influenciar de maneira decisiva na manutenção deste microrganismo.

O crescimento de *B. pseudomallei* requer temperatura razoavelmente alta, aumento da umidade e chuvas consistentes (CHAMBON, 1955). A melioidose é uma doença que predominantemente ocorre em clima tropical e subtropical e provavelmente a temperatura ambiental influencia a distribuição da bactéria que tem melhor crescimento *in vitro* em temperaturas entre 37-42° C (DANCE, 2000a). É peculiar a característica ambiental dos dois locais estudados que pertencem a uma região do Brasil, de clima semi-árido, e que possui vegetação típica de pequenos arbustos denominada de caatinga, uma típica e nativa mata que predomina na maior parte do Nordeste brasileiro. Este tipo de vegetação tem a capacidade de adaptação aos longos períodos de ausência de chuvas observados nesta região. Geralmente apresentam índice pluviométrico baixo e não há grande variação de temperatura durante o ano. Assim sendo, o isolamento de *B. pseudomallei* neste estudo foge às condições de pluviometria, temperatura e umidade observadas em outros locais.

O isolamento de *B. pseudomallei* foi descrito em camada de solo argiloso (THOMAS *et al.*, 1979). Oito de 9 isolados em solo e 3 cepas de água lamacenta foram isolados de profundidade variando entre 25-45 cm e coberto por camadas de argila arenosa marrom até argila média. Acredita-se que o isolamento no período seco nesse estudo possa ter sido relacionado com a retenção de umidade pela camada argilosa que predomina até 5 a 6 metros de profundidade no local pesquisado. Nas duas áreas estudadas em Tejuçuoca e Banabuiú, o solo foi classificado como litólico. Este tipo de solo é pouco desenvolvido, raso (15 a 40 cm) e quase sempre apresenta pedregosidade e rochiosidade na superfície. Sua textura pode ser arenosa, média, argilosa e com presença de cascalhos. Além disso, são suscetíveis à erosão em virtude da limitação por falta de água, correm risco de salinização. Observa-se que a argila presente nos solos litólicos condiciona comportamento também extremo a estes solos em relação ao período de chuvas e seca. Na estiagem, o solo torna-se ressecado, fendilhado e muito duro. Durante as chuvas ficam encharcados e pegajosos, dificultando o manuseio agrícola (FUNCEME, 2008). O isolamento da bactéria no período sem chuvas possivelmente tem relação com essa capacidade de adaptação ao tipo de solo presente na região nordestina. Novamente parece haver condições bióticas e abióticas que propiciam o desenvolvimento da *B. pseudomallei* nessas regiões, uma vez que, mesmo condições extremas do solo litólico não impedem o crescimento e a permanência da bactéria. Além disso, é notável a capacidade que a *B. pseudomallei* tem de sobreviver a condições adversas, de forma viável sem nutrientes (INGLIS; MEE; CHANG, 2001; INGLIS; SAGRIPANTI, 2006).

Embora Banabuiú tenha apresentado número de isolamentos inferior a Tejuçuoca, é considerável o isolamento de *B. pseudomallei* do estudo. Uma característica foi similar aos

dois municípios - os sítios de isolamento: os sítios próximos a rios ou em locais de alagamento (sítios 3 e 4) foram os que tiveram maior isolamento.

A profundidade do isolamento mostrou diferença entre os municípios. Embora cada município tenha apresentado somente 3 isolamentos em superfície, Banabuiú só os apresentou durante o período chuvoso, enquanto Tejuçuoca o fez somente no período sem chuvas. O número de isolamentos em superfície foi pequeno para permitir análise mais detalhada, no entanto, chama a atenção o isolamento não ter sido limitado apenas ao período de chuvas como se observou em Tejuçuoca. Embora, nesse caso, tenha ocorrido em sítios próximos de água, no período sem chuvas, o solo na superfície costuma ser muito seco e, às vezes, até fendilhado. Outra diferença observada foi o isolamento de *B. pseudomallei* em períodos com pluviometria diferente nos dois municípios. Todos os isolamentos no Município de Banabuiú se deram na estação chuvosa. Já em Tejuçuoca, os isolamentos, embora tenham ocorrido no período com chuvas, foram predominantes na fase sem chuvas.

Esses achados divergentes encontradas nos dois municípios não parecem estar relacionados às características diferentes dos dois locais, uma vez que esses têm componentes ambientais similares relacionados a composição de solo, índice pluviométrico, temperatura e vegetação.

Novamente reforça a demonstração da presença da bactéria em diferentes regiões do Estado do Ceará, como também sua capacidade de desenvolvimento em situações menos favoráveis presentes na região do Nordeste do País.

As observações das características dos isolamentos da *B. pseudomallei* e sua relação com o ambiente dessas regiões permitiu o estudo de suas reservárias. Demonstrou-se que os dois locais, apesar de situarem-se em diferentes regiões do Estado do Ceará, apresentam características ambientais semelhantes. A princípio, essa região muito seca parece inóspita ao desenvolvimento da bactéria, que tem preferência por umidade. Algumas observações apontam para essa possibilidade como características climáticas e de solo diferentes de outras regiões endêmicas. A temperatura elevada nesta região, apesar de poder favorecer a multiplicação da bactéria, não explicaria, de forma individual, as particularidades dessa região não observadas em outras áreas onde a melioidose é endêmica, demonstrando que possivelmente algumas características próprias dessa região, como a composição do solo, talvez possam favorecer de alguma forma a distribuição e a multiplicação da bactéria no Nordeste do Brasil.

5.2 Parte 2 - Inquérito Soroepidemiológico

Um teste sorológico, para que seja considerado ideal para melioidose, deve ser sensível, específico, rápido, simples e de baixo custo. Esse teste deve ser capaz de fornecer resultado para uma decisão inicial marcante, para monitorar a progressão da doença e para avaliar o seu impacto epidemiológico (CHENTHAMARAKSHAN; VADIVELU; PUTHUCHEARY, 2001). Observa-se que a presença dessas características é também ideal para a maioria das doenças infecciosas. Para o diagnóstico de melioidose, no entanto, talvez tenha importância ainda maior. Quando se analisa as características da doença e os resultados de testes sorológicos, é possível entender melhor essa afirmação. Com esse propósito, vários testes sorológicos para melioidose foram desenvolvidos usando uma variedade de antígenos, entre eles, a hemaglutinação passiva indireta (HIA) (LEELARASAMMEE, 1985; HAMBIE, 1997), a imunofluorescência indireta (IFI) (ASHDOWN, 1979, 1987; VADIVELU *et al.*, 1995) e ELISA (ASHDOWN, 1989; ANUNTAGOOL, 1993).

Os testes sorológicos utilizados não foram suficientemente sensíveis ou específicos para detecção no estágio precoce da doença. Ao mesmo tempo, alguns desses testes, tais como fixação de complemento, HIA e IFI, podem apresentar resultados negativos na sepse aguda decorrentes da melioidose (ALEXANDER *et al.*, 1970; CHAOWAGUL *et al.*, 1989). Vale ainda ressaltar que, em áreas onde a melioidose é endêmica, altas taxas de positividade de anticorpos são observadas (ASHDOWN; GUARD, 1984; KANAPHUN *et al.*, 2003); o que prejudica a especificidade diagnóstica da doença (CHANTRATITA, 2007).

A cultura microbiológica é o teste padrão-ouro para o diagnóstico de melioidose. O teste sorológico, todavia, é comumente usado, particularmente em regiões de recursos pobres que não têm facilidades de realizar cultura microbiológica (TIYAWISUTSRI *et al.*, 2005). Acredita-se que hospitais de áreas rurais de regiões endêmicas talvez tenham maior acesso a testes sorológicos do que a culturas microbiológicas (CHANTRATITA *et al.*, 2007).

Assim, alguns fatores limitam o uso dos testes sorológicos em regiões endêmicas. Eles apresentam sensibilidade e especificidade baixas, não sendo capazes de realizar o diagnóstico na fase aguda da doença, o que prejudica o conhecimento da situação epidemiológica em regiões com poucos recursos tecnológicos.

Os anticorpos contra *B. pseudomallei* são empregados como marcadores epidemiológicos em regiões onde não se sabe se a doença é endêmica e em regiões não endêmicas (TIYAWISUTSRI *et al.*, 2005).

Neste estudo, foi possível isolar *B. pseudomallei* de amostras do solo em Tejuçuoca e Banabuiú, onde houve casos anteriormente confirmados de melioidose. Assim, realizou-se um inquérito soropidemiológico na população residente nessas localidades, com objetivo de avaliar exposição prévia a *B. pseudomallei*. Neste contexto, empregou-se o teste sorológico como ferramenta epidemiológica, uma vez que não há informações disponíveis no Brasil. A população residente nessas áreas apresentou anticorpos contra a bactéria. Observou-se soroprevalência de 51,3% para isotipos IgM e 58,5% para isotipo IgG.

Inquéritos soropidemiológicos em regiões endêmicas de outros países são feitos principalmente pela técnica de hemaglutinação passiva indireta (HIA) (TIYAWISUTSRI *et al.*, 2005; CHANTRATITA *et al.*, 2007), em decorrência da sua facilidade de execução.

O teste foi primeiramente desenvolvido para diagnóstico sorológico em cabras (ILERI, 1965) e, logo em seguida, para diagnóstico sorológico em humanos (ALEXANDER *et al.*, 1970).

Outros testes sorológicos propostos foram os testes imunoenzimáticos em fase sólida (ELISA). Muitas tentativas prévias foram realizadas, buscando melhorar a acurácia dos testes sorológicos para melioidose, mediante a utilização de uma variedade de preparações antigênicas nos testes (PETKANJANAPONG *et al.*, 1992; VADIVELU *et al.*, 1995; DHARAKUL *et al.*, 1997; CHENTHAMARAKSHAN; VADIVELU; PUTHUCHEARY, 2001; SIRISINHA, 1991). Embora vários tenham sido desenvolvidos, nenhum pode ser considerado padrão, não podendo haver, dessa forma, a comparabilidade entre laboratórios diferentes (SU *et al.*, 2007).

Analisando-se os estudos prévios, verifica-se que um dos primeiros estudos de soroprevalência de anticorpos contra *B.pseudomallei* foi realizado na Malásia em 1969, que mostrou positividade variando de 1,9 a 15,8% em 1592 indivíduos assintomáticos (STRAUSS *et al.*, 1969b). Em 1984, em Queensland, Austrália, 9047 indivíduos assintomáticos foram testados e 5,7% (517) foram positivos (ASHDOWN; GUARD, 1984). Em 1993, no Vietnã, em 406 indivíduos assintomáticos selecionados ao acaso, a soroprevalência variou de 6,4 a 31,8% (PHUNG; QUYNH; DANCE, 1993). Outro estudo de 1987 em Hong Kong, realizado em 275 pacientes com doença pulmonar de base em um sanatório de tuberculose, mostrou positividade de 14% (39 pacientes) (SO *et al.*, 1987). Um estudo clássico, realizado em 1000 crianças em 1991, mostrou que no nordeste da Tailândia, 80% das crianças após quatro anos de idade apresentam anticorpos para *Burkholderia pseudomallei* (KANAPHUN *et al.*, 1993).

Em Cingapura, em 1998, foi avaliado grupo populacional de 1854 doadores de sangue assintomáticos que apresentou soropositividade de 0,2% (HENG *et al.*, 1998). Dois estudos foram realizados em Taiwan. O primeiro, em 2004, analisou 600 doadores de sangue saudáveis nas regiões norte, central e sul de Taiwan e encontrou 2,8 a 5% de infecção assintomática. Não foram demonstradas áreas hiper-endêmicas em Taiwan (CHEN *et al.*, 2004). O estudo seguinte, em 2005, realizado em 365 pacientes com diabetes, evidenciou positividade em 3% desses pacientes (CHEN *et al.*, 2005). Na Papua Nova Guiné em 2007, 747 crianças entre 8 e 13 anos de idade realizaram sorologia cuja prevalência de positividade foi 8,2%. Já no Camboja, entre dezembro de 2005 e abril de 2006, 968 crianças saudáveis entre o nascimento e 16 anos foram submetidas a teste sorológico cujo resultado mostrou 16% (159 crianças) de soropositividade (WUTHIEKANUN *et al.*, 2008). Todos esses estudos utilizaram teste de hemaglutinação passiva indireta, com exceção dos estudos em Taiwan, que usaram testes imunoenzimáticos.

Quando se compara o resultado de estudos sorológicos realizados em áreas do sudeste da Ásia e da Austrália, observa-se que a prevalência deste estudo foi superior às relatadas na Austrália, Vietnã, Malásia, Cingapura, Hong Kong, Taiwan, Papua Nova Guiné e Camboja, que tiveram valores entre 0,2 a 31,8%. A soroprevalência observada no Ceará pode ser considerada elevada, já que o resultado foi mais próximo dos encontrados na Tailândia, que é o país de maior endemicidade para a melioidose.

Wuthiekanun *et al.* (2008) encontraram uma soroprevalência de 16% em crianças entre o nascimento e 16 anos de idade no Camboja e a positividade aumentou com a idade. A observação deste estudo que os níveis de IgM anti-*B. pseudomallei* decrescem com a idade, enquanto os níveis de IgG anti-*B. pseudomallei* elevam-se no decorrer da idade, suporta a idéia que idades precoces são representativas de infecção bacteriana recente e que idades tardias representam estado de infecção crônica. Ashdown (1981) demonstrou que somente pacientes com melioidose clínica apresentavam anticorpos do isotipo IgM detectáveis, os quais permaneciam por períodos variáveis, de 3 meses até 2 anos. Por outro lado, Chenthamarakshan (2001) encontraram níveis elevados de anticorpos do isotipo IgM em seu grupo-controle, com variação de títulos entre 1:50 a 1: 3200, enquanto o grupo de risco mostrou títulos abaixo de 1:100. Considera-se, aqui, um *cut-off* de 1:250 para ambos, IgM e IgG. De acordo com os autores (CHENTHAMARAKSHAN *et al.*, 2001), níveis elevados de IgM em controles não doentes podem ser encontrado em virtude da exposição ambiental contínua ao microorganismo.

A associação entre agricultores e trabalhadores da construção civil e presença anticorpos positivos reforça a observação de que trabalhadores frequentemente têm exposição à bactéria (SUPUTTAMONGKO *et.al.*, 1999), mas necessariamente não desenvolvem a doença, o que foi evidenciado neste relatório de pesquisa. Outros estudos favorecem esse argumento, ao mostrar características semelhantes, como os realizados na Malásia (STRAUSS *et.al.*, 1969b) e no Vietnã (PHUNG; QUYNH; DANCE, 1993), que evidenciaram elevada prevalência de soropositividade em plantadores de arroz. De forma semelhante, em Cingapura, houve maior prevalência em trabalhadores da construção civil estrangeiros, quando comparados aos trabalhadores da construção civil locais (HENG *et al.*, 1998).

Estudo preliminar em Tejuçuoca e Banabuiú, em amostra pequena, havia evidenciado maior prevalência em mulheres, o que poderia ter relação com maior exposição à água, em razão da atividade doméstica, comum a esse grupo em áreas rurais, isto é, a lavagem de roupas (ROLIM *et.al.*, 2005). Não foi encontrada associação com sexo, tampouco com a atividade de lavagem de roupas. As outras variáveis investigadas que não demonstraram associação com positividade foram a localidade, os rios ou açudes freqüentados pela população, moradia prévia, deslocamento entre regiões do Estado do Ceará ou entre regiões do Brasil.

A falta de especificidade dos testes sorológicos pode decorrer das elevadas percentagens de resultados positivos entre indivíduos sadios de áreas endêmicas, bem como da presença de anticorpos resultante de reações cruzadas com infecções ocasionadas por *Legionella* ou *Pseudomonas* (ASHDOWN, 1981; LEELARASAMMEE *et al.*, 1985; CHAOWAGUL *et al.*, 1989).

Acredita-se que, em áreas endêmicas, a soropositividade elevada decorre de exposições persistentes à *B. pseudomallei* (CHANTRATITA *et. al.*, 2007). De forma semelhante, o achado de elevada positividade deste estudo pode resultar das freqüentes exposições das pessoas residentes em áreas rurais com o solo e a água de represas e dos rios. O achado do aumento dos títulos de IgG com o progredir da idade corroboraria esta constatação.

Outra consideração sobre a especificidade diz respeito à possibilidade de reações cruzadas a outras espécies de *Burkholderia*. É postulada a idéia de que a soropositividade, além de poder resultar de exposição prévia a *B. pseudomallei*, poder também ser relacionada a outras espécies de *Burkholderia* (CHANTRATITA *et al.*, 2007). Particularmente, poderia ser resposta imunológica a uma espécie antigenicamente similar, mas raramente patogênica, a *B. thailandensis*, presente na Tailândia.

Um estudo foi realizado na Tailândia para definir se pacientes com cultura positiva para melioidose tem anticorpos com reação cruzada para *B. pseudomallei*, *B. mallei* e *B. thailandensis* presentes em testes de hemaglutinação indireta modificada (TIYAWISUTSRI *et al.*, 2005). Durante o período de junho a outubro de 2004, a pesquisa foi realizada em 117 soros de pacientes com melioidose. Os títulos de anticorpos foram idênticos em 46 (39%) dos 117 casos. Anticorpos *B. thailandensis* não foram identificados em 98 (84%) amostras. O resultado desse estudo mostrou ser improvável que os testes de IHA para *B. pseudomallei* sejam confundidos com anticorpos contra *B. thailandensis*, mas que o teste é incapaz de distinguir entre infecção por *B. pseudomallei* e *B. mallei*. A exposição individual à *B. thailandensis* provavelmente não interfere no resultado de IHA para *B. pseudomallei* (TIYAWISUTSRI *et al.*, 2005).

A relação antigênica entre *B. pseudomallei* e *B. mallei* já tinha em sido observada anteriormente, quando um estudo evidenciou reação cruzada de antígenos de *B. mallei* por anticorpos contra *B. pseudomallei* (ANUNTAGOOL; SIRISINHA, 2002). Em adição, existe aumento de evidência de relação de proximidade filogenética baseada em seqüência de genomas e tipagem de seqüência multilocus (HOLDEN; TITBALL; PEACOCK, 2004; TIYAWISUTSRI *et al.*, 2005). Os autores desse estudo consideraram improvável que os pacientes tenham exposição à *B. mallei*, pois o mormo não ocorre na Tailândia. Quanto à *B. thailandensis*, os autores discutem que a ausência geral ou baixos títulos para *B. thailandensis* na população de pacientes indica que a exposição ambiental a esse organismo não é imunogênica ou que esses anticorpos não são detectáveis por HIA.

Esses achados podem suscitar dúvidas quanto à existência de espécies similares nas regiões estudadas, o que poderia indicar resultado falso-positivo. O mormo já foi descrito no Estado do Ceará (SANTIAGO, 2000), mas não parece ser um problema prevalente, malgrado a possibilidade de não haver registro adequado no País. É improvável que a elevada soropositividade evidenciada no Estado do Ceará seja secundária à exposição à *B. mallei*, pois nessa situação a doença em animais seria evidenciada.

Acredita-se que a diferença na ocorrência da doença na Tailândia possa decorrer da existência de *B. thailandensis*, considerada de baixa virulência, na região Sudeste do País, onde a prevalência é bem menor do que na região Nordeste (WUTHIEKANUN *et al.*, 2006).

Outra observação a ser considerada é a diferença das taxas de soropositividade entre Tailândia e Austrália. Tiyawisutsri (2005) considera que poderia ser explicada pela não-presença de *B. thailandensis* na Austrália, embora ressalte que a explicação para essa diferença permanece não esclarecida. Acrescenta também ser improvável que a intensidade de

exposição seja responsável pela manutenção de soropositividade no Sudeste da Ásia, como se evidencia nas taxas de soropositividade entre imigrantes procedentes da região Sudeste da Ásia na Austrália.

A existência de *B. thailandensis* não é restrita à Tailândia, e foi isolada em caso clínico nos EUA (GLASS *et al.*, 2006) e recentemente isolada na Austrália (LEVY *et al.*, 2008). Diante desse contexto, a presença de *B. thailandensis* poderia ocorrer no solo cearense e levar a resposta de anticorpos com reação cruzada. Algumas evidências, todavia, falam contra essa possibilidade nessas duas regiões. Primeiramente, a elevada soropositividade que se aproxima da encontrada na Tailândia; a presença considerável de *B. pseudomallei* em solo demonstrado neste experimento; e a presença de casos graves de melioidose. Ressalte-se, ainda, o relato da não-interferência da *B. thailandensis* no resultado de IHA, embora essa técnica seja diferente da utilizada neste estudo; além disso, a recente evidência de *B. thailandensis* na Austrália, que possivelmente não explicaria exclusivamente a soropositividade menor do que a observada na Tailândia (LEVY, *et al.*, 2008).

O uso de antígeno não caracterizado ou bruto, como antígenos de células inteiras e antígenos de cultura filtrada, talvez possa contribuir com marcada reação cruzada com outras infecções bacterianas (ASHDOWN *et al.*, 1989; KUNAKORN *et al.*, 1990). Estudos que utilizam antígenos purificados, como lipossacarídeos ou exopolissacarídeos, são conduzidos. No entanto, eles são avaliados em pequenas coleções de amostras e demonstram ampla variação de sensibilidade e especificidade (PETKANJANAPONG *et al.*, 1992; DHARAKUL *et al.*, 1997).

Estudo realizado recentemente, numa população singular de pacientes, definida como altamente suspeita de ter melioidose no nordeste da Tailândia, comparou teste de ELISA com suporte em antígeno bruto ou purificado (lipossacarídeos, exopolissacarídeos e antígeno purificado) (CHANTRATITA *et al.*, 2007). Além disso, foram avaliadas as respostas de anticorpos em relação a diferentes combinações de preparações desses antígenos contra *B. pseudomallei* e também a reação cruzada de antígenos contra *B. pseudomallei* e *B. thailandensis*. Foram realizados 6 testes sorológicos para *B. pseudomallei*: 5 testes de ELISA e 1 teste de hemaglutinação indireta (IHA). Os 5 antígenos investigados no ELISA foram: Ag bruto de *B. pseudomallei*; antígeno purificado; exopolissacarídeos e lipossacarídeos (EPS + LPS); lipossacarídeos (LPS); exopolissacarídeos (EPS). Outro teste foi com antígeno bruto de *B. thailandensis*.

Os testes foram realizados em 322 pacientes suspeitos de ter melioidose admitidos a hospital tailandês, entre os meses de junho e outubro de 2004. A *B. pseudomallei*

foi isolada em 120 desses pacientes suspeitos. Entre os cinco testes de ELISA avaliados como diagnósticos para melioidose no nordeste da Tailândia, o melhor resultado ocorreu com antígeno ávido-purificado (sensibilidade, 82%; especificidade, 72%) e antígeno bruto de *B. pseudomallei* (sensibilidade, 81%; especificidade, 70%). O teste de ELISA anti-IgG contra *B. pseudomallei* representou melhora sobre o teste de hemaglutinação indireta. O ELISA para *B. thailandensis* mostrou estreita relação com ELISA para *B. pseudomallei* contendo LPS, o que foi consistente com relatos prévios de similaridade entre os dois antígenos (CHANTRATITA *et al.*, 2007).

Em relação à preparação do antígeno de *B. pseudomallei* filtrado em cultura, o estudo há pouco referido demonstrou que o antígeno bruto apresenta boa correlação com soluções de antígenos que contêm lipossacarídeos (LPS) e com soluções que contêm LPS e exopolissacarídeos, mas não com exopolissacarídeos isoladamente. Os antígenos brutos de *B. pseudomallei* e antígeno purificado apresentaram melhor performance. O antígeno bruto para ELISA é considerado boa vantagem para propostas soroepidemiológicas principalmente porque é de fácil obtenção, entretanto, para propostas clínicas o valor preditivo ainda não está elucidado (CHANTRATITA *et al.*, 2007).

Outro estudo avaliou 5 diferentes antígenos: o antígeno 19,5 kDa; um extrato de célula bruto, um antígeno 39,0 kDa e um antígeno de afinidade imunológica purificado. Todos foram usados em soros de pacientes com sepse por melioidose por meio de teste de hemaglutinação indireta. Os resultados foram comparados com outras infecções bacterianas e soros normais em áreas endêmicas e não endêmicas. A análise de SDS-PAGE da maioria dos componentes imuno-reativos de *B. pseudomallei* examinados com anticorpos IgG ou IgM exibiam massas moleculares entre 33 kDa e 66 kDa. A maioria dos componentes de baixo peso molecular foram pobremente imunogênicos e somente o polipeptídeo 19,5 kDa reagiu fortemente com anticorpo IgG presente no soro de referência. Este antígeno 19,5 kDa estava presente nas 56 amostras de *B. pseudomallei* disponíveis para teste, mostrando claramente que esse antígeno foi muito potente imunogenicamente e altamente específico para *B. pseudomallei*. O antígeno 19,5 kDa apresentou o resultado mais satisfatório, com 92% de sensibilidade e 91% de especificidade, demonstrando que potencialmente é útil para diagnóstico de melioidose (ANUNTAGOOL *et al.*, 1993).

A análise por *immunoblotting* das amostras de soros desse estudo revelou reatividade na posição 200 kDa; na posição entre 45 a 68 kDa; na posição 38 kDa e na posição menor que 21 kDa. O antígeno 200 kDa é um exopolissacarídeo (ANUNTAGOOL; SIRISINHA, 2002), que é, um polissacarídeo capsular que contém um resíduo 3-deoxi-D-

mano-2-ácido octusolônico (KDO), um componente presente em lipossacarídeos e polissacarídeos capsulares de Gram-negativos, tais como *E. coli* (NIMTZ *et al.*, 1997). As bandas que variaram de 45 a 68 representam reatividade repetida a polissacarídeo O cadeia do LPS e as bandas abaixo da posição 21 kDa representam reatividade ao core do lipídio oligossacarídeo A do LPS (ANUNTAGOOL *et al.*, 2006). A reação contra na posição 38 kDa parece resultar da interação inespecífica com componentes da bactéria (ANUNTAGOOL; SIRISINHA, 2002).

A maioria das amostras de pessoas que residiam em áreas endêmicas e tinham ELISA com titulação elevada (1:800) mostraram reatividade na análise do *immunoblotting*. Os achados não estão de acordo com outros autores, ao demonstrarem que somente pacientes com sepse ou melioidose localizada e grupo-controle da doença com positividade no ELISA, mas não grupo de alto risco, foram positivos na análise por *immunoblotting*. Apesar disso, o padrão de reatividade foi similar àqueles obtidos pelos pesquisadores. Muitas das amostras desse experimento reconheceram várias bandas próximas umas das outras que variaram entre 45 a 68 kDa, um padrão típico de LPS de cadeia O. Somente duas amostras mostraram reatividade para o antígeno 200 kDa. Alguns deles reagiram com banda 38 kDa, considerada como ligação inespecífica. (ANUNTAGOOL; SIRISINHA, 2002).

Estudo analisou recentemente a heterogeneidade de polissacarídeos entre espécies de *B. pseudomallei*. Os padrões heterogêneos de lipossacarídeos (LPS) foram obtidos com base em 1327 isolados de *Burkholderia pseudomallei* mediante eletroforese em gel de poli-acrilamida em condições desnaturantes e análise por *immunoblotting*. Dois sorotipos de LPS (A e B) possuíram perfis de corrida diferentes, e um LPS áspero sem perfil aparente foi identificado. Todos os três tipos de LPS foram antigenicamente distintos por *immunoblotting* (ANUNTAGOOL *et al.*, 2006). Existem, portanto, dois lipopolissacarídeos distintos sorologicamente, um mais comum, denominado sorotipo A (97%), e outro menos abundante, denominado sorotipo B, considerado liso (ANUNTAGOOL *et al.*, 2006). Os sorotipos B e LPS rugoso estão mais frequentemente em isolados clínicos. Neste trabalho, não se pôde distingui-los no tipo de LPS liso, o que será interessante examinar em estudos futuros. Com base em dados prévios que mostram que anticorpos contra cadeia O, são protetores e mediados por fagócitos que matam *B. pseudomallei* (HO *et al.*, 1997), pergunta-se se esta porção do LPS pode ter efeito protetor em indivíduos contra a infecção bacteriana. Seria obviamente necessária a quantificação de anticorpos contra cadeia O, que pode ser isotipo IgG, uma vez que IgM não exerce nenhum papel de opsonização por si (PONTES *et al.*, 2005).

A distribuição de classes e subclasses da resposta de anticorpos contra antígenos filtrados de cultura de *B. pseudomallei* em pacientes com melioidose foi avaliada em soro de 45 pacientes com sepse por melioidose; 17 com melioidose localizada e 40 casos clinicamente suspeitos de melioidose. O resultado foi comparado com grupos-controles sadios e de alto risco para melioidose. Os valores dos índices de título da média geométrica foram mais elevados para todas as classes e subclasses de imunoglobulinas de todos os soros de pacientes com melioidose clinicamente comprovados ou suspeitos do que para os grupos-controles. Nenhum soro do grupo-controle teve qualquer título significativo de anticorpos (CHENTHAMARAKSHAN *et al.*, 2001).

O maior título foi para IgG e o menor foi para IgM. O título de IgA foi intermediário. O título para IgG foi maior em pacientes com sepse e os títulos para IgM e IgA em pacientes com melioidose localizada. Quanto à distribuição de subclasses de IgG, IgG1 e IgG2 foram as subclasses predominantes produzidas contra o antígeno filtrado de cultura; e em contraste, para as subclasses IgG3 e IgG4, os quais foram produzidas em baixa quantidade (CHENTHAMARAKSHAN *et al.*, 2001).

Outro estudo evidenciou que sistemas de ELISA baseados em IgM e IgG foram desenvolvidos usando antígeno filtrado de cultura de *B. pseudomallei*. Foram avaliados 95 soros de 66 casos de sepse por melioidose e 47 soros de casos de melioidose localizados. Em adição, 65 casos de soros de pacientes clinicamente suspeitos com cultura negativa para *B. pseudomallei* e outras infecções endêmicas foram incluídos. Esses foram comparados com 260 casos de não-melioidose; com 168 soros de indivíduos com risco elevado de adquirir melioidose e 48 soros-controles de indivíduos sadios. O ELISA para IgG foi apresentou sensibilidade de 96% sensível e especificidade de 94%. Todos os soros de casos de sepse e infecções localizadas e 61 dos 63 dos casos clinicamente suspeitos de melioidose foram positivos para anticorpos IgG. Os valores nos casos de melioidose foram significativamente mais elevados, quando comparados aos sujeitos sadios, do grupo de alto risco e das infecções que não eram melioidose. O ELISA para IgM apresentou sensibilidade de 74% e especificidade de 99%. O valor de anticorpo IgM foi significativamente maior quando comparado ao controle da doença. Esse resultado demonstra que IgG é melhor indicador de doença no diagnóstico de melioidose (CHENTHAMARAKSHAN *et al.*, 2001).

Diferentemente desses estudos, esta pesquisa revelou anticorpos IgM e IgG em pessoas assintomáticas. Observa-se que a maioria dos experimentos que avaliam classes de imunoglobulinas, inclui casos de melioidose entre os grupos, dificultando a comparação. Além disso, IgG foi considerado melhor indicador para o diagnóstico da doença que IgM.

Quanto à presença de IgM, foi observada a persistência de anticorpos IgM em paciente sob tratamento de manutenção para sepse por melioidose. A possível explicação está nos antígenos secretórios usados no estudo, que consistiam principalmente de polissacarídeos, os quais são antígenos timo-independentes conhecidos por ativar células B que induzem IgM de baixa afinidade. Esses antígenos timo-independentes, em especial aqueles com polissacarídeos naturais, podem persistir por longo tempo no tecido linfóide e continuar o estímulo para a nova maturação de células B na produção de IgM, nos quais pode haver posteriormente troca de isotipos. Ao mesmo tempo, aqueles antígenos podem ser continuamente seqüestrados de organismos intracelulares, assim induzindo a resposta imune (CHENTHAMARAKSHAN *et al.*, 2001).

Acredita-se que a prevalência de elevados títulos de anticorpos IgM em indivíduos assintomáticos pode ser conseqüente da resposta imune reativa cruzada para epítomos específicos de *B. pseudomallei* e outras fontes antigênicas do ambiente. De maneira similar, o fato de haver elevados títulos de anticorpos IgM em pacientes com melioidose pode decorrer da presença de epítomos específicos IgM em produtos secretados extracelularmente e moléculas de superfície de *B. pseudomallei* (CHENTHAMARAKSHAN *et al.*, 2001).

Como mostrado há pouco, IgG1 e IgG2 foram as subclasses de anticorpos reativos encontrados predominantemente contra filtrados de cultura de *B. pseudomallei*. Eles são considerados subclasses que envolvem predominantemente resposta imune humoral para infecção por *B. pseudomallei* em homem (CHENTHAMARAKSHAN *et al.*, 2001). A capacidade funcional de anticorpos está mais associada diretamente com sua propriedade de avidéz, como a que ocorre para outros microorganismos (USINGER; LUCAS, 1999; PONTES *et al.*, 2005).

Em resumo, observa-se que o estudo sorológico realizado possibilitou considerações que merecem reflexões. Em primeiro lugar, possivelmente, foi importante o desenvolvimento do teste com a preparação de antígeno de cepa local encontrada no Estado do Ceará. Embora os testes não sejam padronizados e diferentes preparações sejam utilizadas nos demais inquéritos de outras partes do mundo, o antígeno preparado no estudo foi capaz de permitir o desenvolvimento de testes adequados e possivelmente contribuiu de alguma forma para a especificidade do teste.

Outra informação importante obtida com o estudo foi a alta prevalência de soropositividade encontrada. Algumas características foram importantes para embasar a idéia de que esse resultado tem impacto epidemiológico. Os achados da distribuição de imunoglobulinas em relação às faixas etárias e a observação de que a ocupação com maior

exposição ambiental tem maior positividade foram concordantes com características encontradas em respostas imunológicas à *B. pseudomallei* já demonstradas. Além disso, as demonstrações de que o gênero, local de residência e deslocamento entre diferentes regiões do Estado não mostraram diferença significativa em relação à positividade sorológica reforçam ainda mais a importância epidemiológica do resultado do estudo.

Por fim, a análise imunológica do antígeno mediante a realização de eletroforese e *immunoblotting* contribuíram para reforçar a adequação dos testes pela demonstração de semelhanças com características de comportamento imunológico da *B. pseudomallei*, como a demonstração de componentes de lipossacarídeos e a de distribuição de classes e subclasses de imunoglobulinas.

O estudo ambiental permitiu o isolamento de *B. pseudomallei* em Tejuçuoca e Banabuiú, demonstrando a presença da bactéria do Estado do Ceará. Determinadas características importantes devem ser assinaladas. As duas regiões apresentaram particularidades ambientais semelhantes e o isolamento da bactéria ocorreu em períodos de chuvas e seca e em condições ambientais peculiares da região Nordeste.

Já o estudo sorológico mostrou considerável soropositividade nas populações residentes nas áreas rurais desses dois municípios. Não foram identificadas características epidemiológicas diferentes em relação às pessoas e aos locais do estudo que pudessem ter repercussão exclusiva à determinada população e região do Estado do Ceará.

Os dois estudos permitem a caracterização da ocorrência da *B. pseudomallei* em relação ao ambiente e à infecção da população de forma semelhante em Tejuçuoca e Banabuiú. Quando analisados aspectos dos estudos ambiental e sorológico, em ambos os locais, e se tentou associar com a ocorrência de casos de melioidose nessas regiões e em outros locais do Estado do Ceará, foram percebidas considerações importantes que devem permitir reflexões em termos de saúde pública.

As observações aqui discutidas indicam que provavelmente não há razão para que a distribuição da bactéria seja limitada a essas duas regiões estudadas no Estado do Ceará. Dessa forma, a repercussão epidemiológica deste estudo aponta o fato de que a presença da doença também não deve ser restrita a regiões que já apresentaram casos da doença no Ceará e nem a esse Estado isoladamente. Comprova-se aqui a necessidade de vigilância epidemiológica e de políticas públicas voltadas para a melioidose no Brasil, em especial, na região Nordeste.

A pesquisa permitiu, ainda, o desenvolvimento de teste sorológico e a estruturação de banco de cepas de *B. pseudomallei* para realização de estudos fenotípicos e moleculares adicionais, que irão contribuir para o conhecimento da melioidose.

6 CONCLUSÕES

- A *B. pseudomallei* esteve presente em 4,3 % (26/600) das amostras do solo investigadas nos Municípios de Tejuçuoca e Banabuiú, resultado semelhante ao descrito em países endêmicos, como Austrália e Malásia, cuja positividade em solo variou entre 1 a 12% das amostras pesquisadas.
- A identificação de cepas de *B. pseudomallei* ocorreu em condições ambientais adversas, não observadas em outros locais endêmicos, como clima tropical semi-árido com índice pluviométrico anual baixo e vegetação de caatinga arbustiva, demonstrando influência de fatores locais que facilitam a sobrevivência e multiplicação do microorganismo.
- O estudo possibilitou o desenvolvimento de testes sorológicos que podem contribuir para compreensão de aspectos epidemiológicos da melioidose.
- A população residente nas áreas estudadas, apresentou anticorpos contra *B. pseudomallei*, por meio de soroprevalência de 51,3% para isotipos IgM e 58,5% para isotipo IgG, evidenciando infecção prévia ao microorganismo, resultado semelhante ao observado em áreas endêmicas como Tailândia;

6.1 Recomendações

Este ensaio reforçou a necessidade de se discutir sobre o impacto epidemiológico da ocorrência da melioidose no Brasil e sinalizou diversas áreas para pesquisas adicionais que contribuirão para a continuidade do conhecimento da doença no País. Algumas recomendações são sugeridas:

- realização de estudos moleculares e seqüenciamento genético das cepas isoladas;
- continuidade dos estudos imunológicos para caracterização de lipossacarídeos e aperfeiçoamento de técnicas sorológicas;
- pesquisa ambiental em outras áreas do Estado do Ceará e do Nordeste;
- pesquisa de exposição a *B.pseudomallei* em populações de outras áreas do Estado do Ceará, do Nordeste e outras regiões do Brasil;
- pesquisas e desenvolvimento de vigilância da doença em animais;
- treinamento de profissionais de saúde para detecção e condução adequada de casos suspeitos ou confirmados da doença;
- inclusão da melioidose no ensino médico e nas políticas públicas voltadas para a prevenção e controle das doenças infecciosas e no ensino médico;
- validação dos testes sorológicos.

REFERÊNCIAS

AARDEMA, H. et al. Changing epidemiology of melioidosis? A case of pulmonary melioidosis with fatal outcome imported from Brazil. **Epidemiol Infect**, v. 133, p. 871-875, 2005.

ABBINK, F.C.; ORENDI, J.M.; BEAUFORT, A.J. Mother-to-child transmission of *Burkholderia pseudomallei*. **N. Engl. J. Med.**, v. 344, n. 15, p. 1171, 2001.

ALDHOUS, P. Tropical medicine: Melioidosis? Never heard of it... **Nature**, v. 434, n. 692-693, April. 2005.

ALEXANDER, A.D. et al. A Serological diagnosis of human melioidosis with indirect hemagglutination and complement fixation tests. **Appl Microbiol**, v. 20, p. 825-833, 1970.

AMORNCHAI, P. et al. Accuracy of *Burkholderia pseudomallei* identification using the API 20NE system and a latex agglutination test. **J Clin Microbiol.**, v. 45, n. 11, p. 3774-3776, Nov. 2007.

ANUNTAGOOL, N. et al. Antigenic heterogeneity of lipopolysaccharide among *Burkholderia pseudomallei* clinical isolates. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.**, v. 31, p. 146-152, 2000.

_____. N. et al. Lipopolysaccharide from nonvirulent Ara+ *Burkholderia pseudomallei* isolates is immunologically indistinguishable from lipopolysaccharide from virulent Ara-clinical isolates. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 5, n. 225-229, 1998.

_____.; SIRISINHA, S. Antigenic relatedness between *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **Microbiol Immunol.**, v. 46, p. 143-150, 2002.

_____. et al. Lipopolysaccharide heterogeneity among *Burkholderia pseudomallei* from different geographic and clinical origins. **Am J Trop Med Hyg**, v.74, n.3, p.348-352., Mar. 2006.

_____. et al. Identification of specific antigens of *Pseudomonas pseudomallei* and evaluation of their efficacies for diagnosis of melioidosis. **J Clin Microbiol**, v. 31, n.5, p.1232-1236, May. 1993.

ARMSTRONG, P.K. et al. Seroprevalence of *Burkholderia pseudomallei* in East Timorese refugees: implications for healthcare in East Timor. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 6, n. 6, p. 1496-1450, Nov. 2005.

ASHDOWN, L. R. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in the clinical laboratory. **J. Clin. Pathol.**, v. 32, p. 500-504, May. 1979.

_____. Indirect haemagglutination test for melioidosis. **Med. J. Aust.**, v. 147, p. 364-365, 1987.

_____. Relationship and significance of specific immunoglobulin M antibody response in clinical and subclinical melioidosis. **J Clin Microbiol**, v. 14, p. 361-364, 1981.

_____; GUARD, R.W. The Prevalence of Human Melioidosis in Northern Queensland. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 33, n. 3, p. 474-748, 1984.

BADSHA, H. et al. Melioidosis in systemic lupus erythematosus: the importance of early diagnosis and treatment in patients from endemic areas. **Lupus**, v. 10, n. 11, p. 821-823. 2001.

BARNES, P. F. et al. A case of melioidosis originating in North America. **Am Rev Respir Dis**, v. 134, n. 1, p.170-171, Jul. 1986.

BARTH, A. L. et.al. Cystic fibrosis patient with *Burkholderia pseudomallei* infection acquired in Brazil. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 12, p. 4077-4080, Dec. 2007.

BARTLEY, P. P. et al. Spinal cord disease due to melioidosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 93, n. 2, p. 175-176, Mar-Apr. 1999.

BEAMER, P. R. et al. Melioidosis; report of second case from the Western Hemisphere, with bacteriologic studies on both cases. **Am J Pathol**, v. 24, n. 3, p. 717, May. 1948.

BEAMER, P. R. et al. Studies on *Malleomyces pseudomallei* isolated from melioidosis originating in the Western Hemisphere. **Am J Clin Pathol**, v. 24, n. 11, p.1231-1240 Nov, 1954.

BIEGELEISEN, J.Z. JR; MOSQUERA, R.; CHERRY. W.B. A case of human melioidosis: clinical, epidemiological and laboratory findings. **Am J Trop Med Hyg**, v. 13, p. 89-99, 1964.

BRÄMER, C.O.P. et al. Polyhydroxyalkanoateaccumulating bacterium isolated from soil of a sugar-cane plantation in Brazil. **Int J Syst Evol Microbiol.** v. 51, p. 1709-1713, 2001.

BRUNDAGE, W.G.; THUSS, J.R.C.J.; WALDEN, D.C. Four fatal cases of melioidosis in U.S. soldiers in Vietnam. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.17, n .2, p. 183-191, 1968.

CARLSON, P; SEPPANEN, M. Melioidosis Presenting as Urinary Tract Infection in a Previously Healthy Tourist. **Scand J Infect Dis**, v. 32, p. 92-93, 2000.

CASTLE, J.I.; WONG, C.G.; HOLLAND, D.J. Melioidosis: an emerging disease in New Zealand? **N Z Med J**, v. 112, n. 1087, p. 168, 1999.

CDC- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Imported Melioidosis – South Florida, 2005. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep**, v.55, p. 873-876, 2006.

CDC- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Melioidosis General Information.** Disponível em:
<http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/melioidosis_gi.html>. Acesso em: 02 dez. 2008.

CHAMBON, L. Isolement du bacille de Whitmore a partir du milieu exterieur. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 89, p. 229-235, 1955.

CHAOWAGUL, W. et al. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in Northeastern Thailand. **J. Infect. Dis.**, v. 159, n. 5, p. 890-899, 1989.

_____. et al. Open-label randomized trial of oral trimethoprim-sulfamethoxazole, doxycycline, and chloramphenicol compared with trimethoprim-sulfamethoxazole and doxycycline for maintenance therapy of melioidosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 10, p. 4020-4025, Oct. 2005.

_____. et al. Relapse in melioidosis: incidence and risk factors. **J. Infect. Dis.** v. 168, p. 1181-1185, 1993.

CHANTATRITA, N. et al. Accuracy of ELISA using crude and purified antigens for the serodiagnosis of melioidosis. **Clin Vaccine Immunol.** v. 14, n. 1, p. 110-113, Jan. 2007.

CHENG, A.C.; CURRIE, B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management. **Clin Microbiol Rev**, v.18, p. 383-416, 2005.

CHENG, A.C. et al. Indirect hemagglutination assay in patients with melioidosis in Northern Australia **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 2, p. 330-334, 2006.

_____. et al. Outcomes of patients with melioidosis treated with meropenem. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 1763-1765, 2004.

_____. et al. A randomized controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor for the treatment of severe sepsis due to melioidosis in Thailand. **Clin Infect Dis.**, v. 45, n. 3, p. 308-314, Aug, 2007.

_____. et al. Strategies to reduce mortality from bacterial sepsis in adults in developing countries. **PLoS Med.**, v.5, n. 8 p. e175, Aug. 2008.

_____. et al. A proposed scoring system for predicting mortality in melioidosis. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 97, n.5, p. 577-581, 2003.

CHEN, Y.S. et al. Seroprevalence of anti-flagellin antibody against *Burkholderia pseudomallei* in Taiwan. **Jpn. J. Infect. Dis.**, v. 57, p. 224-225, 2004.

CHEN, W.T. et al. Seroprevalence of melioidosis in diabetic patients in Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect.**, v. 38, n. 4, p. 267-270, Aug. 2005.

CHEN, K.J. et al. *Burkholderia pseudomallei* endophthalmitis. **J Clin Microbiol.**, v. 45, n. 12, p.4073-4074, 2007.

CHENTAMARAKSHAN V, VADIVELU J, PUTHUCHEARY SD. Detection of immunoglobulins M and G using culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei*. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v. 39, p. 1-7, 2001.

CHENTHAMARAKSHAN, V. et al. Distribution of immunoglobulin classes and IgG subclasses against a culture filtrate antigen of *Burkholderia pseudomallei* in melioidosis patients. **J Med Microbiol.**, v.50, p. 55-61, 2001.

CHIERAKUL, W. et al. Two randomized controlled trials of ceftazidime alone versus ceftazidime in combination with trimethoprim-sulfamethoxazole for the treatment of severe melioidosis. **Clin Infect Dis.**, v. 41, n. 8, p. 1105-1113, Oct. 2005.

CHODIMELLA, U. et al. Septicemia and suppuration in a Vietnam veteran. **Hosp Pract.**, v. 32, p. 219-221, 1997.

CHOONHAKARN, C. E. K. JIRARATTANAPOCHAI. Cutaneous polyarteritis nodosa: a report of a case associated with melioidosis (*Burkholderia pseudomallei*). **Int J Dermatol**, v.37, n.6, p.433-6, Jun. 1998.

CHOY J. L. et. al. Animal melioidosis in Australia. **Acta Tropica**, v. 74, p. 153-158, 2000.

CHRISTENSON-BRAVO, B. et al. *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis): acute septicemia and meningitis in patient with systemic lupus erythematosus. **Bol Asoc Med P R**, v. 78; p. 347-349, 1986.

_____. et. al. Severe community-acquired pneumonia and sepsis caused by *Burkholderia pseudomallei* associated with flooding in Puerto Rico. **Bol Asoc Med P R**, v. 95, p. 17-20, 2003.

COENYE, T.; VANDAMME, P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches. **Environ Microbiol**, v. 5, p. 719-729, 2003.

COTTEW, G.S. Melioidosis in sheep in Queensland. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sc.**, v. 28, p. 677-683, 1950.

CURRIE, B.J. Melioidosis: an important cause of pneumonia in residents of and travellers returned from endemic regions. **Eur. Respir. J.**, v. 22, n. 3, p. 542-550, 2003.

_____.; JACUPS, S. Intensity of Rainfall and Severity of Melioidosis, Australia. **Emerg Infect Dis**, v. 12, n. 9, p. 1538-1542, 2003.

_____. et al. The epidemiology of melioidosis in Australia and Papua New Guinea. **Acta Tropica**, v. 74, p. 121-127, 2000.

_____. et al. Melioidosis epidemiology and risk factors from a prospective whole-population study in northern Australia. **Trop Med Int Health**, v. 9, n.1, p. 1167-1174, Nov. 2004.

_____. Melioidosis in Papua New Guinea: is it less common than in tropical Australia? **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 87, p. 417, 1993.

_____. et al. Endemic melioidosis in tropical Northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. **Clin Infect Dis**, v. 31, p. 981-986, 2000.

_____. et al. A cluster of melioidosis cases from an endemic region is clonal and is linked to the water supply using molecular typing of *Burkholderia pseudomallei* isolates. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 3, p. 177-179, 2001.

_____. et al. Melioidosis: acute and chronic disease, relapse and re-activation **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 94, p. 301-304, 2000.

DANCE, D.A.B. Ecology of *B. pseudomallei* and the interactions between environmental *Burkholderia* spp and human-animal hosts **Acta Trop**, v. 74, p. 159-168, 2000.

_____. et al. An outbreak of melioidosis in imported primates in Britain. **Vet. Rec.** v. 130, p. 525-529, 1992.

_____. Melioidosis: the tip of the iceberg? **Clin. Microbiol. Rev.**, v.4, n.1, p. 52-60, 1991.

_____. Melioidosis as an emerging global problem. **Acta Tropica**, v. 74, p. 115-119, 2000.

_____. et al. Imported melioidosis in England and Wales. **Lancet**, v. 353, p. 208, 1999.

_____. 2004. Recent insights into the epidemiology and distribution of melioidosis. In: WORLD MELIOIDOSIS CONGRESS, 4, 2004, Singapore. **Programme & Abstracts**. Singapore: 2004, p. 78.

_____. **Melioidosis**. In: GUERRANT, R.L.; WELLER, P.F.; WALKER, D.H. **Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice**. 2^a ed. New York: Elsevier Health Sciences, 2005. Cap. 39, p. 381-387.

_____. et. al. Identification of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice: use of simple screening tests and API 20NE. **J. Clin. Pathol.**, V. 42, p. 645-648, 1989.

_____. et al. Development of resistance to ceftazidime and co-amoxiclav in *Pseudomonas pseudomallei*. **J Antimicrob Chemother**, v. 28, n.2, p. 321-324, Ago. 1991.

DHARAKUL, T. et al. Diagnostic value of an antibody enzyme-linked immunosorbent assay using affinity-purified antigen in an area endemic for melioidosis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 56, n. 4, p. 418-423 Apr. 1997.

DORMAN, S.E. et al. *Burkholderia pseudomallei* infection in a Puerto Rican patient with chronic granulomatous disease: case report and review of occurrences in the Americas. **Clin Infect Dis**, v. 26, p. 889-894, 1998.

ELLIS, J.F.; TITBALL, R.W. *Burkholderia pseudomallei*: medical, veterinary and environmental aspects. **Infect. Dis. Rev**, v. 1, n. 3, p. 174-181, 1999.

ELLISON, D.W.; BAKER, H.J.; MARIAPPAN, M. Melioidosis in Malaysia I. A method for isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil and surface water. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 18, n. 5, p. 694-697, 1969.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Mapa-Exploratório Reconhecimento de solos do Estado do Ceará**. Fortaleza: UEP, 1973. 1 mapa color. Escala 1: 3020.

EZZEDINE, K; HEENEN, M; MALVY, M. Imported cutaneous melioidosis in traveler, Belgium. **Emerg Infect Dis**, v. 13, n. 6, Jun. 2007

FAA, A.G.; HOLT, P.J. Melioidosis in the Torres Strait islands of far North Queensland. **Commun Dis Intell**, v. 26, n. 2, p. 279-283, 2002.

FOURNIER, J. La mélioirose et le baccille de Whitmore. Controverses épidémiologiques et taxonomiques. **Bull Soc. Pathol. Exot.**, v.58, p. 753-765. 1965.

FUNCEME - FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS. Boletem Mensal de Chuvas. Disponível em: <http://www.funceme.br/DEPAM/index.htm>. Acesso em: 10 jan. 2008.

FUNCEME - FUNDAÇÃO CEARENSE DE METEOROLOGIA E RECURSOS HÍDRICOS. Solos – Classificações Técnicas. Disponível em: <http://www.funceme.br/DERAM/index.htm>. Acesso em: 10 jan. 2008.

GAL, D. et al. Contamination of hand wash detergent linked to occupationally acquired melioidosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, p. 360-362, 2004.

GALIMAND, M.; DODIN, A. Le point sur la mélioirose dans le monde. **Bull. Soc. Path.**, v. 75, p. 375-383. 1982.

GARRY, M. W.; KOCH M. L. Chronic melioidosis: bacteriologic and clinical correlation in diagnosis. **J Lab Clin Med**, v. 38, n. 3, p. 374-83, Sep. 1951.

GLASS, M. B; POPOVIC, T. Preliminary evaluation of the API 20NE and Rapid NF plus systems for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 1, p. 479-483, Jan. 2005.

GLASS, M. B. et al. Pneumonia and Septicemia Caused by *Burkholderia thailandensis* in the United States. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 12, p. 4601-4604, Dec. 2006.

GODOY, D. et al. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships among the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **J Clin Microbiol.**, v. 41, n. 5, p. 2068-2079, May. 2003.

GREEN, R.N.; TUFFNELL, P.G. Laboratory acquired melioidosis. **Am. J. Med.**, v. 44, p. 599-605, 1968.

HALDER, D. et al. Neonatal meningitis and septicaemia caused by *Burkholderia pseudomallei*. **Ann. Trop. Paediatr.**, v. 18, p. 161-164, 1998.

_____. Neurological melioidosis. **Acta Tropica**, v. 74, p. 145-151, 2000.

HAMBIE E.A. et al. Use of stable, sensitized cells in an indirect microhemagglutination test for melioidosis. **Clin Microbiol.**, v 5, n. 2, p. 167-171, Feb. 1977.

HENG, B.H. et. al. Epidemiological surveillance of melioidosis in Singapore. **Ann. Acad. Med. Singapore.**, v. 27, p. 478-484, 1998.

HICKS, C.; KINOSHITA, R.; LADDS, P. W. Pathology of melioidosis in captive marine mammals. **Aust. Vet. J.**, v. 78, p. 193-195, 2000.

HO, M. et al. Specificity and functional activity of anti-*Burkholderia pseudomallei* polysaccharide antibodies. **Infect Immun**, v. 65, p. 3648-3653, 1997.

HOLDEN, M.T.; TITBALL, R.W.; PEACOCK, S.J. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p. 14240-14245, 2004.

HOLLAND, D. et al. Cystic Fibrosis and *Burkholderia pseudomallei* Infection: An Emerging Problem? **Clin Infect Dis**, v. 35, n. 12, p. e138-140. Dec 15, 2002.

HOWARD, K.; INGLIS, T. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. **J. Clin. Microbiol**, v. 41, p. 3312-3316, 2003.

HOWE, C.; SAMPATH, A.S. The pseudomallei group: a review. **J Infect Dis**, v.124, n. 6, p. 598-606, 1971.

HPA-UK - UNITED KINGDOM HEALTH PROTECTION AGENCY. *Guidelines for Action in the Event of a Deliberate Release: Glanders & Melioidosis*, Out. 2008.

HSUEH, P.R. et al. Melioidosis: an emerging infection in Taiwan? **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 3, p. 428-433, 2001.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Cidades@**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 10 Out. 2008.

ILERI, S. The indirect haemagglutination tests in the diagnosis of melioidosis in goats. **Br. Vet. J**, v. 121, p. 164-170, 1965.

INGLIS, T.J.; ROLIM, D.B.; RODRIGUEZ, J.L. Clinical guideline for diagnosis and management of melioidosis. **Rev Inst Med Trop Sao Paul**, v. 48, n. 1, p. 1-4, Jan-Feb. 2006.

_____.; MEE, B.; CHANG, B. The environmental microbiology of melioidosis. **Rev. Med. Microbiol**, v. 12, p. 13-20, 2001.

_____.; ROLIM, D.B.; SOUSA, A.Q. Melioidosis in the Americas. **Am J Trop Med Hyg**, v. 75, n. 5, p. 947-954, Nov. 2006.

_____. et. al. Dry-season outbreak of melioidosis in Western Australia. **The Lancet**, v. 352, p. 1600, 1998.

_____. et al. *Burkholderia pseudomallei* traced to water treatment plant in Australia. **Emerg. Infect. Dis**. V. 6, P. 56-59, 2000.

_____. et al. Case report: recovery from persistent septicemic melioidosis. **Amer. J. trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 76-82, 2001.

_____. et al. Potential misidentification of *Burkholderia pseudomallei* by API 20NE. **Pathology**, v. 30, n. 1, p. 626-624, Feb. 1998.

_____.; SAGRIPANTI, J.L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Bpseudomallei*. **Appl Environ Microbiol**, v. 72, p. 6865-6875, 2006.

_____. et al. Preliminary report on thenorthern Australian melioidosis environmental surveillance project. **Epidemiol Infect**, v. 132, p. 813-820, 2004.

IPECE - INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ. **Perfil Básico Municipal - Tejuçuoca**. Fortaleza: IPECE, 2007. 10p.

IPECE - INSTITUTO DE PESQUISA E ESTRATÉGIA ECONÔMICA DO CEARÁ. **Perfil Básico Municipal - Banabuiú**. Fortaleza: IPECE, 2007. 10p.

ISSACK, M.I.; BUNDHUN, C.D.; GOKHOOL, H. Melioidosis in Mauritius. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 1, p. 139-140, Jan. 2005.

JESUDASON, M.V.; ANBARASU, A.; JOHN, T.J. Septicaemic melioidosis in a tertiary care hospital in south India. **Indian J Med Res**, v. 117, p. 119-121, Mar. 2003.

JOY, R.; SCALETTAR, R; SODEE, D. Optic and peripheral neuritis: probable effect of prolonged chloramphenicol therapy. **JAMA**, V. 173. P. 1731-1734. 1960.

JULIO, A; VILLAREAL, I.R. Melioidosis en Costa Rica: reporte del primer caso. **Acta méd. costarric.**, v. 42 n. 3, set. 2000.

KANAPHUN, P. et al. Serology and carriage of *Pseudomonas pseudomallei*: a prospective study in 1000 hospitalized children in northeast Thailand. **J. Infect. Dis**, v. 167, p. 230-233, 1993.

KANG, G. et al. Melioidosis in India. **Lancet**, v. 347, p. 1565-1566, 1996.

KETTERER, P.J.; DONALD, B.; ROGERS, R.J. Bovine melioidosis in South-Eastern Queensland. **Aust. Vet. J.**, v. 51, p. 395-398, 1975.

KOH, T. H. et al. Automated identification systems and *Burkholderia pseudomallei*. **J. Clin. Microbiol**, v. 41 p. 1809, 2003.

KOW, A. W. et al. Musculoskeletal melioidosis masquerading as diabetic amyotrophy. **Singapore Med J**, v. 46, n. 5, p. 233-235 May. 2005.

KUNAKORN M., et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for immunoglobulin M specific antibody for the diagnosis of melioidosis. **J Clin Microbiol**, v. 28, n. 6, p. 1249-1253 Jun. 1990.

LAROSA, S.P. et al. Decreased protein C, protein S, and antithrombin levels are predictive of poor outcome in Gram-negative sepsis caused by *Burkholderia pseudomallei*. **Int J Infect Dis**, v. 10, n. 1, p. 25-31, Jan. 2006.

LEE, N. et al. *Pseudomonas pseudomallei* infection from drowning: the first reported case in Taiwan. **J. Clin. Microbiol**, v. 22, p. 352-354, 1985.

LEE, S.W. et al. A Case of Melioidosis Presenting as Migrating Pulmonary Infiltration: The First Case in Korea. **J Korean Med Sci**, v. 20, p. 139-142, 2005.

LEELARASAMEE, A. et al. Isolation rates of *Burkholderia pseudomallei* among the four regions in Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.**, v. 28, n. 107-113, 1997.

_____. Melioidosis in Southeast Asia. **Acta Tropica**, v. 74, p. 129-132, 2000.

_____.; BOVORNKITTI S. Melioidosis: review and update. **Rev Infect Dis**, v. 11, p. 413-425, 1989.

_____. Diagnostic value of indirect hemagglutination method for melioidosis in Thailand. **J. Infect. Dis. Antimicrob. Agents.**, v. 2, p. 213-214, 1985.

LE HELLO, S. et al. Melioidosis in New Caledonia. **Emerg Infect Dis**, v. 11, n. 10, p. 1607-1609, Oct. 2005.

LEVY, A. et al. Expanded 374 range of *Burkholderia* species in Australia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 78, p. 599-604, 2008.

LIM M.K. et al. *Burkholderia pseudomallei* infection in the Singapore Armed Forces from 1987 to 1994--an epidemiological review. **Ann Acad Med Singapore**, v. 26, n. 1, p. 13-17, Jan. 1997.

LIMMATHUROTSAKUL, D. et al. Risk factors for recurrent melioidosis in northeast Thailand. **Clin Infect Dis**, v. 15, n. 43, p. 979-986, Oct. 2006.

_____. et al.. A Simple Scoring System to Differentiate between Relapse and Re-Infection in Patients with Recurrent Melioidosis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 2, n. 10, p. 327, Oct. 2008.

LOW, C. et al. Animal melioidosis in Australia. **Acta Trop**, v. 74, p. 153-158, 2000.

LOW, J.G.H. et al. Mycotic Aneurysm Due to *Burkholderia pseudomallei* Infection: Case Reports and Literature Review. **Clin Infect Dis**, v.40, p. 193-198, Jan. 2005.

LOWE, P.; ENGLER, C.; NORTON, R. Comparison of automated and nonautomated systems for identification of *Burkholderia pseudomallei*. **J. Clin. Microbiol**, v. 40, p. 4625-4627, 2002.

LUMBIGANON, P. et al. Neonatal melioidosis: a report of 5 cases. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 7, p. 634-636, 1988.

MACKOWIAK, P.A.; SMITH, J.W. Septicemic melioidosis. Occurrence following acute influenza A six years after exposure in Vietnam. **JAMA**, v. 240, p.764-766, 1978.

MAGALHAES, S. et al. Melioidose; diagnostico diferencial de tumor renal. **Acta Urol**, v. 2, p.31, 2003.

MAHARJAN, B. et al. Recurrent melioidosis in patients in northeast Thailand is frequently due to reinfection rather than relapse. **J Clin Microbio**, v. 43, n.12, p. 6032-6034, Dec. 2005.

MCCORMICK, J.B. et al. Wound infection by an indigenous *Pseudomonas pseudomallei*-like organism isolated from the soil: case report and epidemiologic study. **J Infect Dis**, v. 135, p. 103-107, 1977.

_____. et al. Human-to-human transmission of *Pseudomonas pseudomallei*. **Ann Intern Med**, v. 83, p. 512-513. 1975.

MACDOWELL, F.; VARNEY, P.L. Melioidosis: report of first case from the Western Hemisphere. **JAMA**, v. 134, p. 361-362, 1947.

MOLLARET, H.H. "L'affaire du Jardin des plantes" ou comment la mélioiïdose fit son apparition en France. **Med. Mal. Infect**, v. 18, p. 643-654, 1988.

NABIN, K. et al. Melioidosis imported into Nepal. **Scand J Infect Dis**, v. 37, p. 64-66, 2005.

NACHIANGMAI, N.P. *Pseudomonas pseudomallei* in southern Thailand. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 16, p. 83-87, 1985.

NGAUY, V.; LEMESHEV, Y.; SADKOWSKI L, C.G. Cutaneous melioidosis in a man who was taken as a prisoner of war by the Japanese during World War II. **J Clin Microbiol**, v. 43, p. 970-972, 2005.

NIMTZ, M. et al. Structure of an acidic exopolysaccharide of *Burkholderia pseudomallei*. **Eur J Biochem**, v. 250, n. 2, p. 608-616., Dec. 1997.

NUSSBAUM, J.J.; HULL, D.S.; CARTER, M.J. *Pseudomonas pseudomallei* in an anophthalmic orbit. **Arch Ophthalmol**, v. 98, p.1224-1225, 1980.

O'BRIEN, M., K. et al. Further evaluation of a rapid diagnostic test for melioidosis in an area of endemicity. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 5, p. 2239-2240, May. 2004.

OLIVE, C. et al. Forme septicopyohemique de melioidose humaine: um premier cas aux Antilles Francaises. **Presse Med**, v. 24, p. 1270, 1995.

PARRY, C.M.V. et al. Melioidosis in Southern Vietnam: Clinical surveillance and environmental sampling. **Clin Infect Dis**, v. 29, p. 1323-1326, 1999.

PEACOCK, S.J. Melioidosis. **Curr Opin Infect Dis**, v. 19, n.5, p. 421-288. Oct. 2006.

_____. et al. Management of accidental laboratory exposure to *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 7, p. e2 Jul. 2008.

PEETERMANS, W.E. et al. Melioidosis Brain and Lung Abscess After Travel to Sri Lanka. **Clin Infect Dis**, v. 28, p. 921-922, April. 1999.

PEREZ, J.M. et al. First case report of melioidosis in Guadeloupe, a French West Indies archipelago. **Clin Infect Dis**, v. 25, p. 164-165, 1997.

PESTANA DE CASTRO, A.F. et al. Considerações sobre a melioidose e o seu agente casual: *Pseudomonas pseudomallei*. **Rev. Inst. Méd.Trop. São Paulo.**, v. 15, p. 43-49, 1973.

PETKANJANAPONG, V. et al. Use of endotoxin antigens in enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of *P. pseudomallei* infections (melioidosis). **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 10, n. 2, p. 145-150, Dec. 1992.

PHETSOUVANH, R. et al. Melioidosis and Pandora's Box in the Lao People's Democratic Republic. **Clin Infect Dis**, v. 32, p. 653-54, 2001.

PHUNG, L.V.; QUYNH, E.Y.; DANCE, D.A.B. Pilot Study of exposure to *Pseudomonaspseudomallei* in Northern Vietnam. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg**, v. 87, p. 416, 1993.

PITT, T.L. **Pseudomonas, Burkholderia and related genera**. In: HAUSLER, W.J.; SUSSMAN, M. Vol. 2. **Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections**. **Arnold**. London: 1995. vol. 2, p. 1109-1138.

POE, R.H.; VASSALLO, C.L.; DOMM, B.M. Melioidosis: The remarkable imitator. **Am Rev Respir Dis**, v. 104, p. 427, 1971.

PONTES, G.N. et al. Human IgG but not IgM antibodies can protect mice from the challenge with live O6 *Escherichia coli*. **Scand J Immunol**, v. 62, p. 353-360, 2005

PUTHUCHEARY, S.D.; N. PARASAKTHI.; LEE, M. K. Septicaemic. melioidosis: a review of 50 cases from Malaysia. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, p. 683-685, 1992.

RAJA, N.S. Cases of melioidosis in a university teaching hospital in Malaysia. **J Microbiol Immunol Infect**, v. 41, p. 174-179, 2008.

RALPH, A.; MCBRIDE, J.; CURRIE, B.J. Transmission of *Burkholderia pseudomallei* via breast milk in northern Australia. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, v. 23, p. 1169-1171, 2004.

RAO, P.S.; DHAWAN, R.; SHIVANANDA, P.G. *Burkholderia pseudomallei* infections. **Trop Doct**, v. 32, n. 3, p. 174-175, Jul. 2002.

REDONDO, M.C. et al. Melioidosis Presenting as Sepsis Syndrome: A Case Report in Venezuela. In: INT. CONF. INFECT. DIS, 11TH , 2004, Cancun. **Abstr...** Cancun: 2004. abstr. 58.026.

RIMINGTON, R. A. Melioidosis in Northern Queensland. **Med. J. Aust.**, v. 1, p. 50-53, 1962.

ROLIM, D.B. et al. Melioidosis, northeastern Brazil. **Emerg Infect Dis**, v. 11, p. 1458-1460, 2005.

ROLIM, D.B. **Estudo epidemiológico do primeiro surto de melioidose no Brasil**. 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

ROTZ, L.D. et al. Public health assessment of potential biological terrorism agents. **Emerg Infect Dis**, v. 8, n. 2, p. 225-230, Fev. 2002.

SAM, I.C.; PUTHUCHEARY, S.D. Melioidosis and rainfall in Kuala Lumpur, Malaysia. **J Infect**, v. 54, n.5, p. 519-520, May. 2007.

SANFORD, J.P. *Pseudomonas* species (including melioidosis and glanders). In: G.L. MANDELL, G.L.; DOUGLAS, R.G.; BENNETT, J.E. **Principles and practice of infectious diseases**. 2nd. New York: ed. John Wiley & Sons. 1985. p. 1250-1254.

_____. Melioidosis: forgotten but not gone. **Trans Am Clin Climatol Assoc.** v. 89, p. 201-205, 1978.

SANTIAGO, R. M. F. W. **Identificação de Mormo em eqüinos no Estado do Ceará**. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 2000. Águas de Lindóia. **Anais**. Águas de Lindóia, 2000, p. 39.

SCHLECH, W. F. et al. Laboratory-acquired infection with *Pseudomonas pseudomallei* (melioidosis). **N. Engl. J. Med.**, v. 305, p. 1133-1135, 1981.

STEPHENSON, J. Secrets of the "Great Mimicker". **JAMA**, v. 292, n. 15, p. 1810, Oct. 2004.

SHIH, H.I. et al. Sporadic and Outbreak Cases of Melioidosis in Southern Taiwan: Clinical Features and Antimicrobial Susceptibility. **Infection**, Oct. 2008

SHORT B.H. Melioidosis: an important emerging infectious disease – a military problem? **ADF Health**, v. 3, p. 13-21, 2002.

SILVA, S.L. et al. Bacteriological evaluation of wounds in seriously burned hospitalized patients. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 24, p. 163-168, 1991.

SIMPSON, A.J. et al. Comparison of imipenem and ceftazidime as therapy for severe melioidosis. **Clin. infect. Dis.**, v. 29, p. 381-387, Ago. 1999.

SIRISINHA, S. et al. Recent developments in laboratory diagnosis of melioidosis. **Acta Trop**, v. 74, n. 2-3, p. 235-245, Feb. 2000.

SIRISINHA, S. Diagnostic value of serological tests for melioidosis in an endemic area. **Asian Pac J Allergy Immunol**, v. 9, n. 1, p.1-3, Jun. 1991.

SO, S.Y. et al. Melioidosis: a serological survey in a tuberculosis sanatorium in Hong Kong. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 81, n. 6, p. 1017-1019, 1987.

SPRAGUE L.D.; NEUBAUER H. Melioidosis in animals: a review on epizootiology, diagnosis and clinical presentation. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public**, v. 51, n. 7, p. 305-320, 2004.

SRIROMPOTONG, S; SAENG-SA-ARD, S. Acute Suppurative Parotitis. **J Med Assoc Thai**, v. 87, n. 6, p. 694-696, 2004.

STANTON, A.T.; FLETCHER, W. Melioidosis: studies from the Institute of Medical Research, Federated Malay States; 21. London: John Bale and Sons and Danielson Ltd, 1932.

STONE, R. Infectious disease. Racing to defuse a bacterial time bomb. **Science**, v. 317, n. 5841, p. 1022-1024, Aug. 2007.

STRAUSS, J.M. et al. Melioidosis in Malaysia II. Distribution of *Pseudomonas pseudomallei* in soil and surface water. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 18, n. 5, p. 698-702, 1969.

_____. et al. Melioidosis in Malaysia. III. Antibodies to *Pseudomonas pseudomallei* in the human population. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 18, p. 703-707, 1969.

SU,H.P. et. al. Prevalence of Melioidosis in the Er-Ren River Basin, Taiwan: Implications for Transmission. **J. Clin. Microbiol**, v. 45, n. 8, p. 2599-2603, 2007.

SUPUTTAMONGKOL, Y. et al. The Epidemiology of melioidosis in Ubon Ratchatani, Northeast Thailand. **Int. J. Epidemiol.**, v. 23, p. 1082-1090, 1994.

_____. et al. Risk factors for melioidosis and bacteremic melioidosis. **Clin. infect. Dis.**, v. 29, p. 408-413, 1999.

SUTMOLLER, P.; KRANEVELD, F.C.; VAN DER SCHAAF, A. Melioidosis (*Pseudomalleus*) in sheep, goats, and pigs on Aruba (Netherland Antilles). **J Am Vet Med Assoc**, v. 130, p. 415-417, 1957.

SVENSSON, E. et al. Cutaneous melioidosis in a Swedish tourist after the tsunami in 2004. **Scand J Infect Dis**, v. 38, n.1. p. 71-74, Jan. 2006.

TONG, S. et al. Laboratory investigation of ecological factors influencing the environmental presence of *Burkholderia pseudomallei*. **Microbiol. Immunol**, v. 40, p. 451-453, 1996.

THOMAS A.D. Evaluation of the API 20E and Microbact 24E systems in the identification of *Ps pseudomallei*. **Vet Microbiol**, v. 8, p. 611-615, 1983.

_____; FORBES-FAULKNER, J.; PARKER, M. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from clay layers at defined depths. **Am J Epidemiol**, v. 110, p. 515-521, 1979.

TIYAWISUTSRI, R. et al. Antibodies from patients with melioidosis recognize *Burkholderia mallei* but not *Burkholderia thailandensis* antigens in the indirect hemagglutination assay. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 9, p. 4872-4874, Sep. 2005.

TRAKULSOMBOON, S. et al. Epidemiology of arabinose assimilation in *Burkholderia pseudomallei* isolated from patients and soil in Thailand. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.**, v. 30; p. 756-759, 1999.

TSAI, C.M.; FRASCH, C.E. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharide in polyacrylamide gels. **Anal Biochem**, v. 119, p. 115-119, 1982.

USINGER, W.R.; LUCAS, A.H. Avidity as a determinant of the protective efficacy of human antibodies to pneumococcal capsular polysaccharides. **Infect Immun**, v. 67, n. 2366-2370, 1999.

VADIVELU, J. et al. Serodiagnosis of melioidosis in Malaysia. **Singapore med. J**, v. 36, p. 299-302, 1995.

VAN PEENEN, P.F. et al. Seroepidemiological survey of hospital-associated populations in Colombo, Sri Lanka. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 1, p. 16-20, Mar. 1976.

VAUCEL, M. Presence probable du bacille de Whitmore dans l'eau de mare au Tonkin. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, v. 30, p. 10-15, 1937.

WEBLING, D.D.A. Genito-urinary infections with *Pseudomonas pseudomallei* in Australian aboriginals. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, n. 1, p. 138-139, 1980.

WUTHIEKANUN, V. et al. Isolation of *Pseudomonas pseudomallei* from soil in north-eastern Thailand. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 89, p. 41-43, 1995.

_____.; SMITH, M.D.; WHITE, N.J. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in the absence of nutrients. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 89, p.491 1995.

_____. et al. Detection of *Burkholderia pseudomallei* in soil within the Lao People's Democratic Republic. **Clin Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 923-924, Feb. 2005.

_____. et al. *Burkholderia pseudomallei* antibodies in children, Cambodia. **Emerg Infect Dis**, v. 14, n. 2, p. 301-303, Feb. 2008.

_____.; PEACOCK, S.J. Management of melioidosis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 4, n. 3, p. 445-455, Jun. 2006.

_____. et al. Development of antibodies to *Burkholderia pseudomallei* during childhood in melioidosis-endemic northeast Thailand. **Am J Trop Med Hyg**, v. 74, n. 6, p.1074-1075, 2006.

_____. et al. The use of selective media for the isolation of *Pseudomonas pseudomallei* in clinical practice. **J. Med. Microbiol**, v. 33, p. 121-126, 1990.

WHITE, N.J. et al. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. **Lancet**, v. 2, p. 697-701, 1989.

_____. Melioidosis. **Lancet**. v. 361, p. 1715–1722, 2003.

WHITMORE A. An account of a glanders-like disease occurring in Rangoon. **J. Hyg.** v.13, p. 1-34, 1913.

YABUUCHI, E. et al. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov. **Microbiol. Immunol**, v. 36, p. 1251-1275, 1992.

YANG, S. et al. Prevalence of human melioidosis on Hainan Island in China. **Microbiol Immunol**, v. 42, n.9, p. 651-654, 1998.

YANG, I.H. et al. Melioidosis with endophthalmitis. **Arch Ophthalmol**, v. 124, n. 10, p. 1501-1502, Oct. 2006.

YAP, E.H. et al. Serodiagnosis of melioidosis in Singapore by the indirect haemagglutination test. **Singapore med. J**, v. 32, p. 211-213, 1991.

APÊNDICES

Apêndice I

QUESTIONÁRIO DE INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

IDENTIFICAÇÃO

Mora na localidade desde 2003? _____

Nome _____

Data do Nascimento: __/__/____ Idade ____ Sexo ____ Raça/Cor _____

Escolaridade: () analfabeto () ensino fundamental () 2º grau () superior

Ocupação: _____

Local de trabalho _____

Nome da mãe _____

Localidade: _____

Distrito: _____

Casa: _____ Complemento: _____

Município: _____

Telefones _____

Ponto de referência: _____

Responsável: _____

INVESTIGAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA RESPOSTAS 1.Sim 2.Não 3. Ignorado
(não sabe)

Doença preexistente

() diabetes mellitus () doença renal crônica () doença pulmonar crônica

() doença do fígado () asma () doença que precise de acompanhamento em Fortaleza

Qual: _____

Uso de medicamento ou drogas

() prednisona, meticorten () medicamento para câncer, lúpus ou artrite

() drogas ilícitas () álcool

Tempo de uso : _____

Familiar de paciente com melioidose confirmada:

1.Sim 2.Não 3. Ignorado (não sabe)

Participante do estudo sorológico anterior:

1.Sim 2.Não 3. Ignorado (não sabe)

Familiar de paciente do estudo sorológico anterior:

1.Sim 2.Não 3. Ignorado (não sabe)

Lesões cutâneas ()

Tempo de evolução da lesão: _____

Exposição à água (contato com água)

Açude

Época: Inverno - I Verão - V 12 meses do ano - C

Tipo de atividades praticadas:

Agricultura - a Banho - b Consumo de água - c Lazer ocasional - l Pescaria - p

Lavagem de roupa - r

Rios

Época: Inverno - I Verão - V 12 meses do ano - C

Tipo de atividades praticadas:

Agricultura - a Banho - b Consumo de água - c Lazer ocasional - l Pescaria - p

Lavagem de roupa - r

Barragens

Época: Inverno - I Verão - V 12 meses do ano - C

Tipo de atividades praticadas:

Agricultura - a Banho - b Consumo de água - c Lazer ocasional - l Pescaria - p

Lavagem de roupa - r

Riacho/barreiro

Época: Inverno - I Verão - V 12 meses do ano - C

Tipo de atividades praticadas:

Agricultura - a Banho - b Consumo de água - c Lazer ocasional - l Pescaria - p

Lavagem de roupa - r

Poço/cacimba/cacimbão

Época: Inverno - I Verão - V 12 meses do ano - C

Tipo de atividades praticadas:

Agricultura - a Banho - b Consumo de água - c Lazer ocasional - l Pescaria - p

Lavagem de roupa - r

Cisterna/tanque

Época: Inverno - I Verão - V 12 meses do ano - C

Tipo de atividades praticadas:

Agricultura - a Banho - b Consumo de água - c Lazer ocasional - l Pescaria - p

Lavagem de roupa - r

Área de irrigação ()arroz ()outra Qual?

Época: Inverno - I Verão - V 12 meses do ano - C

Tipo de atividades praticadas:

Agricultura - a Banho - b Consumo de água - c Lazer ocasional - l Pescaria - p

Lavagem de roupa - r

Quais dos seguintes locais você frequenta ou frequentou:

()Rio Caxitoré ()Açude Alegre ()Açude Querida ()Barragem do Caxiitoré

()Barragem do Alegre ()Barragem do Mulungu ()Ranário

Água para consumo

Tipo de tratamento () hipoclorito caseiro ()fervura ()nenhum

Procedência INVERNO

()chuvas recentes ()armazenamento em cisternas/tanque ()açudes ()rios ()

cacimba/cacimbão ()poços profundos () carro-pipa

Procedência VERÃO

()armazenamento em cisternas ()açudes ()rios () cacimba/cacimbão

()poços profundos () carro-pipa

Água para banho

Tipo de tratamento () hipoclorito caseiro ()fervura ()nenhum

Procedência INVERNO

chuvas recentes armazenamento em cisternas/tanque açudes rios

cacimba/cacimbão poços profundos carro-pipa

Procedência VERÃO

armazenamento em cisternas açudes rios cacimba/cacimbão

poços profundos carro-pipa

Água para atividades domésticas

Tipo de tratamento hipoclorito caseiro fervura nenhum

Procedência INVERNO

chuvas recentes armazenamento em cisternas/tanque açudes rios

cacimba/cacimbão poços profundos carro-pipa

Procedência VERÃO

armazenamento em cisternas açudes rios cacimba/cacimbão

poços profundos carro-pipa

Exposição à solo (contato com solo)

plantações jardinagem horta lazer varredura com formação de poeira

criação de animais construção civil escavações olaria

perfurações de poços pocilgas

Agricultura: arroz milho feijão algodão mandioca frutas

hortaliças cana de açúcar

Outra: _____

Presença de animais/aves no domicílio e/ou peridomicílio

caprinos e ovinos eqüinos bovinos suínos aves peixes

Outro: _____

Tipos de animais domésticos: cão gato porco aves peixe

Deslocamentos ou viagens

No município: distritos vizinhos sede municípios vizinhos

Local: _____

Regiões do Brasil: norte nordeste sudeste centro-Oeste sul

Local:

Residência anterior

No município: distrito de moradia distritos vizinhos sede

Local: _____ Tempo: _____

Local: _____ Tempo: _____

Municípios vizinhos: região norte sertão central sul litoral

Local: _____ Tempo: _____

Local: _____ Tempo: _____

Regiões do Brasil: norte nordeste sudeste centro-Oeste sul

Local: _____ Tempo: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____ acredito ter sido suficientemente esclarecido a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim sobre o “Estudo soroepidemiológico em duas comunidades com registros de casos clínicos de melioidose no Estado do Ceará”.

Eu discuti com o Dr. Jorge Luis Nobre Rodrigues e com a Dra. Dionne Bezerra Rolim ou pessoa autorizada por eles sobre a minha decisão de participar deste estudo. Ficaram claros para mim os motivos para a realização deste estudo, todos os procedimentos a serem realizados e as garantias de que haverá sigilo e esclarecimentos durante todo o período do estudo. Ficou claro também que não há nenhum risco para minha saúde, não haverá nenhum custo financeiro para mim e o resultado do estudo será comunicado para mim.

Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades, prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido. Estou ciente ainda de que meu nome será mantido em absoluto sigilo por partes dos pesquisadores. Se eu precisar de quaisquer outros esclarecimentos, ou caso tenha dúvidas, estou ciente de que devo entrar em contato com os coordenadores da pesquisa, Dr. Jorge Luis Nobre Rodrigues (Fone:(85) 99825200 e Dra. Dionne Bezerra Rolim (Fone: (85) 31015212/99941263) ou, ainda poderei solicitar informação ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará através do seguinte telefone (85) 340098338.

_____	___/___/_____
Assinatura do participante (a)	Data

_____	___/___/_____
Assinatura da testemunha	Data

.....
(somente para o responsável pelo projeto)

Declaro ter obtido de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____	___/___/_____
Assinatura do responsável pelo estudo	Data

Apêndice II

Município de Tejuçuoca

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
1	F	24	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	SIM	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/100
2	M	22	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	SIM	SIM	NÃO	1/200	1/100
3	F	51	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	FUNCION. PUB.	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/100
4	F	32	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	SIM	NÃO	LAR	SIM	SIM	NÃO	1/100	1/400
5	M	13	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	Não	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/100	NEG
6	F	7	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
7	M	70	SIM	Tejuçuoca	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	SIM	SIM	NÃO	1/100	1/200
8	F	93	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/200
9	F	34	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/400
10	F	5	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/200
11	M	11	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/200
12	M	4	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	SIM	NÃO	1/200	NEG
13	F	28	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/800
14	F	4	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	NEG
15	F	18	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/400
16	F	4	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/100
17	M	76	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	HANSEN	NEG	1/400
18	M	46	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/1600
19	F	38	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	COSTUREIRA	NÃO	SIM	NÃO	1/100*	1/200
20	F	10	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/100
21	F	9	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
22	F	61	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/800
23	F	30	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/400
24	F	5	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	NEG

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
25	M	8	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
26	F	76	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	NEG*	1/100
27	M	82	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	APOSENTADO	NÃO	SIM	NÃO		
28	M	9	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	NEG
29	F	48	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AUX. ENFER	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/200
30	M	10	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NI	NI	NÃO	1/100	NEG
31	M	52	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/100
32	M	23	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	COMERCIANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/1600
33	F	54	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	SIM	NÃO	PROFESSORA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/200
34	M	42	SIM	Tejuçuoca	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/200
35	F	80	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	APOSENTADO	NÃO	SIM	NÃO	NEG	1/100
36	M	41	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	APOSENTADO	NÃO	SIM	DÇ MENTAL	1/100	1/100
37	F	30	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	PROFESSORA	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/200
38	M	26	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	SIM	NÃO	MOTORISTA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/800
39	F	5	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/400	NEG
40	F	16	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	SIM	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/400	1/100
41	F	13	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/100
42	F	39	SIM	Tejuçuoca	SIM	SIM	NÃO	SIM	FUNC PUB	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/100
43	F	19	SIM	Tejuçuoca	SIM	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/200
44	F	16	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/100
45	F	19	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	SIM	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/100
46	M	63	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/400
47	F	62	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/800
48	F	17	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/800	1/400
49	M	42	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/400
50	M	49	SIM	Tejuçuoca	SIM	SIM	NÃO	SIM	AGRICULTURA	SIM	SIM	PNEUM	NEG	1/800
51	M	8	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/400	1/100
52	M	4	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/400	1/100

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
53	M	49	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/400
54	F	12	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/400	NEG
55	F	57	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/800
56	F	16	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/200
57	M	41	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/400
58	F	63	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	NEG	1/200
59	F	16	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	Melioidose	1/200	1/800
60	F	4	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/200
61	M	3	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	NEG
62	F	39	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/800
63	F	21	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	FUNC. PUB	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/200
64	M	2	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	NEG
65	M	43	SIM	Tejuçuoca	SIM	SIM	SIM	NÃO	AGRICULTURA	SIM	NÃO	NÃO	1/100	1/400
66	F	38	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGENTE SAUDE	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/100
67	M	3	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/100
68	F	46	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/200
69	M	46	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/200
70	F	43	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/400
71	F	13	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/200	NEG
72	M	44	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/200
73	F	10	NÃO	Tejuçuoca										
74	M	61	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	COMERCIANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/100
75	F	26	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/400
76	F	8	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	NEG
77	M	7	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/100
78	M	6	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/400	NEG
79	F	40	NÃO	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	FUNC. PUB	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/800
80	M	40	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	PEDREIRO	SIM	SIM	NÃO	1/100	1/200

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
81	M	18	SIM	Tejuçuoca	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	NEG
82	F	27	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/400*	NEG
83	M	11	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	1/100
84	M	10	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	NEG	1/100
85	F	7	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	1/100
86	M	42	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/200	1/200
87	F	4	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/100	NEG
88	M	43	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/200	1/200
89													-	-
90	M	52	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Sim	Não	Não	NEG	1/400
91	M	23	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Sim	Agricultor	Sim	Não	Não	1/200	1/100
92	F	61	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/100*	1/100
93	F	40	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/200	1/400
94	F	8	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Sim	Não	1/400	NEG
95	F	18	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Sim	Não	1/200	1/400
96	M	64	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	NEG	1/200
97	M	13	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	NEG	1/400
98	F	78	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/100	1/200
99	M	48	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/100	1/200
100	F	27	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Func. Pub.	Não	Sim	Não	1/100	1/200
101	M	43	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/100	1/200
102	F	42	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	NEG	1/400
103	M	17	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Sim	Sim	Não	1/100	1/400
104	M	20	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Sim	Não	Não	1/100	1/400
105	M	47	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	NEG	1/400
106	F	26	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Não	Não	1/100	1/800
107	F	7	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/100	1/400
108	M	9	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/100	1/100

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
109	M	40	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Pedreiro	Sim	Não	Não	1/100	1/200
110	F	22	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/100	1/800
111	M	23	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/100	1/800
112	F	4	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Menor	Não	Não	Não	1/200	1/100
113	F	23	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/200	1/100
114	M	35	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/200	1/800
115	F	4	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Menor	Não	Não	Não	1/400	NEG
116	F	3	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Menor	Não	Não	Não	1/400	NEG
117	M	20	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Sim	Sim	Não	1/200	1/800
118	M	46	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Sim	Não	Não	1/100	1/800
119	M	16	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/100	1/200
120	F	40	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/400	1/400
121	F	13	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	NEG	1/400
122	M	5	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Menor	Não	Não	Não	1/100	1/100
123	M	10	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	1/200
124	F	36	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Func. Pub.	Não	Sim	Não	1/200	1/400
125	M	12	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Sim	Sim (calazar*)		1/100
126	F	47	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/200	1/800
127	M	6	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Menor	Não	Não	Não	1/200	1/200
128	F	13	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Sim	Não	1/200	1/400
129	M	51	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Não	Não	NEG	1/400
130	F	29	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/400	1/400
131	M	38	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Sim	Agricultor	Não	Sim	Sim (malária)	1/200	1/400
132	M	9	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Sim	Não	1/400	1/100
133	F	55	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	NEG	1/400
134	M	18	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/200	1/200
135	F	23	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Sim	Não	Não	1/400	1/200
136	F	12	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Sim	Não	1/200	1/100

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
137	M	10	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	NEG
138	M	43	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Não	Agricultura	Não	Não	Não	1/200	1/100
139	M	14	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	NEG	1/400
140	M	20	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultura	Não	Não	Não	1/400	1/100
141	F	70	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/200	1/200
142	M	14	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/400	NEG
143	F	56	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultura	Não	Sim	Não	NEG	1/400
144	F	83	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/200	1/400
145	F	33	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Não	Agricultura	Não	Sim	Não	1/400	1/100
146	M	30	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultura	Sim	Não	Não	1/200	1/200
147	F	67	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/100	1/100
148	M	68	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Não	Agricultura	Sim	Não	Não	1/100	1/200
149	F	27	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/400	1/100
150	F	14	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Sim	Não	1/200	1/100
151	M	18	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Não	Agricultura	Não	Não	Não	1/100	1/100
152	F	42	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	NEG	1/200
153	M	43	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Sim	Agricultura	Não	Não	Não	1/100	1/200
154	F	12	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Sim	Não	NEG	1/100
155	F	66	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultura	Não	Sim	Não	NEG	1/200
156	M	75	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultura	Não	Não	Não	NEG	1/200
157	F	15	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Sim	Não	1/200	1/100
158	M	14	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Sim	Não	1/100	NEG
159	F	35	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultura	Não	Sim	Não	1/400	1/200
160	M	38	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultura	Sim	Não	Não	1/200	1/400
161	M	43	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Autônomo	Não	Não	Não	1/100	1/200
162	M	22	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultura	Não	Não	Não	1/200	1/100
163	M	16	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/100	1/200
164	F	76	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	NEG	1/100

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
165	M	53	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Sim	Aposentado	Sim	Não	Não	1/200	1/200
166	F	26	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/200	1/400
167	M	49	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Sim	Agricultor	Não	Não	Não	1/100	1/400
168	M	38	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/200	NEG
169	F	9	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	1/100
170	F	31	Não	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Não	Professora	Não	Sim	Não	1/100	1/100
171	M	17	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Educador	Não	Não	Não	1/100	1/400
172	M	27	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Não	Sim	Agricultor	Sim	Não	Não	1/200	1/400
173	M	52	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Não	Não	NEG	1/800
174	F	51	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/100	NEG
175	M	25	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Não	Não		
176	M	21	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/100	1/100
177	F	45	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/200	1/400
178	M	24	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Sim	Sim	Agricultor	Não	Não	Não	1/200	1/400
179	M	11	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Estudante	Não	Não	Sim (calazar)	1/100	1/100
180	M	24	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	NEG	1/100
181	M	48	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Não	Sim (neurocist)	1/100	1/800
182	M	14	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	1/800
183	F	13	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/200	1/200
184	M	17	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/200	1/200
185	F	34	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Lar	Não	Sim	Não	1/200	1/800
186	M	68	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Sim	Não	Agricultor	Sim	Não	Não	NEG	1/800
187	M	53	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Administrador	Não	Não	Não	1/100	1/200
188	M	26	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Administrador	Não	Sim	Não	1/200	1/100
189	M	48	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/200	1/800
190	F	74	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/100	1/400
191	M	80	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	NEG	1/800
192	M	22	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/100	1/100

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
193	F	39	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/400	1/200
194	M	21	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/100	NEG
195	M	6	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Menor	Não	Não	Não	1/100	NEG
196	F	9	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Menor	Não	Não	Não	1/400	1/400
197	M	16	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Sim	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/100	1/100
198	M	6	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Menor	Não	Não	Não	1/400	1/100
199	M	5	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Menor	Não	Não	Não	1/400	1/100
200	M	36	Sim	Tejuçuoca	Sim	Sim	Sim	Sim	Agricultor	Sim	Não	Não	NEG	1/200
201	F	10	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Menor	Não	Não	Paralisia cerebral?	1/200	1/400
202	M	26	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/100	NEG
203	F	31	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Sim	Sim	Não	1/200	1/400
204	M	12	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	NEG
205	M	12	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	NEG
206	M	12	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/100	1/100
207	F	13	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	1/100
208	M	10	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/400	1/100
209	F	8	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	NEG
210	M	19	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/200	1/200
211	F	40	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Asma, Prednisona	1/200	1/400
212	F	4	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/400	NEG
213	F	9	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Asma	1/400	1/400
214	F	28	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Sim	Não	1/100	1/400
215	M	7	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	1/200
216	F	6	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/200	1/400
217	F	5	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/400	1/100
218	F	9	Não	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Estudante	Não	Não	Não	1/800	1/200
219	M	31	Sim	Tejuçuoca	Não	Sim	Não	Não	Agricultor	Não	Não	Não	1/200	1/200

Município de Banabuiú

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
1	F	23	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	Sim	NÃO	1/100	1/200
2	F	15	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	Sim	NÃO	1/100	1/100
3	M	23	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/800
4	F	58	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	Sim	NÃO	NEG	NEG
5	F	11	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/400	NEG
6	M	20	Sim	Banabuiú	SIM	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	1/400	1/100
7	M	37	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	1/400
8	M	2	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	-	-
9	F	34	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	Sim	NÃO	1/100	1/200
10	M	15	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
11	M	38	Sim	Banabuiú	SIM	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	1/100
12	M	55	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	1/200
13	M	7	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	Hepatite	1/100	1/100
14	M	4	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/200
15	F	39	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	Sim	NÃO	1/100	1/200
16	M	20	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	NEG
17	M	56	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/400
18	F	56	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	Sim	NÃO	1/400	1/100
19	F	75	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	Sim	NÃO	1/100	1/800
20	M	43	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	Sim	NÃO	1/100	1/400
21	F	57	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	Sim	NÃO	1/200	1/400
22	M	28	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/200
23	F	20	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	Sim	NÃO	1/200	1/800
24	M	12	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	SIM	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/400

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
25	M	55	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	ASMA	1/400	1/200
26	F	12	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	ESTUDA NTE	NÃO	Sim	NÃO	NEG	1/400
27	F	14	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	ESTUDA NTE	NÃO	Sim	NÃO	NEG	NEG
28	M	36	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	HEPATITE	1/400	1/100
29	M	23	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/100
30	M	58	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	SIM	NÃO	NÃO	1/100	1/400
31	M	34	Sim	Banabuiú	SIM	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	1/400	1/200
32	F	6	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	CALAZAR	1/100	1/800
33	M	9	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	CALAZAR	1/100	NEG
34	F	10	NÃO	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	CALAZAR	1/400	NEG
35	M	39	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	1/100*	1/200
36	F	13	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	Sim	NÃO	NEG	NEG
37	M	52	Sim	Banabuiú	SIM	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	1/400
38	F	55	Sim	Banabuiú	NÃO	Sim	NÃO	NÃO	Agricultura	NÃO	Sim	NÃO	NEG	1/200
39	F	41	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	EPILEPSIA	1/200	1/800
40	F	6	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
41	M	9	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/800	1/400
42	F	5	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	NEG
43	M	58	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/200
44	M	70	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	SIM	NÃO	NÃO	1/100	1/800
45	M	34	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	1/400
46	F	23	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/100
47	M	5	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	NEG
48	F	6	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/100
49	M	42	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
50	F	11	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/200
51	F	7	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/100

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
52	F	57	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	APOSENTADA	NÃO	SIM	ASMA	1/100	1/200
53	F	47	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/400
54	F	64	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	APOSENTADA	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/200
55	M	42	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/800	1/100
56	M	71	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	1/400
57	F	49	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	HEPATITE	1/400	1/200
58	M	45	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	SIM	NÃO	NÃO	1/100	NEG
59	F	5	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/100
60	F	7	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
61	F	24	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/400
62	F	34	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	NEG	1/200
63	M	68	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	1/400
64	M	10	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	NEG
65	M	8	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	NEG
66	M	13	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	NEG
67	F	36	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	NEG	1/100
68	F	9	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	NEG
69	F	30	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/400
70	M	32	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/400	1/200
71	F	25	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/100
72	M	5	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/100
73	M	33	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	1/400
74	F	67	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	-	1/400
75	M	20	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
76	M	37	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/200
77	F	81	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	CANCER	1/100	1/1600
78	F	32	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/100

	Sexo	Idade	Agricult	Município	Desl. Est.	Res. Loc.	Res. Cea	Res. Bra	Profissão	Construção	Lavagem de roupa	Doença prévia	IgM	IgG
79	F	10	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/400	NEG
80	M	4	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	NEG
81	F	5	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/100
82	F	13	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/400	NEG
83	F	63	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/100	1/100
84	M	50	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	SIM	NÃO	PEDREIRO	SIM	NÃO	MALÁRIA	NEG	1/100
85	F	62	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/800
86	F	25	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/400
87	M	32	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/400
88	F	23	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	SIM	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	NEG	1/100
89	F	8	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	NEG
90	F	31	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/400	1/100
91	F	11	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	ESTUDANTE	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
92	M	76	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	1/400
93	M	44	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	NEG
94	F	34	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	1/200	1/800
95	M	53	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	SIM	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/400
96	F	77	NÃO	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	LAR	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/100
97	M	86	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	1/800
98	M	61	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	SIM	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/100
99	M	29	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	SIM	SIM	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
100	F	51	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	CARDIOPATIA	1/400	1/200
101	M	43	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/200	1/200
102	F	21	SIM	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	SIM	NÃO	-	1/200
103	M	4	NÃO	Banabuiú	NÃO	SIM	NÃO	NÃO	MENOR	NÃO	NÃO	NÃO	NEG	NEG
104	M	31	SIM	Banabuiú	SIM	SIM	NÃO	NÃO	AGRICULTURA	NÃO	NÃO	NÃO	1/100	1/100

ANEXOS

Anexo II

MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

ASHDOWN

Objetivo:

Empregado como meio seletivo para o crescimento de *Burkholderia pseudomallei*.

Descrição:

É constituído pelos seguintes componentes:

Agar tripticase soja.....	11
Glicerol.....	4%
Cristal violeta.....	5 mg
Vermelho neutro.....	50 mg
Gentamicina.....	4 mg

Preparo:

Homogenizar os componentes descritos acima (com exceção da gentamicina) e autoclavar à 121°C por 15 minutos. Deixar esfriar à 50°C e adicionar a gentamicina. Homogenizar e distribuir em placas de Petri.

ÁGAR ESTOQUE

Objetivo:

Empregado na manutenção das amostras bacterianas.

Descrição:

É constituído dos seguintes componentes por litro de água destilada:

Extrato de carne.....	3.0g
Peptoma.....	10.0g
Cloreto de Sódio.....	5.0g
Ágar.....	4.0g
Água destilada.....	1000ml

Preparo:

Dissolver todos os componentes em água destilada e aquecer até a liquefação completa do ágar. Distribuir em alíquotas de 3ml, em tubos de 10x70mm com tampão de algodão e autoclavar à 121°C por 15 minutos. Após o processo de esterilização trocar os tampões de algodão por tampas de borracha estéreis. Estocar à temperatura ambiente.

ÁGAR CHOCOLATE**Objetivo:**

Utilizado como meio de isolamento primário.

Composição:

Meio Columbia estéril.....	250ml
Sangue de carneiro desfibrinado.....	12,5ml

Preparo:

Misturar o meio Columbia com sangue de carneiro em um balão de vidro, em seguida aquecer em manta aquecedora à 100°C. Deixar em aquecimento até a mudança de cor do meio, que inicialmente é vermelho e depois muda para marrom (cor de chocolate).

Distribuir em placas de Petri previamente esterilizadas.

ÁGAR MAC CONKEY

Objetivo:

Utilizado como teste de crescimento.

Descrição:

O Ágar Mac Conkey é um meio sintético pronto, bastando para o seu uso adicionar-se água destilada e esterilizar.

Peptona.....	17g
Prótese peptona.....	3.0g
Sais de bile no 3.....	10g
Cloreto de sódio.....	1,5g
Ágar.....	13,5g
Vermelho neutro.....	0,03g
Cristal violeta.....	0,001g
Água destilada.....	1000ml

Preparo:

Pesar 50g da mistura (meio sintético) e adicionar 1000ml de água destilada. Aquecer até a completa liquefação do ágar (evitar aquecimento excessivo). Ajustar o pH à 7,1. Esterilizar em autoclave à 121°C por 15 min. Distribuir em placas de Petri previamente esterilizadas

ÁGAR MUELLER-HINTON

Objetivo:

Utilizados na realização do teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de Kirby-Bauer. Este meio de cultura sendo complexo, foi preparado de acordo com as especificações do fabricante (Oxoid).

Preparo do meio:

Um total de 38g do meio foi pesado e dissolvido em 1 litro de água destilada, fundido e autoclavado à 121°C por 15 minutos e distribuído em placas de Petri estéreis.

ÁGAR SANGUE

Objetivo:

Como meio de isolamento primário e também como teste bioquímico para observar se a bactéria em estudo produziria hemólise e se esta era parcial ou total. Também foi utilizado para avaliar se a colônia apresentava pigmento e qual a cor desse pigmento.

Meio básico:

Ágar Columbia (Oxoid).....	39g
Água destilada.....	1000ml

Preparo do meio:

Meio Columbia estéril.....	1000ml
Sangue de carneiro desfibrinado.....	5ml

Homogenizar e distribuir em placas de Petri.

ÁGAR SOJA TRIPTICASE

Objetivo:

Utilizado do cultivo das cepas para a realização do inoculo em salina do Kit API 20NE

Preparo do meio:

O meio utilizado foi um meio sintético pronto (Biolab), bastando para o seu uso dissolver 40g do pó comercial em 1 litro de água destilada e em seguida autoclavar à 121°C por 15 minutos e distribuir em placas de Petri.

BHI (*BRAIN HEART INFUSION*)

Objetivo:

Empregado nas diversas etapas de cultivo e repique bacteriano e como inoculo para os testes bioquímicos.

Descrição:

O meio BHI é um meio sintético pronto, bastando para o seu uso adicionar-se água destilada. O caldo BHI utilizado foi da Difco.

Preparo do meio final:

Foi pesado 37g e dissolvido em 11 de água destilada, de acordo com as especificações do fabricante e posteriormente distribuido em alíquotas de 2 ml em tubos de 10x70mm com tampa de rosca e autoclavado à 121°C por 15 minutos.

Anexo III

SISTEMA API 20 NE SISTEMA DE IDENTIFICAÇÃO DE BACILOS GRAM NEGATIVOS NÃO ENTEROBACTÉRIAS E NÃO FASTIDIOSOS

INTRODUÇÃO E OBJETIVO DO TESTE

O API 20 NE é um sistema padronizado para a identificação de bacilos Gram negativos não enterobactérias e não fastidiosos (ex. *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.) que combina 8 testes convencionais, 12 testes de assimilação e uma base de dados. A lista completa das bactérias possíveis de identificar com este sistema apresenta-se no Quadro de identificação.

PRINCÍPIO

A galeria API 20 NE comporta 20 microtubos que contém substratos desidratados. Os testes convencionais são inoculados com uma suspensão bacteriana salina que reconstitui os meios. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se por viragens de cor espontâneas ou reveladas através da adição de reagentes.

Os testes de assimilação são inoculados com um meio mínimo e as bactérias crescem apenas se orem capazes de utilizar o substrato correspondente.

A leitura destas reações faz-se utilizando o Quadro de Leitura e a identificação é obtida utilizando o Catálogo Analítico ou um sistema de identificação.

APRESENTAÇÃO (embalagem de 25 testes)

- 25 galerias de API 20 NE
- 25 caixas de incubação
- 25 ampolas de API AUX Medium
- 25 fichas de resultados
- folheto informativo

COMPOSIÇÃO

Galeria

A composição da galeria API 20 NE é apresentada no Quadro de Leitura.

Meio

Meio API AUX	Sulfato de amônio	2 g
Medium	Agar	1,5 g
7ml	Solução de vitaminas	10,5 ml
	Solução de oligo-elementos	10 ml
	Fosfato monosódico	6,24 g
	Cloreto de potássio	1,5 g
	Água desmineralizada	q.b. 100ml
	pH final: 7,0 - 7,2	

REAGENTES E MATERIAIS NECESSÁRIOS MAS NÃO FORNECIDOS

Reagentes:

- API NaCl 0.85% Medium, 2 ml (Ref. 20 070)
- Reagentes: JAMES (Ref. 70 542)
 - NIT 1 + NIT 2 (Ref. 70 442)
 - Zn (Ref. 70 380)
- Oxidase (Ref. 55 635*)
 - * referência não comercializada em alguns países: utilizar um reagente equivalente
- Óleo de parafina (Ref. 70 100)
- McFarland Standart (Ref. 70 900) ponto 0.5
- Catálogo Analítico API 20 NE (Ref. 20 090) ou programa de identificação (consultar a bioMérieux)

Materiais:

- Pipetas ou PSIPetas
- Suporte de proteção de ampolas
- Suporte para ampolas
- Equipamento geral de laboratório de bacteriologia

PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO

As galerias e os meios conservam-se a 2° - 8° C até a data de validade indicada na embalagem.

AMOSTRAS (COLHEITA/COLETA E PREPARAÇÃO)

O API 20 NE não deve ser utilizado diretamente em amostras de origem clínica ou outras.

Os microorganismos a identificar devem ser primeiros isolados num meio de cultura adaptado (ex. gelose Trypcase Soja) segundo as técnicas habituais de bacteriologia.

PROCEDIMENTO

Teste Oxidase

O teste oxidase deve ser realizado em conformidade com as instruções de utilização do fabricante, constitui o 21° teste de identificação a anotar na ficha de resultados.

Seleção das colônias

O API 20 NE deve ser utilizado com bacilos Gram negativos não enterobactérias e não fastidiosos.

NOTA 1: algumas espécies de bacilos Gram negativos não enterobactérias que são oxidase negativa (*S. maltophilia*, *Acinetobacter* ...) identificam-se perfeitamente com o API 20 NE. Há que ter em conta o contexto clínico ou bacteriológico para utilizar esta galeria.

NOTA 2: Os microorganismos fastidiosos, exigentes que necessitam de precauções de manipulação particulares (ex. *Brucella* e *Francisella*) não fazem parte da base de dados API 20 NE. Convém utilizar outras técnicas para excluir ou confirmar a sua presença.

Preparação da galeria

1. Juntar fundo e tampa de uma de incubação e distribuir cerca de 5 ml de água destilada ou desmineralizada [ou qualquer água sem aditivo ou derivados susceptíveis de libertarem gases (Ex: Cl₂, CO₂ ...)] nos alvéolos para criar uma atmosfera úmida.
2. Inscrever a referência da estirpe/cepa na lingüeta lateral da caixa. (Não inscrever a referência na tampa, esta pode ser deslocada durante a manipulação)
3. Retirar a galeria da embalagem individual.
4. Colocar a galeria na caixa de incubação.

Preparação do inoculo

1. Abrir uma ampola de API NaCl 0.85% Médium (2 ml) como indicado no parágrafo “Precauções de inoculação” ou utilizar um tubo contendo 2 ml de solução salina a 0.85%, sem aditivo.
2. Utilizando uma pipetas ou uma PSIPeta, colher/coletar 1 a 4 colônias de morfologia idêntica, por aspiração ou toque sucessivos. Utilizar de preferências culturas recentes (18-24 horas).
3. Efetuar uma suspensão com opacidade equivalente a 0.5 de McFarland. Esta solução deve ser utilizada imediatamente após sua preparação.

NOTA: para o bom funcionamento dos testes da galeria API 20 NE, é muito importante ajustar a densidade do inoculo ao ponto 0.5 de McFarland. Em especial, uma turbidez mais fraca conduz a resultados falsamente negativos. Não tocar nas cúpulas na altura das manipulações e não deixar a galeria demasiadamente exposta ao depois da inoculação.

Inoculação da galeria

1. Encher os tubos (e não as cúpulas) dos testes NO₃ a PNPG com a suspensão anterior utilizando a pipeta que serviu para a colheita/coleta. Para evitar a formação de bolhas no fundo dos tubos, coletar a ponta da pipeta ou da PSIPeta de lado da cúpula, inclinando ligeiramente a caixa de incubação para a frente.
2. Abrir uma ampola de API AUX Medium como indicado no parágrafo “Precauções de utilização” e para ela transferir 200µl da suspensão anterior. Homogeneizar com a pipeta evitando a formação de bolhas.

3. Encher os tubos e cãs cúpulas dos testes GLU a PAC, tendo o cuidado de criar um nível horizontal ou ligeiramente convexo, mas nunca côncavo. As cúpulas incompletamente cheias ou demasiado cheias podem conduzir a falsos resultados.
4. Encher com óleo de parafina as cúpulas dos três testes sublinhados (GLU, ADH, URE) para formar ummenisco convexo.
5. Fechar a caixa de incubação e incubar a $29^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas (± 2 horas).

LEITURA E INTERPRETAÇÃO

Leitura da galeria

1. Após a incubação, a leitura da galeria deve fazer-se consultando o Quadro de Leitura.
2. Anotar na ficha de resultados todas as reações espontâneas (GLU, ADH, URE, ESC, GEL, PNPG).
3. A revelação dos dois testes NO₃ e TRP deve-se fazer colocando os testes de assimilação ao abrigo de uma contaminação do ar: para isso, colocar a tampa da caixa de incubação por cima destas durante o período de revelação dos testes de NO₃ e TRP.

Teste do NO₃

- Adicionar uma gota do reagente NIT1 e NIT2 na cúpula do NO₃.
- Depois de 5 min, uma cor **vermelha** indica uma reação **positiva**, a anotar na ficha de resultados.
- Uma reação negativa pode ser devida à produção de azoto (eventualmente assinalada pela presença de microbolhas): adicionar 2-3 mg de reagente de Zn na cúpula NO₃.
- Depois de 5 min, uma cúpula que continuar **incolor** indica uma reação **positiva** a anotar na ficha de resultados.

Se a cúpula virar para **rosa-vermelho**, a reação é **negativa** visto que os nitratos ainda presentes no tubo foram reduzidos a nitritos pelo zinco.

A reação utilizada para identificação da bactéria é a redução dos nitratos; esta é positiva se uma ou outra das duas reações anteriores (produção de NO₂ ou de N₂) for positiva.

No entanto, a produção de N₂ pode ser utilizada unicamente como teste complementar no Catálogo Analítico.

Teste TRP

Adicionar uma gota do reagente JAMES. Uma cor **rosa** difundida em toda cúpula indica uma reação **positiva**.

Teste de assimilação

Observar o crescimento bacteriano. Uma cúpula **turva** indica uma reação **positiva**.

Podem ser observados crescimento de intensidade intermediária e anotados -+ ou +-.

Depois da leitura efetuada, a identificação deve ser feita como indicado no parágrafo “interpretação”. No entanto, nestes dois casos, é necessário uma reincubação:

- se o perfil não for encontrado no Catálogo Analítico API 20 NE
- se a nota a seguir for indicado para o perfil obtido:

IDENTIFICAÇÃO NÃO VÁLIDA ANTES DE 48 HORAS DE INCUBAÇÃO

Eliminar, utilizando uma pipeta ou uma PSipeta, os reagentes NIT 1 e NIT 2 e JAMES por aspiração, cobrir imediatamente os testes NO₃ e TRP de óleo de parafina formando um menisco convexo, incubar novamente a 29°C ± 2 °C durante 24 h mais tarde, exceto os três primeiros testes: NO₃, TRP, GLU que devem ser lidos unicamente a 24 h.

Interpretação

A identificação é obtida a partir do perfil numérico.

Determinação do perfil numérico:

Na ficha de resultados, os testes são separados por grupos de três e um valor 1, 2 ou 4 indicado para cada um. Adicionando em cada grupo os valores que correspondem às reações positivas, obtém-se 7 algarismos; a reação de oxidase que constitui o 21º teste é assinalada com o valor 4 quando positiva.

Identificação:

É efetuada a partir da base de dados (v 6.0)

* com o Catálogo Analítico:

- Pesquisar o perfil numérico na listas dos perfis.

* com o programa de identificação:

- Introduzir manualmente no teclado o perfil numérico de 7 algarismos

Anexo IV

PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO - *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* PROTOCOLO - PATHWEST

Objetivo: extrair o antígeno das cepas de *Burkholderia pseudomallei*

Metodologia: Documento “Melioidosis IHA Method Oct2004” - PathWest

Obs: modificação - Sulfato de Amônio

Material:

- Placas de Petri
- Meios de cultura - ágar sangue
- Meios livre de proteínas
- Erlenmyer
- Papel de filtro
- Funil
- Sulfato de Amônio
- Barra magnética
- Agitador Magnético
- Membrana de filtração
- Depósito para diálise
- Água destilada
- Solução salina
- Ponteiras 1000 µ
- Pipeta
- Etiquetas de identificação e canetas de marcação

Descrição do protocolo - resumo:

- Incubação das cepas *B. pseudomallei* a 37°C por 48 horas
- Raspagem das colônias da superfície do meio
- Transferência do material para frasco com meio livre de proteínas
- Incubação por 2 semanas
- Autoclave a 121°C por 15 minutos
- Filtração - funil com papel de filtro em Erlenmeyer
- Agitação magnética acrescentando lentamente Sulfato de Amônio
- Precipitação - 24 horas
- Centrifugação 10.000 rpm
- Diálise em 4 banhos
- Armazenamento a -20°C

Conclusão:

- Extração do antígeno das cepas para teste.

PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO - *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI***PROTOCOLO - PathWest/2004**

Referência: Documento PathWest - Ian Simpson/Tim Inglis

**PREPARAÇÃO DO MEIO LIVRE DE PROTEÍNAS
PARA PRODUÇÃO DO ANTÍGENO****MEIO LIVRE DE PROTEÍNAS**

Asparagina	3.5 mg
KH ₂ PO ₄	1.0 mg
Ácido Cítrico	1.0 mg
MgSO ₄	0.5 gm
Citrato de Amonio Ferrico	1.0 mg
Citrato de Sódio	1.0 mg
Dextrose	5.0 mg
Glicerol	35.0 mg
Água deionizada	500 ml

Ajuste pH para 7.2. Prepare 3 frascos de 500ml contendo 150 ml do meio. Autoclave cada frasco a 115°C por 15 minutos.

ANEXO V

Reagentes Utilizados no ELISA e no Teste da Avidéz

TAMPÃO PBS Ph 7,4

Fosfato bibásico de sódio anidro (Qeel)	17,91
Cloreto de sódio (Reagen)	8,8 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Acertar o pH 7,4 com HCl 6N.

TAMPÃO PARA DILUIÇÃO DAS AMOSTRAS E DO CONJUGADO (PBS-NaCl-T)

Cloreto de sódio (Reagen)	2g
Tween 20 (Sigma P-1379)	0,2 ml
PBS 7,4	100 ml

TAMPÃO DE LAVAGEM

Tween 20 (Sigma P-1379)	0,5 ,l
PBS 7,4	1000 ml

TAMPÃO CITRATO FOSFATO

Ácido cítrico (Merck 21549)	7,4 g
Fosfato de sódio bibásico (Qeel)	9,9 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml

Acertar o ph para 5,0 e separar em alíquotas de 100 ml e guardar congelado.

SOLUÇÃO DE SUBSTRATO COM OPD

O-Phenylenediamine Dihydrochloride (Sigma P-8287)	10 mg
Tampão citrato fosfato	25 ml
Perhydrol 30% (merck 7209)	

SOLUÇÃO 5M DE TIOCIANATO DE POTÁSSIO (KSCN)

KSCN	60,75 g
PBS-NaCl-Tween	125 ml

A partir da solução estoque de KSCN 5M, realizar as diluições seguintes para atingir as concentrações desejadas, isto é, de 0,1M a 4M.

Reagentes para SDS-PAGE

SOLUÇÃO DE SDS 10%

Sodium dodecyl sulfate (BioRad 161-0301)	10 g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	100 ml

SOLUÇÃO DE ACRILAMIDA 30%

Acrilamida (Riedel-deHaën 62021)	30 g
N,N'-methylene-bis-acrylamide (Sigma M-7256)	0,8 g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	100 ml

Filtrar em papel de filtro Whatman e conservar em frasco escuro, a 4°C.

TAMPÃO TRIS-HCL PH 8,81, 5M.

Trizma base (Sigma T-1503)	27,25 g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	150 ml

Ajustar o pH para 6,8 com HCl 5M

TAMPÃO TRIS-HCL PH 6,8 0,5M

Trizma base (Sigma T-1503)	6 g
Água (destilada e desmineralizada)	100 ml

Ajustar o pH para 6,8 com HCl 5M.

SOLUÇÃO D

Trizma base (Sigma T-1503)	6,06 g
Solução de SDS 20%	2 ml
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	100 ml

Ajustar o pH para 6,8 com HCl 6N.

SOLUÇÃO DE PERSULFATO E AMÔNIO

Persulfato de amônio (Riedel-deHaën 31117)	0,2 g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	2 ml

Dividir em alíquotas de 100µl e guardar a -20°C

PREPARO DO GEL DE ACRILAMIDA

Montar um sanduíche de placas de vidro perfeitamente limpas e com as espaçadores bem ajustados, testando com água para verificar se não há vazamentos. Colocar o gel preparado na concentração desejada, segundo os exemplos da tabela, nesta ordem:

	Gel a 15%
Água bidestilada	2,5 ml
Solução Acrilamida 30%	5,0 ml
Tampão Tris-HCl 8,8	2,0 ml
Glicerol	0,5 ml
SDS 10%	100µl
Persulfato de Amônio	55µl
TEMED	6µl

TEMED= N, N, N', N'-tetra-methylethylenediamine (BioRad 161-0801)

Após polimerização do gel de corrida, colocar gel de aplicação de amostra (Gel Stackong), preparado na proporção:

Água bidestilada	3,75 ml
Sol. Acrilamida 30%	630µl
Tampão Tris-HCl 6,8	630µl
SDS 10%	50µl
Persulfato de amônio	40µl
TEMED	5µl

Colocar cuidadosamente o pente, que será retirado após a polimerização, para aplicação das amostras e do padrão de peso molecular (Calibration kit for molecular weight determination, Pharmacia).

TAMPÃO DE AMOSTRA

Solução D	2,5 ml
Solução de SDS 20%	2,5 ml
Glicerol 99% (Aldrich 13487-2)	2,0 ml
EDTA 0, 1M (Sigma E-6758)	0,1 ml
Água (destilada e demineralizada) q.s.p.	18,5 ml

SOLUÇÃO DE AZUL DE BROMOFENOL

Azul de bromofenol (BioRad 161-0404)	2 g
Água destilada	100 ml

TAMPÃO DE CORRIDA PH 8,3 (SOL. ESTOQUE, 5 VEZES CONCENTRADO)

Trizma base (Sigma T 1503)	15 g
L-Glicina (Ajinomoto)	72 g
Sodium dodecyl Sulfate (BioRad 161-0301)	5 g
Água destilada e desmineralizada q.s.p.	1000 ml

Ajustar o pH para 8,2 guardar a 4°C. No momento do uso diluir 1:5 em água destilada.

Reagentes para Immuno Blotting

TAMPÃO DE TRANSFERÊNCIA

Trizma base (Sigma T-1503)	3,03 g
Glicina (Ajinomoto)	14,41 g
Metanol (Merck 21566)	200 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml

CORANTE DE PONCEAU PARA NITROCELULOSE

Ponceau S (Gurr's)	0,5 g
--------------------	-------

Ácido acético glacial (Reagen)	1 ml
Água destilada q.s.p.	100 ml
TAMPÃO TRIS-SALINA 0,1M PH7, 4	
Trizma base (Sigma T-1503)	24,20 g
Cloreto de sódio (Reagen)	29,22 g
Água destilada q.s.p.	1000 ml
Acertar o pH para 7,4 com HCl.	
TAMPÃO TRIS-SALINA 0,01M PH7, 4	
Tampão Tris salina 0,1M	100 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml
TAMPÃO DE BLOQUEIO	
Tampão Tris salina 0,01M	100 ml
Leite Molico	1 g
TAMPÃO DE DILUIÇÃO DE AMOSTRAS E CONJUGADO	
Tampão Tris salina 0,01M	100 ml
Leite Molico	5 g
Tween 20 (Sigma P-1379)	0,05 ml
TAMPÃO DE LAVAGEM	
Tampão Tris salina 0,1M	100 ml
Tween 20 (Sigma P-1379)	1 ml
TAMPÃO TRIS 0,05M	
Tmapão Tris 0,1M	250 ml
Água destilada q.s.p.	1000 ml
SUBSTRATO PARA FOSFATASE ALCALINA	
NBT (Bio Rad, USA), 10x concentrado	1 ml
BCIP (Bio Rad, USA), 10 x concentrado	1 ml
Tris-HCl 0,1M, pH 9,5 (Bio Rad, USA)	10 ml