

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO**

**MORMO NA EQUIDEOCULTURA BRASILEIRA:
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Burkholderia
mallei* EM EQUÍDEOS COM E SEM MANIFESTAÇÕES
CLÍNICAS**

Paula Adas Pereira Suniga

CAMPO GRANDE, MS

2024

2024 **MORMO NA EQUIDEOCULTURA BRASILEIRA:**
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE **SUNIGA**
Burkholderia mallei EM EQUÍDEOS COM E SEM
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE DOUTORADO

**MORMO NA EQUIDEOCULTURA BRASILEIRA:
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE *Burkholderia mallei*
EM EQUÍDEOS COM E SEM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

Glanders in brazilian equideoculture: idenfication and characterization of
Burkholderia mallei in equids with or without clinical manifestations

Paula Adas Pereira Suniga

Orientadora: Profa. Dra. Andréa Alves do Egito

Co-orientadora: Dra. Lenita Ramires dos Santos

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul, como
requisito à obtenção do título de
Doutora em Ciência Animal.**

Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE, MS

2024



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Certificado de aprovação

PAULA ADAS PEREIRA SÚNIGA

**MORMO NA EQUIDECULTURA BRASILEIRA: IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO
DE BURKHOLDERIA MALLEI EM EQUÍDEOS COM E SEM MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS
GLANDERS IN BRAZILIAN EQUIDECULTURE: IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF
BURKHOLDERIA MALLEI IN EQUIDS WITH OR WITHOUT CLINICAL MANIFESTATIONS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito para obtenção do título de Doutora em Ciência Animal. Área de concentração: Produção Animal.

Aprovado em: 02-02-2024

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Andréa Alves do Egito
(EMBRAPA) – Presidente

Dr. Antonio Francisco de Souza Filho
(UFMS)

Dr. Fernando Leandro dos Santos
(UFRPE)

Dr. Flávio Ribeiro de Araújo
(EMBRAPA)

Dra. Lenita Ramires dos Santos
(EMBRAPA)

NOTA MÁXIMA NO MEC
UFMS É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Andrea Alves do Egito, Usuário Externo**, em 06/02/2024, às 11:56, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no §

3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Lenita Ramires dos Santos, Usuário Externo**, em 07/02/2024, às 08:35, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Francisco de Souza Filho, Usuário Externo**, em 07/02/2024, às 10:21, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **Fernando Leandro dos Santos, Usuário Externo**, em 07/02/2024, às 10:54, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

NOTA
MÁXIMA
NO MEC

UFMS
É 10!!!



Documento assinado eletronicamente por **FLÁBIO RIBEIRO DE ARAÚJO, Usuário Externo**, em 16/02/2024, às 14:25, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4640821** e o código CRC **44E4AB8D**.

COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

Referência: Processo nº 23104.001236/2021-33

SEI nº 4640821

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado forças para superar as dificuldades e os desafios que enfrentei durante esta jornada. Por todas as portas abertas e pelo bom caminho que me guiou.

À minha orientadora, Andréa, por ter me ensinado a pensar criticamente e a escrever com clareza e rigor. Por sempre estar ao meu lado. Agradeço também à minha coorientadora, Lenita, e ao meu supervisor, Flávio, por terem me proporcionado experiências valiosas e oportunidades únicas de aprendizado.

Aos meus colegas de laboratório, companheiros de rotina, aqui representados pela técnica do laboratório, Maria Goretti. Sou grata pela colaboração e pela troca de ideias que enriqueceram o meu trabalho. Agradeço especialmente pelo dia-a-dia dentro no NB3, que foi fundamental para a realização desta pesquisa.

Aos meus pais, Vanda e Paulo, pelo suporte e pelo amor de sempre. vocês foram a minha base e o meu porto seguro durante todo esse tempo.

Ao meu companheiro, Igor, por todo o apoio, companheirismo e palavras de incentivo. Você foi a minha motivação e a meu braco direito para seguir em frente.

Aos meus familiares que sempre estiveram por perto quando precisei. Vocês foram a minha rede de apoio e a minha fonte de alegria.

Também aos meus amigos por me ajudarem a lembrar que a vida é para ser vivida. Vocês foram a minha válvula de escape e a minha diversão nos momentos de lazer.

No auge do inverno, finalmente aprendi que dentro de mim havia um verão invencível.
(Albert Camus).

Resumo

SUNIGA, P.A.P. Mormo na equideocultura brasileira: identificação e caracterização de *Burkholderia mallei* em equídeos com e sem manifestações clínicas. 2024. 64 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

O mormo, uma doença infectocontagiosa que afeta predominantemente equídeos (equinos, muares e asininos), é provocado pela bactéria *Burkholderia mallei*, um cocobacilo Gram-negativo, não fermentador e imóvel. Esta zoonose, que foi declarada erradicada no Brasil em 1960, reemergiu nos anos 2000 com a detecção de equídeos soropositivos, sobretudo na região nordeste do país. Os equídeos, que totalizam 116 milhões globalmente e 6,7 milhões no Brasil, desempenham um papel crucial na economia e na sobrevivência das pessoas. A manutenção da saúde desses animais por meio de práticas apropriadas de manejo sanitário, como recomenda o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, é essencial para a sustentabilidade e rentabilidade do setor agropecuário, além de ser importante para o bem-estar animal. Com isso, o objetivo do trabalho foi evidenciar a presença de *B. mallei* em equídeos sintomáticos e assintomáticos, buscando a caracterização ampla de cepas brasileiras. Neste estudo, evidenciamos a detecção de *B. mallei* em equídeos soropositivos para mormo em todas as cinco regiões geográficas do Brasil por meio de PCR específica para a espécie, diretamente de tecidos ou culturas bacterianas, seguida de sequenciamento do amplicon. Este achado amplia a possibilidade de isolamento de cepas e a realização de caracterizações epidemiológicas baseadas em informações moleculares. Adicionalmente, houve a detecção microbiológica de *B. mallei* em culturas de swabs nasais e palatinos o que sugere a eliminação do agente para o meio ambiente. Além desses, o caso de uma égua assintomática com títulos de anticorpos positivos para *B. mallei* foi investigado por meio de uma abordagem multifacetada que englobou o cultivo microbiológico, a espectrometria de massa e o sequenciamento total do genoma. A cepa foi identificada como *B. mallei* por PCR e confirmada por espectrometria de massa MALDI-TOF. O sequenciamento do genoma completo revelou um tamanho de genoma de 5,51 Mb com um conteúdo de GC de 65,8%, 5.871 genes (incluindo 4 genes de rRNA e 53 genes de tRNA) e 5.583 sequências codificantes de DNA (CDSs). Foram detectados 227 pseudogenes previstos e análise in silico de diferentes loci genômicos permitiu a diferenciação do isolado de *B. mallei* da *Burkholderia pseudomallei*. A cepa BAC 86/19 foi identificada como linhagem 3, sub-linhagem 2, que inclui outras cepas do Brasil, Índia e Irã. O

sequenciamento do genoma desta cepa fornece dados relevantes para pesquisas futuras que busquem aprimorar o diagnóstico e potencial tratamento desta doença, além de estudos voltados para o agente infeccioso e sua epidemiologia. Em suma, o presente trabalho contribui de maneira significativa para a compreensão da epidemiologia do mormo no Brasil, destacando a importância da detecção e caracterização molecular de *B. mallei* para o controle e prevenção da doença. Ademais, os estudos ressaltam a necessidade de vigilância contínua, mesmo em equídeos assintomáticos. Esta pesquisa reforça a necessidade de uma abordagem integrada para o controle do mormo pois existem implicações econômicas e zoonóticas significativas.

Palavras-chave: assintomático; *B. mallei*; genoma; mormo; zoonose

Abstract

SUNIGA, P.A.P. Glanders in Brazilian equideoculture: identification and characterization of *Burkholderia mallei* in equids with or without clinical manifestations. 2024. 64 f. Thesis (Doctorate) - Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2024.

Glanders, an infectious disease that predominantly affects equidae (horses, mules and donkeys), is caused by the bacterium *Burkholderia mallei*, a Gram-negative, non-fermenting and immobile coccobacillus. This zoonosis, which was declared eradicated in Brazil in 1960, re-emerged in the 2000s with the detection of seropositive equids, especially in the northeast region of the country. Equidae, which number 116 million globally and 6.7 million in Brazil, play a crucial role in the economy and people's survival. Maintaining the health of these animals through appropriate health management practices, as recommended by the National Equine Health Program, is essential for the sustainability and profitability of the agricultural sector, in addition to being important for animal welfare. Therefore, the objective of the work was to identify the presence of *B. mallei* in symptomatic and asymptomatic equids, seeking a broad characterization of Brazilian strains. In this study, we demonstrated the detection of *B. mallei* in horses seropositive for glanders in all five geographic regions of Brazil using species-specific PCR, directly from tissues or bacterial cultures, followed by amplicon sequencing. This finding expands the possibility of isolating strains and carrying out epidemiological characterizations based on molecular information. Additionally, there was microbiological detection of *B. mallei* in cultures of nasal and palatal swabs, which suggests the elimination of the agent into the environment. In addition to these, the case of an asymptomatic mare with positive antibody titers to *B. mallei* was investigated using a multifaceted approach that encompassed microbiological cultivation, mass spectrometry and whole genome sequencing. The strain was identified as *B. mallei* by PCR and confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry. Whole-genome sequencing revealed a genome size of 5.51 Mb with a GC content of 65.8%, 5,871 genes (including 4 rRNA genes and 53 tRNA genes), and 5,583 DNA coding sequences (CDSs). 227 predicted pseudogenes were detected and in silico analysis of different genomic loci allowed the differentiation of the *B. mallei* isolate from *Burkholderia pseudomallei*. The BAC 86/19 strain was identified as lineage 3, sub-lineage 2, which includes other strains from Brazil, India and Iran. Genome sequencing of this strain provides relevant data for future research that seeks to improve the diagnosis

and potential treatment of this disease , in addition to studies focused on the infectious agent and its epidemiology. In short, the present work contributes significantly to the understanding of the epidemiology of glanders in Brazil, highlighting the importance of detection and molecular characterization of *B. mallei* for the control and prevention of the disease. Furthermore, the studies highlight the need for continuous surveillance, even in asymptomatic horses. This research reinforces the need for an integrated approach to glanders control as there are significant economic and zoonotic implications.

Keywords: asymptomatic; *B. mallei*; genome; glanders; zoonosis

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1. HISTÓRIA E TAXONOMIA.....	15
2.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS.....	16
2.3. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS EQUÍDEOS.....	17
2.4. RELEVÂNCIA DA SANIDADE DE EQUÍDEOS NA CADEIA PRODUTIVA.....	18
2.5. EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL.....	18
2.6. PATOGENIA	19
2.7. SINAIS CLÍNICOS	20
2.8. DIAGNÓSTICO	22
2.9. CONTROLE E PREVENÇÃO.....	23
2.10. GENOMA E EVOLUÇÃO	23
2.10.1. ESTUDOS MOLECULARES DE <i>Burkholderia mallei</i> EM CASOS BRASILEIROS.....	27
2.11. PROTEÔMICA DE <i>Burkholderia mallei</i>	30
3. REFERÊNCIAS	31
4. ARTIGO CIENTÍFICO: Detecção molecular de <i>Burkholderia mallei</i> em diferentes regiões do Brasil	37
Resumo	37
Introdução.....	37
Material e métodos	38
Amostras	38
Cultivo microbiológico	39
Extração de DNA e PCR.....	40
Sequenciamento de amplicons	40
Resultados.....	40
Discussão.....	43
Referências	47
5. ARTIGO CIENTÍFICO: Diagnóstico de mormo em uma égua assintomática do Brasil: insights de sorologia, cultura microbiológica, espectrometria de massa e sequenciamento do genoma	50
Introdução.....	51
Materiais e métodos.....	52
Caso Clínico.....	52
Isolamento Bacteriano e Detecção Molecular.....	53
Espectrometria de Massa MALDI-TOF.....	54
Sequenciamento do genoma completo.....	54
Avaliação de qualidade, montagem e anotação.....	55

Marcadores Genéticos para Confirmação de Espécies.....	55
Identificação de Linhagem	55
Resultados.....	56
Isolamento Bacteriano e Detecção Molecular.....	56
Espectrometria de Massa MALDI-TOF.....	56
O Projeto do Genoma de <i>B. mallei</i> BAC 86/19	56
Confirmação de espécies usando marcadores genéticos	57
Identificação de Linhagem	57
Discussão.....	57
Referências	60
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	64

1. INTRODUÇÃO

O mormo é uma doença infecciosa, zoonótica, causada pela bactéria *Burkholderia mallei* que acomete equídeos (cavalos, burros e mulas) de ambos os sexos e de diferentes faixas etárias. Esta enfermidade causa diversas síndromes dependendo da via de entrada do agente. Apresenta maior incidência em animais submetidos a fatores de risco, como estresse, desnutrição e exposição a ambientes contaminados. Esses fatores são frequentemente encontrados em propriedades que exploram os equídeos para atividades de tração, uma fonte de estresse físico e mental. A doença acarreta perdas econômicas significativas, devido à mortalidade ou à redução da capacidade produtiva dos animais acometidos (MOTA et al., 2000; MOTA e PINHEIRO JÚNIOR, 2022). Atualmente, tem incidência em países da África, Ásia, Oriente Médio e América do Sul (WOAH, 2023).

Equídeos podem ou não manifestar sinais clínicos da doença (SUNIGA et al., 2023). Quando presentes, são comumente observados nódulos subcutâneos, linfangite, tosse, corrimento nasal purulento e febre (MOTA, 2006). Enquanto em cavalos o curso da doença é principalmente crônico, em burros e mulas pode ser agudo. Para saúde pública, as doenças crônicas representam 80% da carga¹ de doença dos países em desenvolvimento (BRASIL, 2013). Animais assintomáticos são portadores e potenciais disseminadores da doença. Portanto, a identificação e o manejo adequado dos casos crônicos são fundamentais para o controle efetivo do mormo, ajudando na prevenção da disseminação da doença entre animais e reduzindo o risco de transmissão para humanos.

Não há tratamento eficaz ou vacina para os animais infectados e, por isso, a legislação brasileira vigente determina a eutanásia dos equídeos sintomáticos soropositivos. A prevenção do mormo consiste na realização de exames sorológicos em todos os animais que apresentam sintomas da doença e no sacrifício dos animais reagentes. Além disso, medidas de biossegurança devem ser adotadas para evitar o contato direto ou indireto entre animais doentes (BRASIL, 2023).

Embora surtos de mormo sejam comuns em regiões de endemicidade da doença, o conhecimento sobre a ecologia e a dinâmica natural da população de *B. mallei* é baseado principalmente em evidências indiretas e opiniões de especialistas, com pouco ou nenhum conhecimento sobre sua diversidade genética. No Brasil, há pouca informação sobre a diversidade genética de isolados de *B. mallei* (SILVA et al., 2009; GIRAULT et al., 2017; LAROUCAU et al., 2018; FALCÃO et al., 2019).

¹ A carga global de doenças reflete uma metodologia científica sistemática que prevê a quantificação da magnitude da perda da saúde em função de doenças, lesões e fatores de risco por idade, sexo e localidades geográficas.

Outra importância do estudo genômico é a diferenciação da melioidose, enfermidade causada pela bactéria *Burkholderia pseudomallei*, de manifestação clínica semelhante ao mormo, inclusive nos caracteres fenotípicos e genotípicos de seus agentes (TANPIBOONSAK et al. 2004). Assim, a utilização de técnicas moleculares ou proteômicas é fundamental para a diferenciação do patógeno em casos clínicos.

Este estudo visa identificar e caracterizar cepas de *B. mallei*, patógeno causador do mormo, obtidas de equídeos soropositivos eutanasiados pelo Serviço Oficial, provenientes de todas regiões do Brasil. Foram utilizados diversos critérios para a análise, empregando técnicas como morfologia da colônia, testes bioquímicos, a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) e a espectrometria de massas. Além disso, averigou-se a presença do patógeno em equídeos, sintomáticos e assintomáticos, visando verificar a possibilidade da disseminação do patógeno de forma silenciosa. Através deste trabalho, espera-se contribuir para um melhor entendimento da epidemiologia do mormo no Brasil, auxiliando na implementação de medidas de controle mais eficazes

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. HISTÓRIA E TAXONOMIA

O mormo é conhecido desde que o cavalo foi domesticado. Os primeiros relatos de uma doença de equídeos cuja sintomatologia e dados epidemiológicos eram semelhantes aos do mormo datam de 200/300 anos a.C. A partir de então, foram registrados casos de mormo em humanos, especialmente nos que tinham contato direto com animais infectados. Já no século XVIII estão presentes os relatos mais marcantes relacionando o mormo com animais de tração e trabalhadores (SANTOS et al., 2001).

A bactéria *B. mallei*, agente etiológico do mormo, é um cocobacilo Gram-negativo, aeróbio facultativo e imóvel. Trata-se de um patógeno intracelular obrigatório com alto tropismo por equídeos, sendo que mulas e burros são mais sensíveis à infecção (NEUBAUER et al., 2005; OIE, 2018). O gênero *Burkholderia*, da família *Burkholderiaceae*, é composto por mais de 40 espécies diferentes, que ocupam uma ampla gama de nichos ecológicos. Algumas espécies são predominantemente habitantes do solo e não apresentam caráter patogênico (VANDAMME et al., 2007).

Esse patógeno secreta uma cápsula de polissacarídeo que impede a fagocitose por leucócitos, conferindo-lhe virulência e sobrevivência no hospedeiro (FERRAREZI et al., 2020). O organismo tem sua nomenclatura derivada do grego *melis*, “doença grave”, e do

latim, *malleus*, que significa “doença maligna”, foi isolado pela primeira vez em 1882 por Loeffler e Schütz e confirmado em 1886 como a causa do mormo (DVORAK e SPICKLER, 2008).

Ao longo do tempo, *B. mallei* recebeu várias designações como: *Loefflerella mallei*, *Pfeifferella mallei*, *Malleomyces mallei*, *Actinobacillus mallei*, *Corynebacterium mallei*, *Mycobacterium mallei*, *Pseudomonas mallei* e *Bacillus mallei*. A classificação atual como parte da família *Burkholderiaceae* é decorrente de características fenotípicas, composição celular de lipídios e ácidos graxos, tipagem do gene 16S rRNA e homologia DNA-DNA (YABUUCHI et al., 1992).

Burkholderia mallei é altamente infecciosa podendo ser transmitido por aerossol, tornando-se potencial para liberação intencional como um agente de ameaça biológica. Já foi utilizado como arma biológica durante a Guerra Civil Americana, a Primeira e Segunda Guerra Mundial e há relatos de uso pela União Soviética como arma biológica no Afeganistão (SHARRER, 1995; CHRISTOPHER et al., 1997).

Como resultado dessa ameaça potencial, a pesquisa envolvendo *B. mallei* está restrita a instalações de nível 3 de biossegurança² nos Estados Unidos e em outros países do mundo. É essencial utilizar todas as medidas de biossegurança e bioproteção ao manejar o microrganismo que é sensível a fatores ambientais como calor, luz solar e desinfetantes comuns, como etanol, iodo e hipoclorito, mas pode persistir em ambientes úmidos a temperatura ambiente (20° a 25°C) por 3 a 5 semanas (DVORAK e SPICKLER, 2008; FERRAREZI et al., 2020).

2.2. CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Observado sob microscopia óptica, *B. mallei* apresenta-se na forma de cocobacilos Gram-negativos com extremidades arredondadas, medindo aproximadamente de 2 a 5 µm de comprimento e 0,3 a 0,8 µm de largura. Na microscopia eletrônica é possível visualizar a sua cápsula, formada por carboidratos neutros proporcionando proteção contra fatores ambientais desfavoráveis. Não possui flagelos e falta de motilidade que é uma característica fenotípica crucial para o diagnóstico, importante de ser identificada quando a cultura está pura (OIE, 2018).

Nos meios de cultura, a morfologia das colônias varia em função do tipo do meio e da idade do cultivo. Culturas mais antigas, possuem pleomorfismo acentuado. Em ágar 5%

² NB3, ou Nível de Biossegurança 3, é um tipo de laboratório projetado para a manipulação segura de agentes patogênicos, que requer sistemas de engenharia para controle de ar, pressão, temperatura e umidade, garantindo assim a segurança dos usuários e do meio ambiente.

sangue de carneiro 2% glicerinado as colônias crescem, após 24 a 72 horas a 37°C, redondas, puntiformes, acinzentadas, com halo translúcido e brilhante, e não hemolíticas de aspecto viscoso (OIE, 2018). Além disto, filamentos ramificados se formam na superfície das culturas em caldo (NEUBAUER et al., 2005).

Pode ser caracterizado, com base em provas bioquímicas, como um microrganismo imóvel, sem crescimento a 42°C, não fermenta açúcares, não produz sulfeto de hidrogênio (H₂S), indol negativo, metaboliza a glicose pela via oxidativa, oxidase variável e catalase positiva (SUNIGA et al., 2023). Na presença de nitrogênio o organismo pode crescer aeróbio e anaeróbio facultativo (OIE, 2018).

2.3. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA DOS EQUÍDEOS

Estima-se que existam cerca de 116 milhões de equídeos - cavalos, burros e mulas, no mundo todo, sendo que 36 milhões localizam-se em 38 países de rendimento mais baixo. Esses animais, em sua maioria, passam a vida trabalhando, auxiliando na sobrevivência de pessoas em áreas de recursos limitados. A população mundial de equídeos manteve-se praticamente constante desde que os dados foram coletados entre 1961 e 2019 pela Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), com um aumento de 3% nos últimos 20 anos. Do total estimado aproximadamente 50,5 milhões são burros, 57 milhões de cavalos e 7,9 milhões de mulas (BROOKE, 2022; FAO, 2022).

O Brasil é considerado o país com maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro no mundo. Em 2021, o Brasil contava com cerca de 6,7 milhões de equídeos (IBGE, 2022). A equideocultura nacional está presente no transporte, na agropecuária (animais de carga ou manejo do gado), em terapias de desenvolvimento biopsicossocial de pessoas com deficiências e/ou necessidades especiais (equoterapia), nas forças armadas e estão cada vez mais presente nos esportes. O agronegócio dos equinos abrange diversos setores, como a produção de insumos, a criação e o uso final dos animais, o que gera uma movimentação de R\$16 bilhões anuais e cria cerca de 3 milhões de postos de trabalho diretos e indiretos (LIMA & CINTRA, 2016).

Sendo assim, qualquer interrupção no comércio devido ao mormo pode ter um impacto significativo na economia. A doença tem causado transtornos e prejuízos para a equideocultura nacional, pois os órgãos sanitários oficiais dos países vizinhos adotam medidas de controle desta doença em seus territórios, fechando as fronteiras com o Brasil. Isso significa que a exportação de equídeos para esses países é interrompida, causando ainda mais prejuízos para o setor (PIOTTO et al., 2021).

Apesar da presença de uma população substancial de equídeos, observa-se a existência de lacunas significativas nas práticas de manejo sanitário. Essas deficiências podem criar um ambiente propício para a proliferação de várias doenças infecciosas, incluindo o mormo.

2.4. RELEVÂNCIA DA SANIDADE DE EQUÍDEOS NA CADEIA PRODUTIVA

A sanidade dos equídeos desempenha um papel de extrema importância na estabilidade econômica. Esses animais têm uma função essencial em várias esferas, abrangendo o cenário econômico, social, político, bem como no contexto militar e agropecuário em nível global.

Com o intuito de fortalecer o complexo agropecuário de equídeos no país, foi instituído o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE). Esse programa tem como meta principal prevenir, identificar, controlar e eliminar enfermidades que possam prejudicar a criação desses animais, por meio de defesa sanitária e vigilância (BRASIL, 2008).

Aprimorar o monitoramento sanitário dos rebanhos também pode simplificar os trâmites relacionados à importação e exportação de equídeos vivos, sêmen e derivados provenientes do abate. Isso poderia acarretar um impacto substancial na economia, visto que a saúde desses animais é fundamental para a sustentabilidade e a rentabilidade desse setor. Portanto, a preservação da saúde dos equídeos é crucial tanto para a economia quanto para o bem-estar animal.

2.5. EPIDEMIOLOGIA NO BRASIL

A origem do mormo no Brasil está ligada à importação de equinos da Europa no século XIX. Como esses animais eram muito empregados em atividades de transporte e tração, a doença, denominada na época como “catarro e cancro nasais”, se propagou facilmente e causou muitas mortes (BRAGA, 1940; PIMENTEL, 1938; SANTOS et al., 2001).

Depois de vários registros da zoonose, com descrição dos aspectos clínicos, microbiológicos, histopatológicos e epidemiológicos, sugeriu-se que a doença foi erradicada no Brasil. O último relato de um foco nessa época foi registrado no município de Campos, Rio de Janeiro, por Langenegger e colaboradores (1960).

Mota e colaboradores (2000) identificaram equídeos com diagnóstico, clínica, microbiologia e epidemiologia compatíveis com mormo nos Estados de Pernambuco e Alagoas, 30 anos após o último foco notificado, evidenciando a “reemergência” da doença.

Depois desse intervalo, a comunidade científica se dedicou à produção de pesquisas

científicas para demonstrar dados relevantes sobre as características clínicas, epidemiológicas, patológicas, microbiológicas, sorológicas e moleculares da doença do mormo no Brasil. Em uma revisão sistemática realizada abrangendo o período de 2000 a 2022 foram obtidos 41 documentos, sendo 12 dissertações, cinco teses e 24 artigos científicos (MOTA e PINHEIRO JÚNIOR, 2022).

No período de 2010 a 2019, foram notificados 1.398 casos de mormo no território nacional. A análise da distribuição anual dos casos notificados revela um pico em 2015, possivelmente relacionada à exigência do exame negativo para o mormo no trânsito de equídeos em vários estados, seguido de uma queda acentuada a partir de 2016 (RAMOS et al., 2021).

Ainda sobre esse período, a maioria dos casos notificados ocorreram na região nordeste brasileira, que apresenta o segundo maior rebanho equino nacional, ficando atrás apenas do rebanho paulista. Ainda assim, apresentou o triplo de casos positivos notificados (RAMOS et al., 2021). Essa maior incidência da região Nordeste pode ser explicada pelo alto número de equídeos que ainda são empregados no transporte da cana-de-açúcar e que não recebem o manejo sanitário adequado, além de serem mantidos em ambientes coletivos com baixa ventilação e alta umidade, favorecendo a propagação bacteriana (SILVEIRA et al., 2013).

O mormo é altamente transmissível entre os equídeos, especialmente em condições estressantes e insalubres. Exsudatos e secreções de animais infectados contêm grande número de microrganismos, que podem se espalhar no ambiente e em fômites (OIE, 2018). A transmissão entre equídeos pode ocorrer por meio da ingestão do patógeno em alimentos, água e/ou equipamentos contaminados, além de abrasões cutâneas e mucosas ou exposição a aerossóis (GROVES et al., 2019).

Vários trabalhos têm sido realizados no Brasil para o estudo da prevalência da doença e detecção dos casos e surtos (MOTA et al., 2000; MACHADO et al., 2013; CHAVES et al., 2015; RAMOS et al., 2021; FALCÃO et al., 2022; RESENDE et al., 2022; SUNIGA et al., 2023). Devido a gravidade da afecção para a saúde humana e animal, medidas preventivas efetivas devem ser adotadas para conter o avanço da doença no Brasil.

2.6. PATOGENIA

O mormo pode se desenvolver em equídeos de forma aguda ou crônica e pode apresentar diferentes perfis de susceptibilidade de acordo com a espécie. Os muares são os mais suscetíveis à forma aguda da doença, que pode ser fatal em poucos dias ou semanas. No

entanto, assim como os demais equídeos, também podem desenvolver a doença crônica, que é mais prolongada, pode ser subclínica inicialmente, com sinais mínimos de doença ou assintomática, dificultando assim um diagnóstico preciso (MOTA et al., 2000). Sabe-se que cavalos cronicamente infectados atuam como reservatório primário de *B. mallei* (NEUBAUER et al., 2005).

A porta de entrada para *B. mallei* são as membranas dos tegumentos e mucosas do hospedeiro, principalmente a mucosa intestinal. Após sua penetração pelas mucosas, as bactérias se espalham através de vasos linfáticos até alcançarem os linfonodos sentinelas. Ao se alojarem, multiplicam-se e, logo após, seguem para a corrente sanguínea. Assim, disseminam-se por todo o organismo, alcançando os órgãos por via hematogênica. Desse modo, os sistemas circulatórios sanguíneo e linfático são imprescindíveis na disseminação do agente nos tecidos (PITT & DANCE, 2005).

O grau de virulência determina o curso da doença - crônica e aguda. A patogenidade é influenciada tanto pela susceptibilidade do hospedeiro quanto pela manifestação dos fatores de virulência pelo agente infeccioso. Diversos fatores de virulência para *B. mallei* já foram identificados (SCHELL et al. 2007; WIKRAIPHAT et al. 2009; MEMIŠEVIĆ et al., 2013). Um trabalho recente ressaltou a virulência detectável da cepa brasileira *B. mallei* BAC 86/19 em camundongos, hospedeiros relativamente resistentes, e reiterou a importância da investigação contínua dos mecanismos de virulência, em especial isolados brasileiros, e potenciais contramedidas associadas às infecções por *B. mallei* (GASPAR et al., 2023). Ressalta-se que a diversidade genética e a patogenidade de cepa regionais podem estar relacionadas às mutações genéticas decorrentes de fatores ambientais locais.

O período de incubação pode durar apenas alguns dias a meses dependendo da intensidade da exposição ao patógeno, da via de infecção e de fatores intrínsecos do hospedeiro (CASTRO, 2015). A forma aguda da doença tem um período de incubação de 1 a 14 dias, enquanto a forma crônica tem um período de incubação maior, de até 12 semanas (DARLING et al., 2004).

Os locais de predileção no hospedeiro incluem pulmões, trato respiratório superior e vasos linfáticos, onde formam nódulos (SHARRER, 1995). A bactéria também pode ser encontrada nas mucosas nasal, oral, faríngea e traqueal, onde ressalta-se a importância da fácil disseminação por essas vias (SUNIGA et al., 2023).

2.7. SINAIS CLÍNICOS

O mormo em equídeos pode apresentar em três diferentes manifestações clínicas:

pulmonar, nasal e cutânea. No entanto, distingui-las pode ser desafiador, pois frequentemente apresentam sintomas sobrepostos. A forma pulmonar é identificada em praticamente todos os casos clínicos, sendo que a manifestação pulmonar-cutânea representa a forma mais prevalente do mormo em surtos. A evolução clínica da doença pode variar entre aguda a crônica (KHAN et al., 2013).

O mormo agudo é mais frequentemente observado em burros e mulas e é fatal em poucos dias a semanas (MOTA et al., 2010). O mormo em sua forma crônica surge geralmente em equinos, quando o animal pode permanecer infectado sem sinais aparentes por meses ou até mesmo anos, podendo ocorrer períodos de agravamento a qualquer momento. O mormo crônico pode resultar em fatalidade, embora alguns casos possam apresentar recuperação clínica e permanecer como portadores ao longo da vida (KHAN et al., 2013).

A fase aguda se inicia com sinais leves como calafrios, febre alta, depressão, anorexia e perda de peso. Clinicamente marcada por tosse e secreção nasal aquosa, os nódulos e úlceras se desenvolvem rapidamente no septo nasal e nos ossos das conchas nasais. Com a progressão, ocorre uma secreção abundante, espessa e mucopurulenta, branca-amarelada ou hemorrágica, o que dificulta a respiração. Pode haver linfadenomegalia e enrijecimento dos linfonodos mandibulares e inchaço da glote em alguns casos. A morte pode ocorrer em dias ou semanas devido a insuficiência respiratória, como broncopneumonia e septicemia (SHARRER, 1995; AL-ANI & ROBERSON, 2007; OIE, 2018).

O mormo crônico, que pode durar meses a anos, apresenta episódios de piora e melhora sucessiva das condições corporais. A forma pulmonar é comum embora seja muitas vezes latente e assintomática. Os animais afetados podem desenvolver sintomas leves que podem passar despercebidos, como respiração leve e febre intermitente. Com a progressão da doença os animais podem apresentar apatia, fraqueza, tosse intermitente, inchaço das articulações traseiras, epistaxe, inchaço testicular e hematúria. Os sinais clínicos na fase terminal da doença incluem broncopneumonia com evolução para a morte por asfixia (SHARRER, 1995; MUHAMMAD et al., 1998; OIE, 2018).

Em condições de estresse, podem surgir lesões pulmonares causando broncopneumonia aguda. As formas nasal e cutânea do mormo podem se exacerbar, provocando ao desenvolvimento de nódulos inflamatórios e úlceras nasais, o que resulta em secreção nasal amarela pegajosa e linfonodos mandibulares aumentados e firmes. A perfuração do septo é comum em casos crônicos. As úlceras nasais cicatrizam deixando pequenas cicatrizes esbranquiçadas e endurecidas (AL-ANI & ROBERSON, 2007; OIE, 2018).

Na forma cutânea, lesões comuns ocorrem nas coxas, membros, barriga e raramente na face, pescoço e tórax. Os vasos linfáticos superficiais apresentam-se aumentados (linfangite) e, ocasionalmente, com abscessos nodulares de conteúdo purulento que podem ulcerar. As lesões, superficiais ou profundas, aparecem ao longo dos vasos linfáticos espessados e podem se transformar em úlceras que liberam um pus espesso. As úlceras cicatrizam lentamente, excretando secreção serosa. Lesões profundas causam inchaço nas articulações e, às vezes, edema difuso nos membros posteriores. O animal pode manter boas condições por um tempo, mas eventualmente sucumbe à doença (AL-ANI & ROBERSON, 2007; KHAN et al., 2013).

2.8. DIAGNÓSTICO

Para dar suporte a medidas de prevenção e controle do mormo, o diagnóstico laboratorial é essencial. Por sua maior praticidade em larga escala, o diagnóstico do mormo é baseado, principalmente, em testes sorológicos (CASTRO, 2015).

A sorologia é um método que utiliza a detecção de imunoglobulinas específicas para os agentes infecciosos, também denominados antígenos. As principais classes de imunoglobulinas envolvidas na sorologia são IgM e IgG, que são produzidas pelo sistema imunológico em diferentes etapas da resposta imune. Imunoglobulinas da classe IgM são sintetizadas logo após a infecção, posteriormente substituída pela IgG, que confere maior proteção e memória imunológica (ARMSTRONG, 2008).

De acordo com a Instrução Normativa do Ministério da Agricultura e Pecuária (BRASIL, 2023), o diagnóstico sorológico do mormo é feito através do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - ELISA (do inglês - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) como testes de triagem e a confirmação dos animais reagentes por *Western Blotting*, que tem maior especificidade que os testes de triagem.

Animais que forem positivos, de acordo com os parâmetros descritos, e apresentarem sinais clínicos da doença serão submetidos à eutanásia, a propriedade será interditada e submetida a regime de saneamento. A liberação da propriedade será realizada após dois testes negativos consecutivos de todo o plantel com intervalos de 45 a 90 dias. Animais assintomáticos não são classificados como casos suspeitos e não precisam ser testados obrigatoriamente para a emissão da Guia de Trânsito Animal (GTA) para participar de eventos. (BRASIL, 2018; BRASIL, 2023).

A OIE (2018) também prescreve métodos alternativos de ensaios, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), Reação em Cadeia de Polimerase em tempo real (qPCR – do inglês *Real Time Quantitative PCR*), polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição

de PCR, eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE – do inglês *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*), ribotipagem, Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (RAPD – do inglês *Random Amplified Polymorphic DNA*), número variável de análise de repetição em tandem (MLVA – do inglês *Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis*) ou tipagem de sequência multilocus (MLST – do inglês *Multilocus sequence typing*) apropriados para uso em laboratórios especializados.

O cultivo bacteriano é o método de referência para a identificação de microrganismos. No entanto apresenta algumas desvantagens, tais como a demora na obtenção dos resultados, a exigência de condições específicas de biossegurança e transporte das amostras e a dificuldade de isolamento de certos patógenos (PERANTONI & QUEIROZ-FERNANDES, 2019). As colônias acinzentadas e brilhantes de *B. mallei* em ágar de sangue de ovelha podem ser confundidas com outros microrganismos e seu crescimento sobreposto por outras bactérias, tornando o isolamento para diagnóstico de mormo um desafio (OIE, 2018).

2.9. CONTROLE E PREVENÇÃO

Embora não existam tratamentos ou imunização disponíveis para o mormo, estudos estão em andamento para desenvolver uma vacina eficaz contra essa doença (MOHLER & EICHHORN, 1914; TORRES et al., 2015; JOHNSON & AINSLIE, 2017; BIRYUKOV, S. S. et al., 2022). Com isso, são necessários programas sanitários que identifiquem e eliminem os animais infectados, controlem o trânsito de equídeos, determinem a higienização e isolamento das áreas e instalações da criação afetada, para poder realizar o controle da doença e prevenção da sua transmissão.

No Brasil, o Ministério da Agricultura e Pecuária coordena o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos – PNSE, que tem como objetivo fortalecer o setor dos equídeos com ações de vigilância e defesa sanitária animal, como educação sanitária, estudos epidemiológicos, controle do trânsito, cadastramento, fiscalização e certificação sanitária e intervenção imediata em casos de doenças de notificação obrigatória (BRASIL, 2008).

2.10. GENOMA E EVOLUÇÃO

O genoma de *B. mallei* possui um tamanho aproximado de 5,7Mb, distribuído em dois cromossomos circulares. Seu genoma é menor do que *B. pseudomallei*, resultando nas diferenças existentes entre ambas as espécies (Figura 1). Além de ser menor, poucos genes são específicos de *B. mallei*, 99% de seu genoma se assemelha a *B. pseudomallei*. No entanto, a variabilidade genética entre as cepas de *B. mallei* (33% a 41%) é maior quando comparada a

B. pseudomallei (11% e 22%) (LOSADA et al., 2010; BRANGSCH et al., 2022).

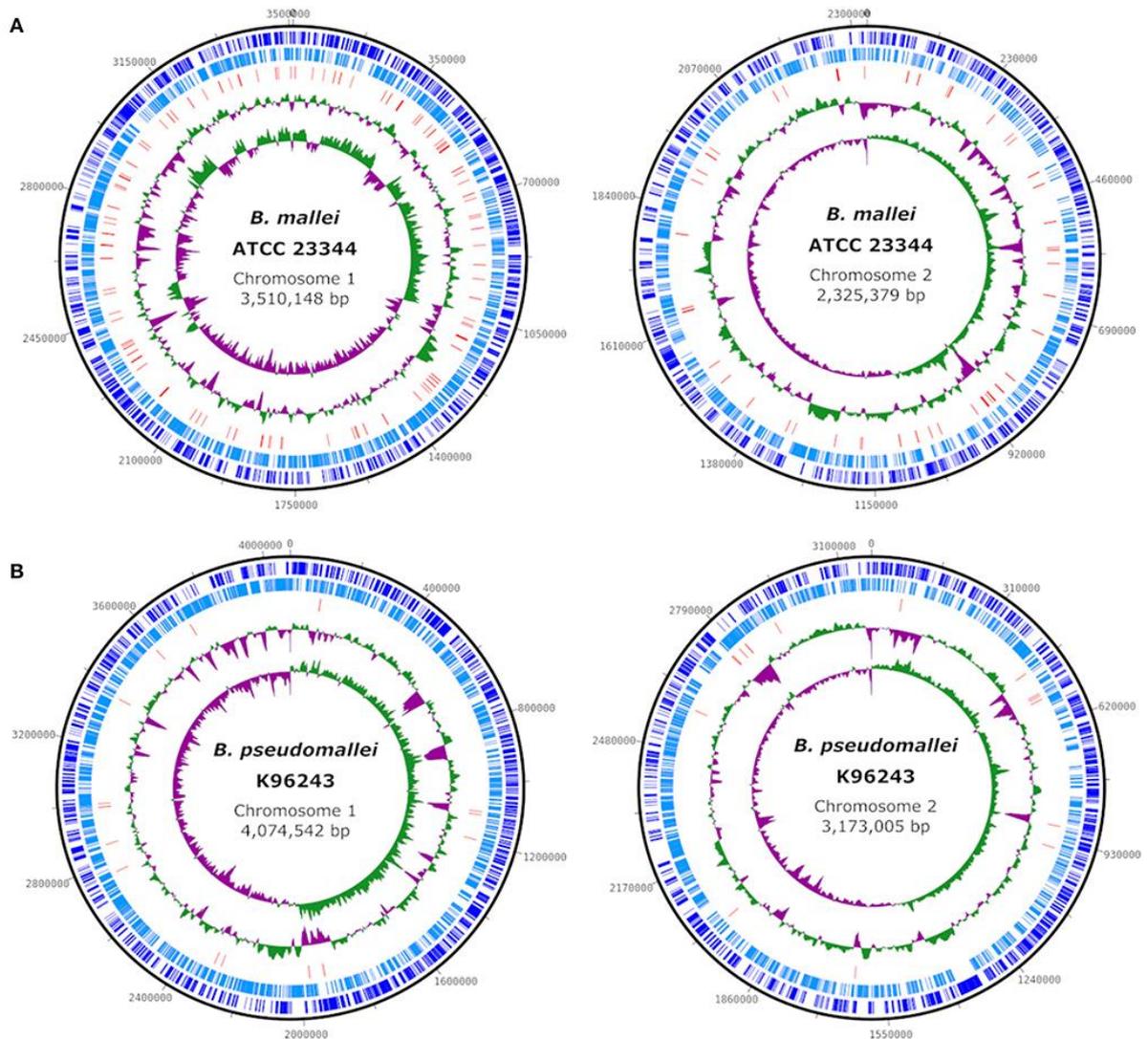


Figura 1. Comparação da estrutura cromossômica das cepas de *B. mallei* ATCC 23344 (CP000010, CP 000011) (A) e *B. pseudomallei* K96243 (NC_006350, NC_006351) (B). Círculos (de fora para dentro) determinam as sequências codificadas nas fitas *forward* (azul escuro) e *reverse* (azul claro), genes preditos codificadores da transponstase (vermelho), conteúdo de GC e inclinação de GC (BRANGSCH et al., 2022).

A hipótese é que *B. mallei* evoluiu de um ancestral único de *B. pseudomallei*, tornando difícil diferenciá-los devido à semelhança genômica. Essa separação pode ter começado com a introdução da cepa ancestral em um hospedeiro equino e subsequente adaptação. A evolução resultou em uma redução significativa do tamanho do genoma por perda de genes desnecessários para a sobrevivência no hospedeiro. Ilhas genômicas que codificam funções em *B. pseudomallei*, como produção de antibióticos e vias metabólicas, foram perdidas (NIERMAN et al., 2004; LOSADA et al., 2010). Com isso, *B. mallei* perdeu a versatilidade

de sobreviver no ambiente, tornando-se um patógeno obrigatório restrito a poucos hospedeiros.

O genoma de *B. mallei* contém 5.535 sequências de DNA, chamadas fases de leituras abertas (ORFs – do inglês *Open Reading Frame*), regiões que podem codificar proteínas. Não é possível determinar de forma clara e incontestável o ponto exato onde começa a replicação dos cromossomos, ou seja, o local onde o DNA começa a se duplicar, ao contrário do caso dos cromossomos de *B. pseudomallei* (NIERMAN et al., 2004). Na figura 2 estão ilustrados dois diagramas circulares que mostram os cromossomos 1 e 2 de *B. mallei*, divididos em sete com diferentes características do genoma.

A primeira posição do cromossomo 1 é definida pela região entre os genes *dnaA* (BMA0001), *dnaN* (BMA0002) e *rnpA* (BMA3399). Perto da primeira posição do cromossomo 2, encontramos genes que criam proteínas semelhantes às *parA* (BMAA2114) e *parB* (BMAA2115), e uma possível proteína de replicação (BMAA2117). Isso sugere que a estrutura desse cromossomo é parecida com a de um plasmídeo. Assim como o menor cromossomo de *B. pseudomallei*, o cromossomo 2 tem genes importantes para o metabolismo, o que o torna essencial (NIERMAN et al., 2004; BRANGSCH et al., 2022).

Burkholderia mallei apresenta uma alta clonalidade, que indica que as bactérias são geneticamente muito semelhantes entre si, isto reflete em uma alta identidade média de nucleotídeos (ANI – do inglês *Average Nucleotide Identity*), que pode ser determinada in silico com base em sequências completas do genoma. A taxa de ANI para *B. mallei* é maior que 99%, isso indica uma baixa variabilidade genética (VARGHESE et al., 2015).

Embora *B. mallei* possua baixa variabilidade genética, uma porção significativa de seu genoma é composto por elementos funcionais extra-cromossômicos móveis. Sendo que, 5.33% dos seus genes (279 de 5229) são formados por esses elementos, em contraste com apenas 2.07% (131 de 6323) no genoma de *B. pseudomallei*. Essa diferença notável sublinha a importância desses elementos como impulsionadores da diversidade funcional. A transferência horizontal gênica e a aquisição e retenção de blocos de DNA que codificam genes proporcionam a evolução da espécie (DINIZ et al., 2008).

A elevada homogeneidade das estirpes, bem como a complexidade dos seus genomas dificultam a identificação, diferenciação e caracterização das cepas. Com o progresso tecnológico, especialmente no sequenciamento total de genomas, surgem novas oportunidades.

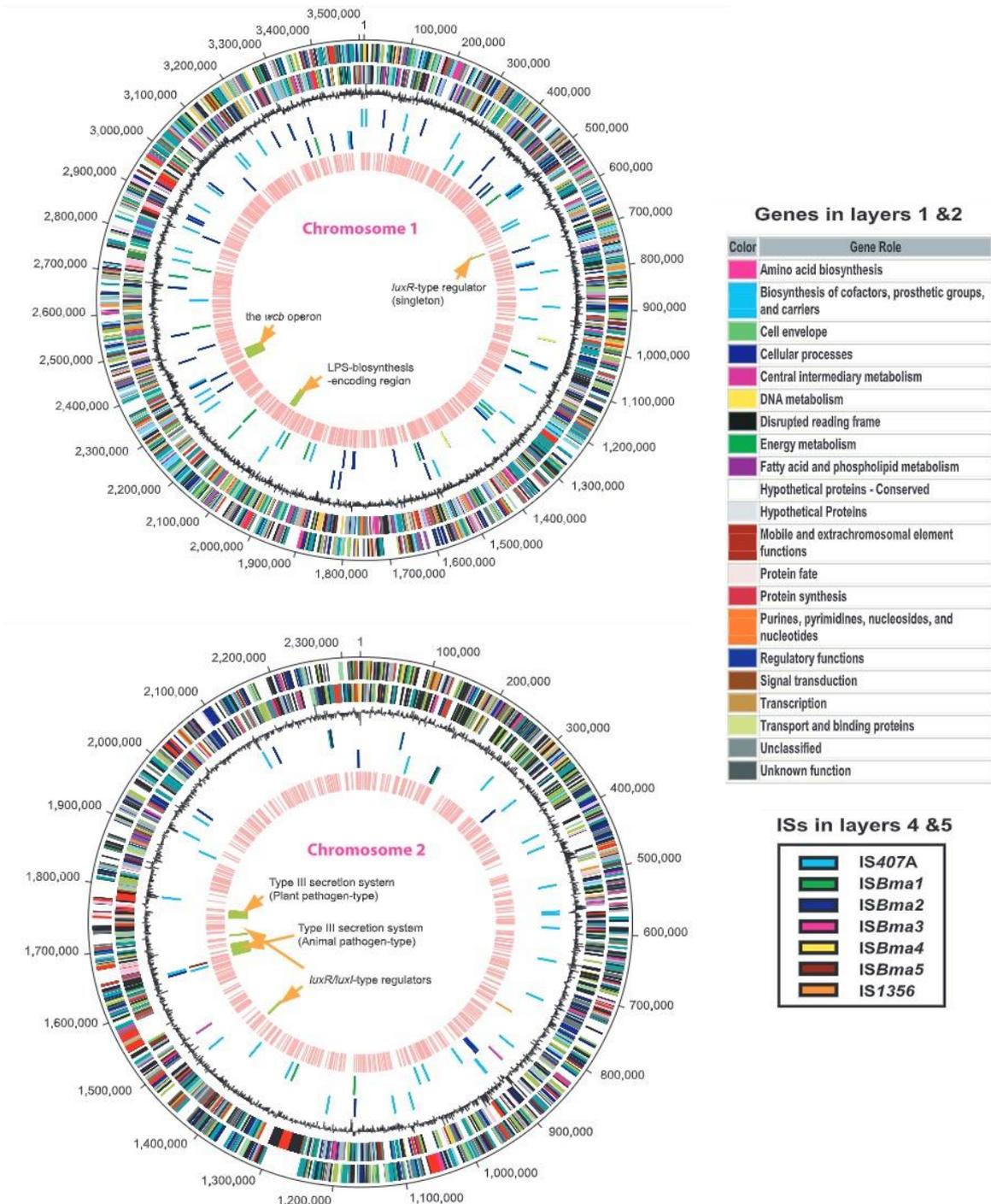


Figura 2. Diagramas circulares do cromossomo 1 e cromossomo 2 de *B. mallei*. As localizações de características genômicas são indicadas nas sete camadas de círculos. Da camada mais externa para a mais interna, temos: 1) Sequências de DNA que podem codificar proteínas, coloridas de acordo com suas funcionalidades; 2) As mesmas sequências de DNA, mas na direção oposta; 3) Inclinação de GC; 4) Elementos inserção (IS) que estão associados a quebras sintênicas no DNA, comparados com *B. pseudomallei*; 5) Elementos IS que não associados a quebras no DNA; 6) Sequências curtas de DNA que têm pelo menos uma adenina ou timina; 7) Genes que podem causar doenças. Além disso, os diagramas mostram a localização de vários genes importantes (adaptado de NIERMAN et al., 2004).

Diversos métodos de tipagem foram usados em cepas de *B. mallei* e, embora vários desses métodos sejam menos onerosos e simples, eles não são tão precisos quanto o MLVA.

Este método, que inicialmente analisava 32 loci, foi reduzido para 23 loci específicos para *B. mallei* pois alguns deles eram conservados demais dentro da espécie para serem úteis na diferenciação das cepas (HORNSTRA et al., 2009). Este método MLVA-23 foi usado para investigar surtos de mormo em diferentes países. Mais recentemente, foi proposto um painel ainda mais restrito de apenas seis marcadores MLVA (BONDAREVA et al., 2019). Os perfis MLVA gerados podem ser usados para análise comparativa usando diferentes algoritmos, que fornecem uma representação gráfica dos resultados, facilitando a interpretação.

Apesar da eficiência do MLVA de 23 loci, este é tecnicamente exigente e caro. Com a disponibilidade de sequências completas do genoma foram identificados SNPs³ (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism*) específicos para discriminar isolados de *B. mallei*. A análise de fusão de alta resolução pós-PCR (HRM – do inglês *High Resolution Melting*) permitiu essa discriminação. Um estudo propôs um método HRM para triar 15 SNPs informativos, subdividindo a espécie em 3 linhagens e 12 subgrupos. Os resultados confirmam a utilidade da genotipagem para a análise epidemiológica molecular de *B. mallei* (GIRAULT et al., 2018).

Outra técnica de tipagem é o estudo do genoma central (do inglês *core genome*). A técnica se refere ao conjunto de genes compartilhados por todas, ou quase todas, as cepas de uma determinada população ou espécie procariótica. Para *B. mallei* foi desenvolvido um ensaio robusto e reprodutível de digitação de sequência multilocus baseado em genoma central (cgMLST). Ele usa 3328 alvos genéticos para tipagem de alta resolução. O ensaio distingue claramente cepas de diferentes regiões geográficas e é útil para investigações de surtos e caracterização molecular de novos isolados de *B. mallei* (APPELT et al., 2022).

Além das técnicas descritas acima, também é possível realizar o Sequenciamento Total do Genoma (WGS – do inglês *Whole Genome Sequencing*). Esta é uma ferramenta que permite o sequenciamento e a análise total do genoma gerando informações de alta confiabilidade que podem ser utilizadas para determinação de relações filogenéticas, estudo de estrutura populacional, além de possíveis eventos de transmissão. No entanto, é mais caro e complexo do que métodos baseados em PCR (SCHOLZ et al., 2014).

2.10.1. ESTUDOS MOLECULARES DE *Burkholderia mallei* EM CASOS BRASILEIROS

Para a detecção molecular de *B. mallei* em casos de mormo, a diferenciação confiável

³ Substituição de um único nucleotídeo por outro em um determinado local em uma sequência de DNA. É a forma mais comum de polimorfismos observados no genoma.

e rápida deste organismo é um passo importante. Devido à baixa carga bacteriana geralmente presente no material infectado (OIE, 2018), a PCR é o método mais utilizado para uma análise inicial de amostras. No entanto, existem diversas outras formas de detectar o agente e realizar estudos genéticos que poderão servir como base para futuras ações (Figura 3).

A Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA) sugere dois ensaios de PCR para detectar *B. mallei*, um ensaio de PCR convencional e um de PCR em tempo real (SCHOLZ et al., 2006; TOMASO et al., 2006), ambos explorando o pseudogene da flagenina (fliP). O gene fliP é interrompido pelo elemento IS407A, que causa a imobilidade de *B. mallei* (NIERMAN et al., 2004). Esta interrupção foi usada para criar um sistema de PCR específico para *B. mallei*. No entanto, este sistema falhou recentemente em diagnosticar mormo, possivelmente devido a mutações, perda da inserção IS407A ou nova recombinação genômica (LAUROCAU et al., 2021).

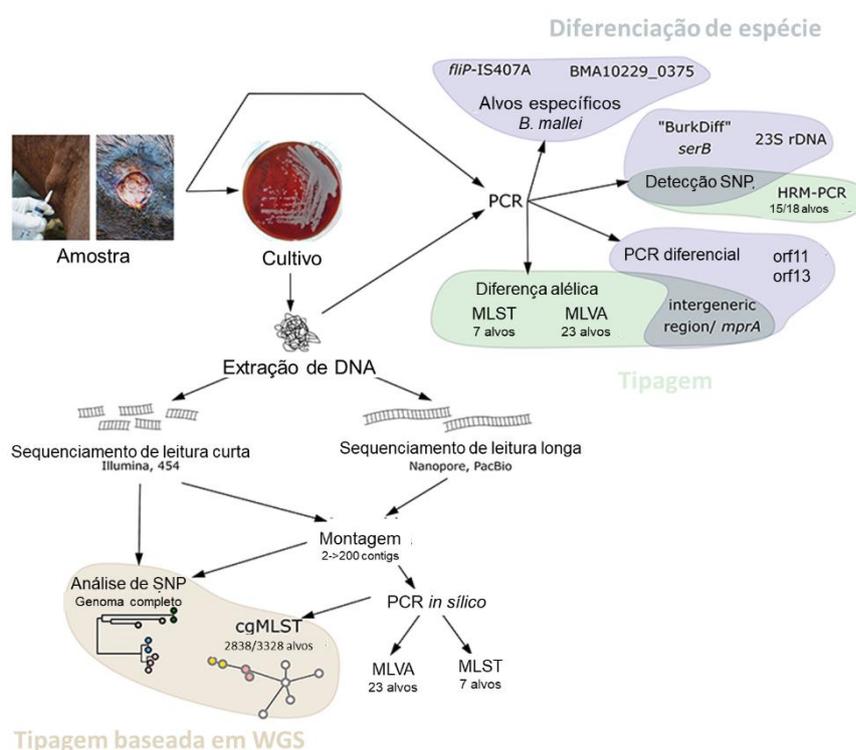


Figura 3. Visão geral esquemática dos métodos de detecção e tipagem de *B. mallei* baseados em PCR relevantes, bem como métodos que empregam sequenciamento do genoma (adaptado de Brangsch et al., 2022).

Em um estudo subsequente, Abreu et al. (2020) realizaram a detecção molecular de *B. mallei* utilizando primers modificados a partir dos primers descritos por Scholz et al. (2006) e Tomaso et al. (2006), produzindo um fragmento de 528 pares de base. Suniga et al. (2023) usaram os mesmos primers para testar a presença de *B. mallei* em 19 equídeos, a bactéria

identificada em 18 deles (94%).

Após a reemergência da doença no Brasil, no início do século XXI, trabalhos foram realizados buscando evidenciar aspectos que envolviam epidemiologia, clínica, transmissão e, em especial, características genéticas das cepas circulantes no país. No entanto, ainda há poucos estudos disponíveis com informações genéticas de isolados brasileiros de *B. mallei*.

Um trabalho realizado por Silva et al. (2009), demonstrou quatro perfis genotípicos distintos existentes entre oito cepas de *B. mallei* da região nordeste, por ribotipagem, o que revela certa heterogeneidade genômica. Posteriormente, o genoma da cepa 16-2438-BM, isolada de uma mula do estado de Pernambuco, foi sequenciado por Girault et al., (2017). O isolado também foi caracterizado pela análise de polimorfismos únicos (SNPs) e agrupado juntamente com algumas cepas da Hungria, Índia, Irã, Rússia e Estados Unidos da América e diversas cepas turcas, no agrupamento L3 (LAROUCAU et al., 2018). Ainda na região nordeste, Falcão et al. (2019) identificaram a presença de *B. mallei* em seis equídeos por meio do sequenciamento de um fragmento amplificado por PCR.

Nassar et al. (2020), por meio da detecção do pseudogene da flagenina (fliP), relataram pela primeira vez a presença da bactéria em amostras de leite uma égua soropositiva, além de identificar o patógeno também em feto, sugerindo a transmissão transplacentária.

A detecção molecular é eficaz em animais com ou sem sinais clínicos. Rocha et al. (2021) acompanharam dois focos de mormo em Alagoas e reiteraram a variabilidade dos sintomas clínicos de animais soropositivos. Nesse mesmo trabalho, foram identificados dois animais por PCR utilizando quatro pares de primers: dois que amplificam a região fliP e outros dois BURK-fD1 e BURK-rD1, que são complementares às regiões conservadas do rDNA 16S. No Mato Grosso, houve o relato da detecção de uma sequência compatível com *B. mallei* em um cavalo assintomático (ROCHA et al., 2023).

Seis isolados de *B. mallei* de necropsias de cavalos assintomáticos soropositivos para mormo em Pernambuco e Alagoas foram analisados por PCR-HRM. Quatro cepas agruparam-se no ramo L3B2, onde já havia sido agrupada a cepa brasileira 16-2438_BM#8, e duas no ramo L3B3sB3, majoritariamente de isolados antigos da Europa e Médio Oriente. O sequenciamento genômico de duas dessas cepas confirmou a tipagem HRM e revelou um genótipo inédito em cepas contemporâneas. Os resultados indicam múltiplas introduções de mormo no Brasil, possivelmente ligadas a cepas européias (FALCÃO et al., 2022).

2.11. PROTEÔMICA DE *Burkholderia mallei*

A espectrometria de massa com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massas do tipo tempo-de-vôo (MALDI-TOF do inglês *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight*) é uma ferramenta de pesquisa inovadora na detecção e identificação de uma ampla gama de isolados bacterianos (SRIRAM et al. 2018). Esta técnica avançada permite a comparação detalhada do espectro de massas de um microrganismo isolado com os espectros de referência de cepas conhecidas, proporcionando uma classificação e identificação mais rápida e precisa do patógeno em comparação com os métodos convencionais (PATEL, 2015).

Devido à sua velocidade, robustez e aos custos mínimos de preparação e medição de amostras, a técnica MALDI-TOF é adequada para uso rotineiro e de alto rendimento em laboratórios de microbiologia (HUANG et al. 2018). A análise proteômica por MALDI-TOF, que examina o conjunto completo de proteínas expressas por um organismo, pode permitir a identificação correta dos isolados de *B. mallei*. Além disso, pode ajudar a distinguir possíveis contaminações de outras bactérias, aumentando a precisão do diagnóstico. No entanto, os espectros de referência para *B. mallei* e *B. pseudomallei* não estão disponíveis nos bancos de sistemas MALDI-TOF comerciais, como os da Bruker Daltonics, devido a preocupações de biossegurança, pois esses microrganismos são considerados armas biológicas (RUDRIK et al., 2017).

Na literatura é possível encontrar estudos com bactérias do gênero *Burkholderia*. No entanto, poucos abordando especificamente *B. mallei*. Karger et al. (2012) realizaram um trabalho com o objetivo de identificar e diferenciar de forma rápida e confiável *B. pseudomallei* e *B. mallei*, além de construir um banco de dados de referência confiável para ambos os organismos. Foi possível identificar maior homogeneidade em *B. mallei* e concluíram que para espécies intimamente relacionadas, o processo de identificação com o software MALDI Biotyper (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha) requer a seleção cuidadosa de espectros de cepas de referência.

No Brasil, estudos também foram conduzidos sobre o patógeno. Em um estudo piloto, a espectrometria de massas MALDI-TOF identificou isolados de *B. mallei* com 80% de precisão. Sinais m/z discriminatórios permitiram a classificação correta de 100% dos isolados clínicos de *B. mallei* (VERBISCK et al., 2020). Posteriormente o mesmo grupo publicou um segundo trabalho e obtiveram o espectro de referência (MSP – do inglês *Main Spectra Profile*) da cepa 86/19 de *B. mallei*, disponível para cultivo local, o que gerou avanços

significativos na identificação da bactéria via espectrometria de massas MALDI-TOF. A confirmação genotípica e taxonômica foi obtida pelo sequenciamento do genoma e o perfil de proteínas validado contra outros MSPs de *B. mallei* e *B. pseudomallei*. No entanto, a certificação do método depende da análise de mais amostras clínicas de *B. mallei* e *B. pseudomallei* (VERBISCK et al., 2022).

3. REFERÊNCIAS

- ABREU, D. C. et al. Systematic monitoring of glanders-infected horses by complement fixation test, bacterial isolation, and PCR. **Veterinary and Animal Science**, 2020, 10, 100147.
- AL-ANI, F. K; ROBERSON, J. Glanders in horses: A review of the literature. **Veterinarski Arhiv**, 2007, 77, 3: 203.
- APPELT, S. et al. Genetic diversity and spatial distribution of *Burkholderia mallei* by core genome-based multilocus sequence typing analysis. **PloS one**, 2022, 17.7: e0270499.
- ARMSTRONG, B. **Immunology**. In: ARMSTRONG, B., et al. Introduction to blood transfusion technology. **ISBT science series**, 2008, 3, 2: 254-283.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 17, DE 8 DE MAIO DE 2008. **Diário Oficial da União**, 8 maio. 2008. Disponível em: <https://central3.to.gov.br/arquivo/270022/> Acesso em: 04 jan 2024.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diretrizes para o cuidado das pessoas com doenças crônicas nas redes de atenção à saúde e nas linhas de cuidado prioritárias**. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, Brasília : Ministério da Saúde, 2013: 28.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 6, DE 16 DE JANEIRO DE 2018. **Diário Oficial da União**: ed. 12, seção 1, p. 3, 17 jan 2018. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/201801/19140343-instrucao-normativa-n6-de-16-de-janeiro-de-2018.pdf> Acesso em: 15 ago 2023.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária - MAPA. PORTARIA MAPA Nº 593, DE 30 DE JUNHO DE 2023. **Diário Oficial da União**: ed. 124, seção 1, p. 12, 03 jul 2023. Disponível em: <https://www.agricultura.rs.gov.br/upload/arquivos/202307/06161340-pese-portaria-mapa-n-593-de-30-de-junho-de-2023-de-2023.PDF>. Acesso em: 15 ago 2023
- BONDAREVA, O. S. et al. Development of genotyping method of the glanders causative agent based on multiple locus variable-number tandem repeat analysis. **Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology**, 2019, 96, 5: 8-16.

- BRAGA, A. Sobre a titulação da maleína. **Sôro, Vacinas, Alérgenos e Imunógenos**. Rio de Janeiro: Serviço de Informação Agrícola, 1940, 151-164.
- BRANGSCH, H. et al. Sequence-based detection and typing procedures for *Burkholderia mallei*: Assessment and prospects. **Frontiers in Veterinary Science**, 2022, 9: 1056996.
- BROOKE. **Working Equids in Numbers: Why Data Matters for Policy**. 2022. Disponível em: <https://www.thebrooke.org/our-work/data-working-equids>. Acesso em 04 de jan de 2024.
- BIRYUKOV, S. S. et al. Evaluation of two different vaccine platforms for immunization against melioidosis and glanders. **Frontiers in Microbiology**, 2022, 13: 965518.
- CASTRO, R. S. Métodos de diagnóstico e estratégias de controle do mormo no Brasil. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, 2015, 18, 2: 99-103.
- CHAVES, D. P. et al. Soroprevalência de mormo, anemia infecciosa equina e brucelose do cavalo baixadeiro. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 2015, 22, 1.
- CHRISTOPHER, L. T. C. et al. Biological warfare: a historical perspective. **Jama**, 1997, 278, 5: 412-417.
- DARLING, R.G; WOODS, J.B. Glanders and Melioidosis. *In*: US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases. **USAMRIID's Medical Management of Biological Casualties. Handbook**. 5. ed. Fort Detrick, 2004. 32-39.
- DINIZ, M. C. et al. Análise genômica de *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*: dois patógenos de primeira grandeza e de genomas surpreendentemente complexos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 2008, 2, 1: 1-34.
- DVORAK, G. D.; SPICKLER, A. R. Glanders. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 2008, 233, 4: 570-577.
- FALCÃO, M. V. D. et al. First record of *Burkholderia mallei* Turkey 10 strain originating from glanderous horses from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2019, 50: 1125-1127.
- FALCAO, M. V. D. et al. Molecular characterization of *Burkholderia mallei* strains isolated from horses in Brazil (2014–2017). **Infection, Genetics and Evolution**, 2022, 99: 105250.
- FAO. **Working equids in numbers: why data matters for policy**. 2022. Disponível em: <https://www.fao.org/agroecology/database/detail/en/c/1473377/> Acesso em: 04 jan 2024
- FERRAREZI, B. F. et al. *Burkholderia mallei* e o mormo. **Revista Científica Intellectus**, 2020, 56. 1: 91.
- GASPAR, E. B. et al. Assessment of the Virulence of the *Burkholderia mallei* Strain BAC

- 86/19 in BALB/c Mice. **Microorganisms**, 2023, 11, 10: 2597.
- GIRAULT, G. et al. First draft genome for a *Burkholderia mallei* isolate originating from a glanderous mule from Brazil. **Genome Announcements**, 2017, 5, 28: 10.1128
- GIRAULT, G. et al. High-resolution melting PCR analysis for rapid genotyping of *Burkholderia mallei*. **Infection, Genetics and Evolution**, 2018, 63: 1-4.
- GROVES, M. G.; HARRINGTON, K. S. Glanders and melioidosis. *In: Handbook of Zoonoses*, CRC Press, 2. ed, Sec. A., 2019, 149-165.
- HORNSTRA, H. et al. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. **Emerging Infectious Diseases**, 2009, 15, .12: 2036.
- HUANG, T. et al. Rapid identification of mycobacteria from positive MGIT broths of primary cultures by MALDI-TOF mass spectrometry. **PloS one**, 2018, 13, 2: e0192291.
- IBGE. **Produção Agropecuária**. 2022. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/br>. Acesso em: 15 ago 2023.
- JOHNSON, M. M.; AINSLIE, K. M. Vaccines for the prevention of melioidosis and glanders. **Current Tropical Medicine Reports**, 2017, 4: 136-145.
- KARGER, A. et al. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. **BMC Microbiology**, 2012, 12, 1: 1-15.
- KHAN, I. et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2013, 60, 3: 204-221.
- LANGENEGGER, J.; DÖBEREINER, J.; LIMA, A. C. Foco de mormo (Malleus) na região de Campos, estado do Rio de Janeiro. **Arquivos do Instituto Biológico**, 1960, 3: 91-108.
- LAROUCAU, K. et al. First molecular characterisation of a Brazilian *Burkholderia mallei* strain isolated from a mule in 2016. **Infection, Genetics and Evolution**, 2018, 57: 117-120.
- LAROUCAU, K. et al. A genetic variant of *Burkholderia mallei* detected in Kuwait: Consequences for the PCR diagnosis of glanders. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2021, 68, 2: 960-963.
- LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. **Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo**. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2016. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexo-do-agronegocio-do-cavalo>. Acesso em: 15 ago 2023.
- LOSADA, L. et al. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction

- and large-scale rearrangements. **Genome, Biology and Evolution**, 2010, 2: 102-116.
- MACHADO, M. B. et al. Prevalência de mormo no estado de Pernambuco no período de 2006 a 2011. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, 2013, 16: 37-44.
- MEMIŠEVIĆ, V. et al. Novel *Burkholderia mallei* virulence factors linked to specific host-pathogen protein interactions. **Molecular & Cellular Proteomics**, 2013, 12, 11: 3036-3051.
- MOHLER, J. R.; EICHHORN, A. **Immunization tests with glanders vaccine**. US Department of Agriculture, 1914.
- MOTA, R. A., et al. Mormo em eqüídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2000, 20: 155-159.
- MOTA, R. A. Aspectos etiopatológicos, epidemiológicos e clínicos do mormo. **Veterinária e Zootecnia**, 2006, 13, 2: 117-124.
- MOTA, R. A. et al. Glanders in donkeys (*Equus Asinus*) in the state of Pernambuco, Brazil: A case report. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2010, 41: 146-149.
- MOTA, R. A.; PINHEIRO JUNIOR, J. W. Current status of glanders in Brazil: Recent advances and challenges. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2022, 53, 4: 2273-2285.
- MUHAMMAD, G.; KHAN, M. Z.; ATHAR, M. Clinico-microbiological and therapeutic aspects of glanders in equines. **Journal of Equine Science**, 1998, 9, 3: 93-96.
- NASSAR, A. F. C. et al. *Burkholderia mallei* isolation from milk of a mare and evidence of congenital transmission of glanders in equids. **Ars Veterinaria**, 2020, 36, 3: 181-186.
- NEUBAUER, H. et al. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. **Journal of Veterinary Medicine**, 2005, 52, 5: 201-205.
- NIERMAN, W. C. et al. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2004, 101, 39: 14246-14251.
- OIE. Chapter 3.6.11 Glanders and mielioidosis. **In: Manual of diagnostic tests and vaccines for Terrestrial Animals**. 2018. Disponível em: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.11_GLANDERS.pdf. Acesso em: 22 nov 2023.
- PATEL, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. **Clinical Chemistry**, 2015, 61, 1: 100-111.
- PERANTONI, L. M.; de QUEIROZ-FERNANDES, G. M. Evolução das técnicas diagnósticas em microbiologia clínica. **SALUSVITA**, Bauru, 2019, 38, 2: 529-542.
- PIMENTEL, W. História e organização do serviço veterinário do exército. **Revista Militar**

Médica Veterinária, 1938, 1: 283-322.

PITT, T. L.; DANCE, D. A. *Burkholderia spp.* and related genera. In: **Topley and Wilson's microbiology and microbial infections**. London: Hodder Arnold, Vol. 2. 10. Ed., 2010.

PIOTTO, M. A. et al. Mormo. **Série Zoonoses**. Conselho Regional de Medicina Veterinária de São Paulo. 2021. Disponível em: https://crmvsp.gov.br/wp-content/uploads/2021/02/MORMO_SERIE_ZOONOSES.pdf. Acesso em: 10 jan 2024.

RAMOS, L. M. M. et al. Avaliação epidemiológica do mormo no Brasil. **Research, Society and Development**, 2021, 10, 13: e446101321466-e446101321466.

RESENDE, C. F. et al. Glanders and brucellosis in equids from the Amazon region, Brazil. **Acta Tropica**, 2022, 231: 106429.

ROCHA, L. O. et al. Monitoring the outbreak of equine glanders in Alagoas, Brazil: Clinical, immunological, molecular, and anatomopathological findings. **Ciência Rural**, 2021, 51, 12, e20200834.

ROCHA, L. S. et al. Pathology, microbiology, and molecular evaluation of tissues from equids serologically positive for *Burkholderia mallei* in Midwestern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2023, 43: e07172.

RUDRIK, J. T. et al. Safety and accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of highly pathogenic organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, 2017, 55, 12: 3513-3529.

SANTOS, F. L. et al. Mormo. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, 2001, 4, 3: 20-30.

SHARRER, G. T. The great glanders epizootic, 1861-1866: a Civil War legacy. **Agricultural History**, 1995, 69, 1: 79-97.

SCHELL, M. A. et al. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. **Molecular Microbiology**, 2007, 64, 6: 1466-1485.

SCHOLZ, H. C. et al. Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliP-based polymerase chain reaction assay. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2006, 54,4: 241-247.

SCHOLZ, H. C. et al. Genotyping of *Burkholderia mallei* from an outbreak of glanders in Bahrain suggests multiple introduction events. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2014, 8,9: e3195.

SILVA, K. P. C. et al. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2009, 29: 439-444.

- SILVEIRA, P. et al. Glanders prevalence comparison between Zona da Mata, Agreste and Sertão from Pernambuco, Brazil, from 2005 to 2011. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, 2013, 16:45-52.
- SRIRAM, R. et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for rapid identification of *Mycobacterium abscessus*. **Medical Journal Armed Forces India**, 2018, 74, 1: 22-27.
- SUNIGA, P. A. P. et al. Molecular detection of *Burkholderia mallei* in different geographic regions of Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2023, 54, 2: 1275-1285.
- TANPIBOONSAK, S. et al. PCR-RFLP based differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **Molecular and Cellular Probes**, 2004, 18, 2: 97-101.
- TOMASO, H. et al. Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting *fliP* for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. **Clinical Chemistry**, 2006, 52, 2: 307-310.
- TORRES, A. G. et al. Protection of non-human primates against glanders with a gold nanoparticle glycoconjugate vaccine. **Vaccine**, 2015, 33.5: 686-692.
- VARGHESE, N. J. et al. Microbial species delineation using whole genome sequences. **Nucleic Acids Research**, 2015, 43, 14: 6761-6771.
- VANDAMME, P.; GOVAN, J. R. W.; LIPUMA, J. J. Diversity and role of *Burkholderia spp.* *In: Burkholderia: molecular microbiology and genomics*. Horizon Bioscience, p. 28, 2007.
- VERBISCK, N. V. et al. Caracterização e identificação de *Burkholderia mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF: resultados de um estudo piloto. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 47, 2020.
- VERBISCK, N. V. et al. Espectro de massas de referência para identificação de *Burkholderia mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, **Comunicado Técnico**, 165, 2022.
- WIKRAIPHAT, C. et al. Comparative in vivo and in vitro analyses of putative virulence factors of *Burkholderia pseudomallei* using lipopolysaccharide, capsule and flagellin mutants. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 2009, 56, 3: 253-259.
- WOAH. **Events management**. World Organization for Animal Health, 2023. Disponível em: <https://wahis.woah.org/#/event-management>. Acesso em: 15 ago 2023
- 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. **Microbiology and Immunology**, 1992, 36, 12: 1251-1275.

4. ARTIGO CIENTÍFICO: Detecção molecular de *Burkholderia mallei* em diferentes regiões do Brasil

Brazilian Journal of Microbiology (2023) 54:1275–1285
https://doi.org/10.1007/s42770-023-00965-9



VETERINARY MICROBIOLOGY - RESEARCH PAPER



Detecção Molecular de *Burkholderia mallei* em diferentes regiões do Brasil

Paula A. Pereira Suniga^{1,2} · Cynthia Mantovani³ · Maria G. Santos⁴ · Juliana S. Gomes Rieger³ · Emanuelle B. Gaspar⁵ · Fernando Leandro dos Santos⁶ · Rinaldo A. Mota⁶ · Karla P. Chaves⁷ · Andréa A. Egito^{2,4} · José Carlos O. Filho⁸ · Alessandra F. Castro Nassar⁹ · Lenita Ramires dos Santos^{4,*} · Flávio R. Araújo⁴

* Lenita Ramires dos Santos lenita.santos@embrapa.br

¹ Bolsista MAI/DAI, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, Av. Costa E Silva, Campo Grande, MS 79070-900, Brasil

² Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-FAMEZ/UFMS, Av. Senador Filinto Muller, 2443, Campo Grande, MS 79074-460, Brasil

³ Bolsa Embrapa Gado de Corte/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia, 830, Campo Grande, MS 79106-550, Brasil

⁴ Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia, 830, Campo Grande, MS 79106-550, Brasil

⁵ Embrapa Pecuária Sul, Rodovia BR-153, Km 632,9 Vila Industrial, Zona Rural, Caixa Postal 242, Bagé, RS 96401-970, Brasil

⁶ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil

⁷ Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, Alagoas, Brasil

⁸ Setor de Patologia Veterinária, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Rua Rui Barbosa 710, Cruz Das Almas, BA 44380-000, Brasil

⁹ Centro de Pesquisa Em Sanidade Animal, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, São Paulo, SP 04014-002, Brasil

Resumo

Mormo é uma doença contagiosa de equídeos causada pela bactéria Gram-negativa *Burkholderia mallei*. No Brasil, a doença é considerada reemergente e vem se expandindo, com registros de equídeos com sorologia positiva na maior parte das unidades federativas. No entanto, existem poucos relatos que descrevem a detecção genotípica do agente. Este estudo demonstrou a detecção de *B. mallei* por PCR espécie-específica diretamente de tecidos ou de culturas bacterianas, seguida de sequenciamento do amplicon em equídeos (equinos, muares e asininos) com sorologia positiva para mormo em todas as cinco regiões geográficas do Brasil. A evidência molecular de infecção por *B. mallei* em equídeos sorologicamente nesse estudo expande a possibilidade de isolamento de cepas e realização de caracterizações epidemiológicas baseadas em informações moleculares. A detecção microbiológica de *B. mallei* em culturas de swabs nasais e palatinos, mesmo em equídeos sem manifestações clínicas, aumenta a possibilidade de ambiental eliminação do agente.

Palavras-chave Mormo · PCR · sequenciamento de DNA · Necropsia · Zoonose

Introdução

O mormo é causado por uma bactéria Gram negativa, não fermentadora e não móvel, *Burkholderia mallei*, que afeta principalmente cavalos, mas também infecta mulas e burros [1]. *Burkholderia mallei* é considerada um agente zoonótico [2] e um potencial agente de bioterrorismo [3]. No entanto, a sua transmissão ao homem parece ser incomum, mesmo em casos de contacto frequente e próximo com animais infectados [4].

No Brasil, *B. mallei* foi descrita pela primeira vez em 1811 [5], e o país foi oficialmente considerado livre de mormo em 1960. A doença ressurgiu no país na década de 2000, com ocorrência de casos nos estados de Alagoas e Pernambuco [6]. O mormo representa um importante problema socioeconômico, uma vez que o programa de controle e erradicação de doenças prevê a eutanásia obrigatória de equídeos soropositivos [7, 8] sem compensação para os proprietários [9]. Todos os anos, o mormo ocorre em diversas zonas do país [10], causando graves perdas econômicas e restrições comerciais. A maior frequência de fazendas afetadas ocorre na região Nordeste [11]. De 1999 a 2021, foram notificados 3.164 casos de mormo no Brasil, segundo o Sistema de Informação de Sanidade Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (<https://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal>).

Apesar da evidência de uma ampla distribuição de mormo no Brasil, definida pela sorologia, relatos de isolamento de *B. mallei* ou detecção molecular não são frequentes, especialmente fora da região Nordeste [6, 12–18].

A Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) considera a cultura microbiológica e a PCR como padrão ouro para confirmação de casos clínicos de mormo [19]. No entanto, *B. mallei* possui características de cultura particulares, incluindo a necessidade de um meio de cultura dependente de glicerol e crescimento lento (até 72 horas de incubação) [12]. A sensibilidade dos ensaios de PCR para amostras clínicas é desconhecida. O resultado negativo, portanto, não é prova da ausência de *B. mallei* na amostra. Devido a estas dificuldades relacionadas com a cultura microbiológica e PCR, estas técnicas não são recomendadas para definir a ausência de infecção da população, a liberdade individual dos animais antes do movimento, políticas de erradicação ou prevalência de vigilância de infecções, para as quais os métodos serológicos são mais adequados [19].

A diferenciação das cepas de *B. mallei* em bases moleculares, a caracterização da diversidade genética e a definição dos eventos de transmissão e, portanto, o rastreamento das fontes de infecção são conhecimentos importantes para a definição de políticas públicas [20–22]. Além disso, a genotipagem também é importante para acompanhar a evolução natural do genoma de *B. mallei* [23, 24], já que a notável plasticidade do genoma nesta espécie, causada principalmente por rearranjos genéticos em grande escala orientados por elementos de inserção [20], pode impactar a detecção por PCR [25]. Outro aspecto importante da genotipagem de *B. mallei* é a possibilidade de diferenciação da infecção por *Burkholderia pseudomallei*, o que determina manifestações clínicas semelhantes [13].

Diferentes metodologias de genotipagem podem ser usadas, como tipagem de sequência multi-locus, números variáveis de análise de repetição em tandem, reação em cadeia da polimerase - fusão de alta resolução, sequenciamento do genoma completo e análise de tipagem de sequência multi-locus baseada no genoma central, com vários graus de resolução [14, 20–23]. Porém, todas essas ferramentas dependem do isolamento de *B. mallei* em cultura microbiológica.

Este trabalho descreve dados sobre a detecção genotípica de *B. mallei* em equídeos sorologicamente positivos para mormo de todas as regiões geográficas do Brasil.

Material e métodos

Amostras

Os casos de mormo incluídos neste estudo foram definidos por teste de triagem sorológica por ELISA e teste confirmatório por Western blot (Biovetech), conforme Instrução Normativa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) [8], exceto um cavalo proveniente do estado da Bahia, que foi positivo no ELISA e negativo no Western blot, mas foi eutanasiado por decisão do proprietário. Os animais eram provenientes dos estados do Rio Grande do Sul (n = 3), Santa Catarina (n = 2), São Paulo (n = 1), Mato Grosso (n = 2), Bahia (n = 5), Piauí (n = 1), Maranhão (n = 1), Sergipe (n = 1), Tocantins (n = 1) e Amazonas (n = 1). De acordo com a normativa, todos os animais foram eutanasiados, seguindo recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. O exame clínico e a necropsia dos animais foram realizados pelo Serviço Veterinário Oficial nas diferentes unidades da Federação. Fragmentos de órgãos, com ou sem lesões

sugestivas de mormo, bem como swabs nasais de cinco animais, swabs traqueais de três animais e swabs de palato de um animal, foram coletados durante a necropsia dos animais e encaminhados sob refrigeração ou congelados, para o Nível de Biossegurança 3 (NBA-3) da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil. Os tecidos do animal paulista foram enviados ao Instituto Biológico de São Paulo para detecção de *B. mallei*.

Cultivo microbiológico

Para o processamento das amostras, os tecidos recebidos foram previamente desinfetados com álcool 70% por cinco minutos e, em seguida, os fragmentos foram excisados em condições estéreis, delimitando principalmente as lesões quando presentes. Os fragmentos de tecido foram colocados em microtubos contendo 500 µl de caldo Brain Heart Infusion (BHI) e macerados em equipamento TissueLyser (Qiagen, Alemanha) com esfera metálica estéril.

Os macerados foram plaqueados em ágar sangue (5% de sangue de ovelha desfibrinado na base para ágar sangue) e 2% de glicerina. Os mesmos macerados foram cultivados em caldo BHI 2% glicerinado com 100 U/ml de penicilina e em caldo BHI glicerinado sem antibióticos. Todas as culturas foram realizadas a 37°C. O crescimento bacteriano foi acompanhado às 24 horas, 48 horas e 72 horas. Quando detectada a presença de crescimento no caldo BHI, o plaqueamento foi realizado em ágar sangue glicerinado. Para as placas que apresentaram crescimento bacteriano, as colônias foram subcultivadas, e esta nova cultura foi acompanhada nos mesmos intervalos de tempo mencionados acima. Aqueles que apresentaram crescimento de colônias sugestivas de *B. mallei* foram utilizados em processo de triagem para caracterizar a morfologia e o metabolismo desses microrganismos em testes bioquímicos. Os meios de triagem foram ágar MacConkey e ágar sangue com glicerina a 2%. Além da avaliação morfológica do crescimento bacteriano nos meios de cultura, foram realizados testes bioquímicos preliminares com ferro triplo açúcar (TSI), oxidase, catalase, motilidade sulfeto-indol (SIM), oxidação ou fermentação de glicose (OF), além da coloração de Gram. O teste de motilidade específica foi utilizado para diferenciar *B. mallei* (não móvel) e *B. pseudomallei* (móvel).

Para eliminar bactérias contaminantes co-cultivadas com *B. mallei*, foram utilizados meios semi-seletivos contendo antibióticos e antifúngicos. As colônias foram subcultivadas nos seguintes meios: ágar sangue glicerina 2% com penicilina e polimixina B e ágar BM contendo violeta cristal, ciclohexamida, ticarcilina dissódica, fosfomicina sódica e polimixina B [26 – adaptado].

Tabela 1 Descrição da região de origem, sexo, idade e alterações clínicas de equídeos com sorologia positiva para mormo no Brasil, que foram eutanasiados e necropsiados para detecção de *Burkholderia mallei*

Região	Estado	Espécie	Sexo	Idade (anos)	Manifestações Clínicas
Sul	Rio Grande do Sul	Equina	Fêmea	8	Nenhum
	Rio Grande do Sul	Equina	Macho	7	Nenhum
	Rio Grande do Sul	Equina	Macho	12	Nenhum
Sudeste	Santa Catarina	Equina	Macho	20	Insuficiência respiratória e edema no membro posterior
	Santa Catarina	Equina	Fêmea	5	Nenhum
	Santa Catarina	Equina	Macho	11	Nenhum
	São Paulo	Equina	Fêmea	3	Nenhum
	Nordeste	Bahia	Equina	Macho	12
Nordeste	Bahia	Equina	Macho	7	Secreção nasal
	Bahia	Equina	Fêmea	6	Nenhum
	Bahia	Equina	Fêmea	7	Nenhum
	Bahia	Equina	Fêmea	10	Secreção nasal e aumento dos linfonodos
	Piauí	Equina	Fêmea	9	Nenhum
	Sergipe	Muar	Fêmea	8	Tosse discreta
	Maranhão	Equina	Fêmea	5	Declínio de score corporal
Norte	Tocantins	Muar	Fêmea	16	Nenhum
	Amazonas	Equina	Fêmea	5	Nenhum
Centro Oeste	Mato Grosso	Asinina	Fêmea	2	Nenhum
	Mato Grosso	Equina	Fêmea	9	Declínio de score corporal

Extração de DNA e PCR

O DNA foi extraído de isolados bacterianos com perfil morfológico e bioquímico compatível com *B. mallei*, seguindo protocolo adaptado [27]. A cepa de *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) foi utilizada como controle negativo da extração de DNA. A purificação do DNA dos tecidos foi realizada utilizando o kit DNEasy Blood & Tissue (Qiagen, Alemanha). Em seguida, foi realizada reação em cadeia da polimerase (PCR), como alvo o IS407-fliP, conforme recomendado pela WOA [20], utilizando primers descritos por Abreu e colaboradores [12], com tamanho de *amplicon* de 528 pares de bases.

Sequenciamento de amplicons

Os produtos de PCR foram purificados de acordo com Werle et al. [28], utilizando as enzimas exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão. As reações de sequenciamento foram realizadas, em duplicata, pelo método de terminação de cadeia utilizando didesoxinucleotídeos marcados com fluorocromo [29]. Foi utilizado o kit BigDye® Terminator v3.1 da Applied Biosystem, seguindo as condições especificadas pelo fabricante. As reações foram ainda purificadas antes de serem sequenciadas usando EDTA e etanol. A eletroforese de seqüências foi realizada em equipamento ABI 3130XL (Applied Biosystem, EUA). As seqüências geradas pela eletroforese capilar foram exportadas no formato ABI e analisadas utilizando o programa SeqScape® Software v2.1 (Applied Biosystems, EUA), no qual os eletroferogramas foram alinhados a uma seqüência de referência do GenBank (CP010348.1) e editados. As seqüências de consenso foram submetidas à busca de homologia utilizando o programa BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Resultados

A caracterização dos animais incluídos no estudo é apresentada na Tabela 1. Neste estudo foram analisados materiais biológicos (fragmentos de órgãos e swabs de animais submetidos à eutanásia) de 10 Unidades da Federação Brasileiras, incluindo uma amostra de *B. mallei* de tecido equino do estado de São Paulo, que antes estava isolado no Instituto Biológico. Assim, conforme indicado na Tabela 1, foram consideradas as cinco regiões geográficas do país. Parte das informações referentes aos animais também são apresentadas.

Após a identificação de colônias bacterianas com morfologia sugestiva de *B. mallei*, foram selecionadas aquelas com perfil tintorial, bioquímico e cultural compatível para esta espécie: cocobacilos Gram-negativos, imóveis, não crescem a 42 °C, não fermentadores de açúcares, não produtores de H₂S, indol negativo, metabolizam a glicose pela via oxidativa, oxidase variável e catalase positiva e na triagem de meios de cultura, mostra pouco ou nenhum crescimento de colônia rosa em MacConkey [19].

A Tabela 2 mostra os resultados da análise PCR. Dos 19 equídeos incluídos no estudo, 18 (94,7%) foram positivos por PCR diretamente no tecido ou a partir da cultura microbiológica. O único cavalo negativo apresentou nódulos no pulmão, baço e fígado. Dos 18 animais positivos para PCR, a detecção de *B. mallei* diretamente nos tecidos pela PCR foi possível em 4 (22,28%) equídeos da concha etmoidal, traqueia, pulmão, fígado, rim, linfonodos renais e mesentéricos. A partir da PCR das culturas microbiológicas foi possível identificar *B. mallei* em 18/18 (100%) equídeos, com sítios mais frequentes no pulmão e baço. Em três cavalos (Rio Grande do Sul, Piauí e Bahia), sem manifestações clínicas, nos quais foram coletadas amostras de swabs nasais, houve detecção genotípica de *B. mallei* a partir da cultura microbiológica, e em um cavalo, *B. mallei* foi detectado a partir da cultura bacteriana de um esfregaço de palato. A PCR de colônia detectou *B. mallei* em um cavalo do estado da Bahia, que foi positivo no ELISA, mas negativo no Western blot. Os resultados da amplificação do IS407-fliP são mostrados na Figura 1. O tamanho dos amplicons foi consistente com o esperado para *B. mallei* (528 pb).

Tabela 2 Resultados de PCR de tecidos e colônias para *Burkholderia mallei* em equídeos de diferente regiões de Brasil. * NA: Não aplicável

Estado	Espécie	Amostra	Lesões macroscópicas	PCR de colônia	PCR de tecido		
Rio Grande do Sul	Equine	Swab nasal	Pequeno foco pneumônico	Positivo	NA		
		Pulmão	Nódulos	Negativo	Negativo		
		Baço	Nódulos	Negativo	Negativo		
		Fígado	Nódulos	Negativo	Negativo		
		Linfonodo mesentérico	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo retrofaríngeo	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo cervical profundo	Linfonodos aumentados	Negativo	Negativo		
		Lobo pulmonar acessório	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo mandibular	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo mediastínico	Linfonodos aumentados	Negativo	Negativo		
		Linfonodo pulmonar	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo traqueobrônquico	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo mandibular	Não	Positivo	Negativo		
		Baço	Nódulos	Positivo	Negativo		
		Fígado	Nódulos	Positivo	Negativo		
		Pulmão	Nódulos	Negativo	Negativo		
		Linfonodo cervical profundo	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo mediastínico	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo parotídeo	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo retrofaríngeo	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo mesentérico	Não	Negativo	Negativo		
		Lobo pulmonar acessório	Não	Negativo	Negativo		
		Parótica	Não	Negativo	Negativo		
		Swab nasal	NA	Negativo	NA		
		Santa Catarina	Equine	Concha etmoidal	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Positivo
				Fígado	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
				Baço	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
Pulmão	Piogranuloma ou abscesso			Negativo	Negativo		
Linfonodo pulmonar	Não			Negativo	Negativo		
Pulmão	Pequeno foco pneumônico			Positivo	Negativo		
Fígado	Superfície mineralizada da lesão			Negativo	Negativo		
Rim	Não			Negativo	Negativo		
Pulmão	Nódulos			Negativo	Negativo		
Linfonodo pulmonar	Não			Negativo	Negativo		
Baço	Nódulos			Negativo	Negativo		
Fígado	Nódulos			Negativo	Negativo		
São Paulo	Equine	Traquéia	Traqueíte purulenta	Negativo	Positivo		
		Swab traqueal	NA	Positivo	NA		
		Linfonodo cervical profundo	Não	Negativo	Negativo		
		Linfonodo mesentérico	Não	Negativo	Negativo		
		Pulmão	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Positivo		
		Linfonodo esplênico	Não	Negativo	Negativo		
		Baço	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo		
		Coração	Não	Negativo	Negativo		
		Fígado	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Positivo		
		Linfonodo renal	Não	Negativo	Positivo		
		Rim	Não	Negativo	Negativo		

Tabela 2 (continuação)

Estado	Espécie	Amostra	Lesões macroscópicas	PCR de colônia	PCR de tecido
Bahia	Equine	Baço	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
		Pulmão	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
		Fígado	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo
		Fígado	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
		Baço	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
		Pulmão	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo
		Linfonodo traqueobrônquico	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
		Pulmão	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo
		Fígado	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo
		Fígado	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
		Baço	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo
		Pulmão	Múltiplos focos hemorrágicos	Negativo	Negativo
		Swab nasal	NA	Positivo	NA
		Swab de palato	NA	Positivo	NA
		Linfonodo mandibular	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
		Pulmão	Pneumonia focal	Positivo	Negativo
		Linfonodo pulmonar	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo
		Baço	Petéquiias	Negativo	Negativo
		Fígado	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo
		Piauí	Equine	Pool de linfonodos pulmonar e mediastínico	Não
Swab nasal	NA			Positivo	NA
Swab traqueal	NA			Negativo	NA
Sergipe	Mule	Fígado	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
		Pulmão	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo
		Fluido hepático	NA	Negativo	Negativo
		Linfonodo mesentérico	Linfonodos aumentados	Negativo	Positivo
		Fluido pulmonar	NA	Negativo	Negativo
Maranhão	Equine	Linfonodo pulmonar	Nódulos and Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
		Linfonodo pancreático	Não	Negativo	Negativo
		Linfonodo	Não	Negativo	Negativo
		Fígado	Nódulos and Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo
		Swab traqueal	NA	Negativo	NA
		Swab nasal	NA	Negativo	NA
Tocantins	Mule	Fígado	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Negativo
		Pulmão	Não	Negativo	Negativo
Amazonas	Equine	Pulmão	Nódulos	Positivo	Negativo
		Linfonodo pré escapular	Não	Negativo	Negativo
		Fígado	Nódulos	Negativo	Negativo

Tabela 2 (continuação)

Estado	Espécie	Amostra	Lesões macroscópicas	PCR de colônia	PCR de tecido
Mato Grosso	Asinine	Linfonodo parotídeo	Nódulos	Positivo	Negativo
		Palato	Não	Positivo	Negativo
		Rim	Piogranuloma ou abscesso	Positivo	Positivo
		Pulmão	Não	Positivo	Negativo
		Linfonodo mesentérico	Não	Negativo	Negativo
		Linfonodo sublingual	Não	Negativo	Negativo
		Baço	Piogranuloma ou abscesso	Negativo	Negativo
		Adrenal	Não	Negativo	Negativo
		Linfonodo pré escapular	Nódulos	Negativo	Negativo
		Linfonodo mediastínico	Nódulos	Negativo	Negativo
		Linfonodo sub ilíaco	Não	Negativo	Negativo
		Cérebro	Não	Negativo	Negativo
		Fígado	Não	Negativo	Negativo
		Sinus nasal	Não	Negativo	Negativo
		Mato Grosso	Equine	Pulmão	Piogranuloma ou abscesso
Bexiga	Não			Positivo	Negativo
Fígado	Piogranuloma ou abscesso			Negativo	Negativo
Linfonodo mediastínico	Não			Negativo	Negativo
Rim	Não			Negativo	Negativo
Coração	Não			Negativo	Negativo
Linfonodo cervical superficial	Não			Negativo	Negativo
Baço	Não			Negativo	Negativo

Após análise dos amplicons sequenciados, foram obtidas as sequências de consenso. Após uma busca de homologia, comparando as sequências obtidas com o banco de dados do NCBI utilizando o programa BLASTn, foram obtidos os melhores acertos de cada análise, bem como os parâmetros de qualidade da análise, que são apresentados na Tabela 3.

Discussão

O mormo é uma importante doença infecciosa que causa sérios danos à cadeia produtiva equina em países onde ocorre de forma endêmica. O controle desta doença requer conhecimento de aspectos epidemiológicos, dentre eles, a determinação de sua diversidade genética e suas implicações no processo de transmissão. Esta informação depende fundamentalmente do isolamento do seu agente etiológico nos tecidos dos cavalos infectados. Este trabalho demonstrou a presença de *B. mallei* em equídeos com sorologia positiva para mormo, através de PCR diretamente de tecidos ou de cultura microbiológica, nas cinco regiões do Brasil.

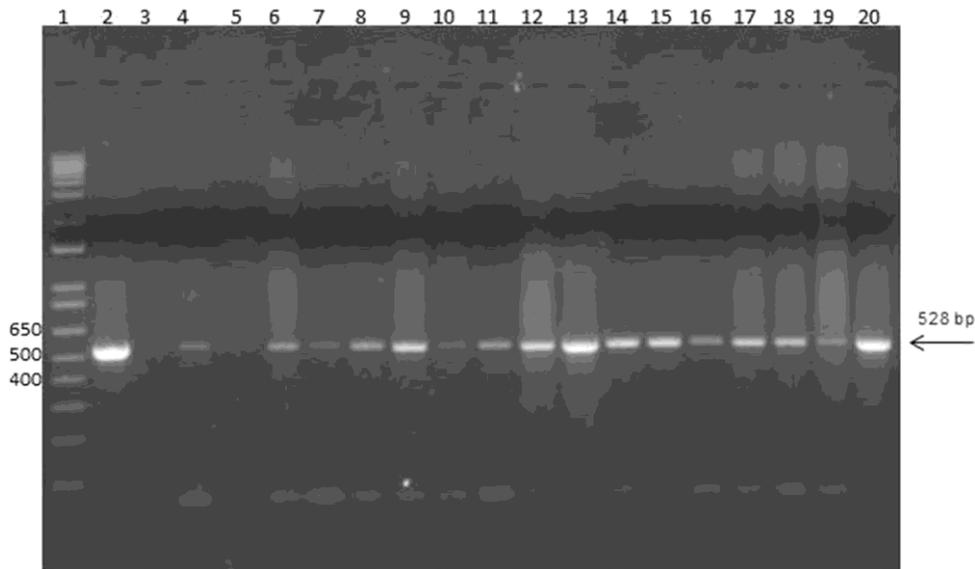


Figura 1 Amplificação por PCR visando IS407-flIP para isolados de *Burkholderia mallei* do Brasil. Todas as reações mostradas na figura são PCRs de culturas microbiológicas. Apenas uma amostra positiva por animal foi incluída. Flecha: 528 pb. Poço 1: 1 kb plus (Thermo Fisher, EUA); poço 2: controle positivo: DNA de *B. mallei* (São Paulo) cepa 86/19; poço 3: controle negativo; poço 4: Santa Catarina, equino, macho, baço; poço 5: Santa Catarina, equino, fêmea, pulmão; faixa 6: Bahia, equino, macho, baço; poço 7: Bahia, equino, macho, pulmão; faixa 8: Bahia, equino, fêmea, linfonodo traqueobrônquico; poço 9: Bahia, equino, fêmea, fígado; poço 10: Bahia, equino, fêmea, swab de palato; poço 11: Rio Grande do Sul, equino, fêmea, swab nasal; poço 12: Rio Grande do Sul, equino, macho, linfonodo mandibular; poço 13: Rio Grande do Sul, equino, macho, abscesso/piogranuloma da concha etmoidal; poço 14: Tocantins, mula, fêmea, fígado; faixa 15: Mato Grosso, asinino, feminino, rim; poço 16: Mato Grosso, equino, fêmea; bexiga; poço 17: Amazonas, equino, fêmea, pulmão; poço 18: Piauí, equino, fêmea, pool de linfonodos; poço 19: Sergipe, mula, fêmea, fígado; poço 20: Maranhão, equino, fêmea, linfonodo pulmonar.

A cultura de tecidos macerados resulta frequentemente no crescimento acelerado de microrganismos contaminantes, mesmo na presença de *B. mallei*. Assim, preferencialmente, foram colhidas apenas colônias isoladas, redondas, puntiformes, acinzentadas, com halo translúcido e brilhante e não hemolíticas [19].

Uma segunda etapa de seleção foi implementada com base nas características tintoriais, culturais e bioquímicas. No Brasil, estudos anteriores mostraram pequenas variações no perfil de fermentação de alguns carboidratos, como galactose, glicose, sacarose, maltose e manitol, em cepas de *B. mallei* da região Nordeste do Brasil, mas essas variações não interferiram com identificação bacteriana [30].

A detecção molecular de *B. mallei* na maioria dos animais incluídos no estudo indicaria boa especificidade dos testes sorológicos utilizados no programa oficial de controle do mormo no Brasil. O único animal negativo na detecção molecular apresentava lesões nodulares sugestivas de mormo no pulmão, baço e fígado, sugerindo provável baixa carga bacteriana nas lesões, dificultando a detecção direta por PCR e cultura microbiológica.

Neste estudo, houve maior sucesso na detecção de *B. mallei* a partir de cultura microbiológica do que na PCR diretamente no tecido. Esse fato provavelmente se deve à baixa concentração relativa do DNA do patógeno em relação ao material genético do hospedeiro, além de possíveis inibidores de PCR presentes nos tecidos. Em três cavalos (Rio Grande do Sul, Piauí e Bahia), sem manifestações clínicas, nos quais foram coletadas amostras de swab nasal, houve detecção genotípica a partir da cultura microbiológica, sugerindo eliminação respiratória de *B. mallei*. Em um cavalo, *B. mallei* foi detectada a partir da cultura bacteriana de um esfregaço de palato, o que pode implicar na eliminação ambiental da bactéria.

Tabela 3 Resultados de homologia pesquisas em BLASTn (NCBI) para sequenciamento de IS407- *fliP* PCR amplicons de *Burkholderia mallei* de tecidos e/ou esfregaços de equídeos de diferentes regiões geográficas do Brasil

Isolate	Best hit	Id NCBI	Score	E-value	Identity	Gaps
Bahia, equino, macho, baço	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	952	0.0	515/515 (100%)	0/515 (0%)
Bahia, equino, macho, pulmão	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	952	0.0	518/519 (99%)	1/519 (0%)
Bahia, equino, macho, fígado	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	970	0.0	524/524 (100%)	0/524 (0%)
Bahia, equino, macho, baço	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	968	0.0	524/524 (100%)	0/524 (0%)
Bahia, equino, fêmea, linfonodo traqueobrônquico	<i>Burkholderia mallei</i> strain 2002734306 chromosome II, complete sequence	CP009708.1	518	4.00E-142	383/433 (88%)	6/433 (1%)
Bahia, equino, fêmea, fígado	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	966	0.0	523/523 (100%)	0/523 (0%)
Bahia, equino, fêmea, swab nasal	<i>Burkholderia mallei</i> <i>fliP</i> pseudogene, partial sequence; and IS407A transposase (<i>tnpB</i>) gene, partial <i>cds</i>	MK440295.1	913	0.0	494/494 (100%)	0/494 (0%)
Bahia, equino, fêmea, swab de palato	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	963	0.0	521/521 (100%)	0/521 (0%)
Segipe, muar, fêmea, fígado	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	970	0.0	525/525 (100%)	0/525 (0%)
Piauí, equino, fêmea, swab nasal	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	946	0.0	512/512 (100%)	0/512 (0%)
Piauí, equino, fêmea, pool de linfonodos pulmonar e mediastínicos	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey 10 clone 1-6.6 <i>fliP</i> mobile element, partial sequence	MK947141.1	785	0.0	425/425 (100%)	0/425 (0%)
Maranhão, equino, fêmea, linfonodo pulmonar	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	966	0.0	523/523 (100%)	0/523 (0%)
Tocantins, muar, fêmea, fígado	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	968	0.0	524/524 (100%)	0/524 (0%)
Rio Grande do Sul, equino, fêmea, swab nasal	<i>Burkholderia mallei</i> <i>fliP</i> pseudogene, partial sequence; and IS407A transposase (<i>tnpB</i>) gene, partial <i>cds</i>	MK440295.1	928	0.0	502/502 (100%)	0/502 (0%)
Rio Grande do Sul, equino, macho, linfonodo mandibular	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	955	0.0	517/517 (100%)	0/517 (0%)
Rio Grande do Sul, equino, macho, baço	<i>Burkholderia mallei</i> <i>fliP</i> pseudogene, partial sequence; and IS407A transposase (<i>tnpB</i>) gene, partial <i>cds</i>	MK440295.1	719	0.0	390/391 (99%)	0/391 (0%)
Rio Grande do Sul, equino, macho, fígado	<i>Burkholderia mallei</i> <i>fliP</i> pseudogene, partial sequence; and IS407A transposase (<i>tnpB</i>) gene, partial <i>cds</i>	MK440295.1	928	0.0	502/502 (100%)	0/502 (0%)
Rio Grande do Sul, equino, macho, abscesso da concha etmoidal	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	968	0.0	524/524 (100%)	0/524 (0%)
Santa Catarina, equino, macho, fígado	<i>Burkholderia mallei</i> <i>fliP</i> pseudogene, partial sequence; and IS407A transposase (<i>tnpB</i>) gene, partial <i>cds</i>	MK440295.1	939	0.0	508/508/ (100%)	0/508 (0%)
Santa Catarina, equino, macho, baço	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey 10 clone 1-6.6 <i>fliP</i> mobile element, partial sequence	MK947141.1	678	0.0	376/380 (99%)	1/380 (0%)
Santa Catarina, equino, fêmea, pulmão	<i>Burkholderia mallei</i> <i>fliP</i> pseudogene, partial sequence; and IS407A transposase (<i>tnpB</i>) gene, partial <i>cds</i>	MK440295.1	920	0.0	498/498 (100%)	0/498 (0%)
Mato Grosso, asinino, fêmea, rim	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey 10 clone 1-6.6 <i>fliP</i> mobile element, partial sequence	MK947140.1	911	0.0	460/470 (98%)	3/470 (0%)

Table 3 (continued)

Isolate	Best hit	Id NCBI	Score	E-value	Identity	Gaps
Mato Grosso, asinino, fêmea, palato	<i>Burkholderia mallei</i> <i>fliP</i> pseudogene, partial sequence; and IS407A transposase (<i>tnpB</i>) gene, partial cds	MK440295.1	922	0.0	499/499 (100%)	0/499 (0%)
Mato grosso, asinino, fêmea, pulmão	<i>Burkholderia mallei</i> <i>fliP</i> pseudogene, partial sequence; and IS407A transposase (<i>tnpB</i>) gene, partial cds	MK440295.1	928	0.0	502/502 (100%)	0/502 (0%)
Mato Grosso, asinino, fêmea, linfonodo parotídeo	<i>Burkholderia mallei</i> <i>fliP</i> pseudogene, partial sequence; and IS407A transposase (<i>tnpB</i>) gene, partial cds	MK440295.1	929	0.0	503/503 (100%)	0/503 (0%)
Mato Grosso, equino, fêmea, bexiga	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	966	0.0	523/523 (100%)	0/523 (0%)
Mato Grosso, equino, fêmea, lobo cranial esquerdo do pulmão	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	C P010348.1	957	0.0	518/518 (100%)	0/518 (0%)
Amazonas, equino, fêmea, pulmão	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	CP010348.1	970	0.0	525/525 (100%)	0/525 (0%)
São Paulo, equino, fêmea, secreção traqueal	<i>Burkholderia mallei</i> strain Turkey10 chromosome 1, complete sequence	C P010348.1	871	0.0	490/494 (99%)	2/494 (0%)

Burkholderia mallei foi detectada por PCR em dois cavalos de uma mesma fazenda no estado da Bahia. Um dos animais, de alto valor zootécnico, foi positivo em ELISA e Western blot. O outro era um animal de trabalho e apenas positivo no teste de triagem (ELISA). Por decisão do dono do animal, ambos foram sacrificados. O cavalo positivo apenas no ELISA apresentou lesões no fígado, baço e pulmão, com detecção de *B. mallei* por PCR em culturas de pulmão e baço. Assim, este cavalo foi considerado sorologicamente falso-negativo, e as implicações epidemiológicas pertinentes devem ser consideradas [31].

O genoma de *B. mallei* é menor (5,8 Mb) que o de *B. pseudomallei* (7,2 Mb) ou *B. thailandensis* (6,7 Mb). Embora estas últimas espécies sejam habitantes ambientais do solo, estudos anteriores mostraram que *B. mallei*, um parasita obrigatório dos mamíferos, não sobrevive bem no meio ambiente [32]. A previsão das vias específicas para as capacidades metabólicas do *B. pseudomallei* em relação ao *B. mallei* sugere que as habilidades metabólicas essenciais para a sobrevivência ambiental podem ter sido perdidas no processo de redução do genoma em *B. mallei* [32]. No entanto, sob condições favoráveis, *B. mallei* provavelmente pode sobreviver alguns meses. *Burkholderia mallei* pode permanecer viável na água da torneira por pelo menos um mês [19].

A detecção de *B. mallei* em sítios anatômicos que permitem sua eliminação no ambiente sugere que equídeos cronicamente infectados podem potencialmente espalhar a infecção, especialmente se houver condições de umidade suficientes para a sobrevivência desta bactéria.

O isolamento de *B. mallei* de amostras clínicas apresenta um desafio devido à alta ocorrência de outras bactérias [26]. Além disso, devido ao baixo número de bactérias nos tecidos infectados, a

cultura em meios sólidos ou líquidos costuma ser negativa, principalmente se as amostras vierem de casos subclínicos ou crônicos [12]. Em cavalos naturalmente infectados do Brasil, mantidos em quarentena, com infecções crônicas e sem sinais clínicos de mormo, 4 de 160 amostras clínicas (1,8%) foram positivas para *B. mallei* [12]. Porém, na fase aguda da infecção, a detecção de *B. mallei* em amostras clínicas é mais frequente. Em estudo com equídeos dos estados de Pernambuco e Alagoas, Nordeste do Brasil, o isolamento microbiológico e a detecção molecular de *B. mallei* foram obtidos a partir de amostras de nódulos cutâneos fechados de oito animais diferentes, com quadro clínico agudo de mormo e sorologicamente positivos para o teste de fixação de complemento. Os animais eram usados para puxar carroças de cana-de-açúcar ou transportar material de construção [30].

Os isolados resultantes deste estudo serão caracterizados por espectrometria de massas e posteriormente será realizado sequenciamento genômico. Tais estratégias são relevantes para a compreensão da diversidade genética de *B. mallei* em diferentes regiões do Brasil. Permitirão também a realização de estudos visando a determinação da virulência desses isolados, bem como a análise da resposta imune celular e humoral em modelos experimentais de inoculação.

Em resumo, foi possível detectar genotipicamente *B. mallei* em cavalos de todas as regiões brasileiras com sorologia positiva para o agente, mesmo sem doença clínica. *Burkholderia mallei* também foi detectada em esfregaços nasais de três cavalos e no palato de um asinino, sugerindo eliminação ambiental do agente.

Agradecimentos Às Superintendências do Ministério da Agricultura e aos Inspectores e Auditores dos Serviços Veterinários Oficiais dos Estados do Rio Grande do Sul (DSA), Santa Catarina (CIDASC), Mato Grosso (INDEA), Bahia (ADAB), Piauí (ADAPI), Sergipe (Emdagro), Maranhão (AGED), Tocantins (ADAPEC) e Amazonas (ADAF). O excelente trabalho realizado nas avaliações clínicas e necropsias dos equídeos permitiu a execução deste artigo. À coordenação do Programa Nacional de Saúde Equina/MAPA. À agência brasileira de pesquisa, CNPq.

Contribuição do autor Flávio R. Araújo, Lenita R. Santos e Emanuelle B. Gaspar projetaram os experimentos.

Paula A. Pereira Suniga, Cynthia Mantovani, Maria G. Santos e Juliana S. Gomes Rieger realizaram os experimentos – culturas de *B. mallei* de tecidos e swabs de cavalos eutanasiados soropositivos para mormo, extração de DNA de colônias e tecidos, PCR e sequenciamento.

Paula A. Pereira Suniga, Cynthia Mantovani, Andréa A. Egito e Flávio R. Araújo analisaram os dados genômicos.

Paula A. Pereira Suniga, Cynthia Mantovani, Maria G. Santos, Juliana S. Gomes Rieger, Andréa A. Egito, Flávio R. Araújo, Lenita R. Santos e Emanuelle B. Gaspar escreveram o manuscrito.

Fernando L. dos Santos realizou a análise dos achados da necropsia.

Rinaldo A. Mota e Karla P. Chaves – supervisão e treinamento em cultura microbiológica para *B. mallei*.

José Carlos de Oliveira Filho e Alessandra F. Castro Nassar – necropsia de cavalos soropositivos.

Todos os autores leram e aprovaram o manuscrito.

Financiamento Este estudo foi financiado pelo Departamento de Defesa Agropecuária (SDA)/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (bolsa 20.21.10.006.00.00), CNPq (bolsa 315857/2021– 8 e 403651/2020–4). CNPq (código 403651/2020-5, cooperação UFMS-EMBRAPA 25/2022).

Disponibilidade de dados Os conjuntos de dados utilizados e/ou analisados durante o presente estudo estão disponíveis no autor correspondente mediante solicitação razoável.

Declarações Conflito de interesses Os autores declaram não haver interesses concorrentes.

Referências

1. Acharya KP, Marahatta S, Wilson RT (2021) First outbreak of glanders in Nepal and possible implications for the animal sector. *Transbound Emerg Dis* 68:3015–3017. <https://doi.org/10.1111/tbed.14338>
2. He G, Zeng Y, He Q, Liu T, Li N, Lin H, Zeng M, Li Y, Peng M, Cheng J, Liu W, Yao W (2023) A case report of *Burkholderia mallei* infection leading to pneumonia. *Comb Chem High Throughput Screen* 26(1):241–245. <https://doi.org/10.2174/1386207325666220509152221>

3. Bossi P, Tegnell A, Baka A, van Loock F, Hendriks J, Werner A, Maidhof H, Gouvras G (2004) Bichat guidelines for the clinical management of glanders and melioidosis and bioterrorism-related glanders and melioidosis. *Euro Surveill* 9(12):35–36. <https://doi.org/10.2807/esm.09.12.00507-en>
4. Van Zandt KE, Greer MT, Gelhaus HC (2013) Glanders: an over-view of infection in humans. *Orphanet J Rare Dis* 8:1–7. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-8-131>
5. Pimentel W (1938) História e organização do serviço veterinário do exército. *Revista Militar de Medicina Veterinária* 1:283–322
6. Mota RA, Brito MF, Castro FJC, Massa M (2000) Glanders in horses and mules of the states of Pernambuco and Alagoas, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 20:155–159. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2000000400005>
7. MAPA (1934) Decreto nº 24.548 de 3 de julho de 1934. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/d24548.htm Accessed 22 Nov 2022
8. MAPA (2018) Portaria SDA nº 35 de 17 de abril de 2018. https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/lfda/legislacoes-da-rede-lfda/copy_of_diagnostico-animal%20arquivos/copy_of_Portaria35de17.04.2018Testeslaboratparamormo.pdf/view. Accessed 22 Nov 2022
9. OIE (2018) Chapter 12.10. Infection with *Burkholderia mallei* (Glanders). OIE Terrestrial Animal Health. https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online%20access/?id=169&L=1&htmlfile=chapitre_glanders.html. Accessed 22 Nov 2022
10. Resende CF, Dos Santos AM, Filho PMS, De Souza PG, De Azevedo Issa M, De Carvalho Filho MB et al (2022) Glanders and brucellosis in equids from the Amazon region, Brazil. *Acta Tropica* 231:106429. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106429>
11. Fonseca-Rodríguez O, Pinheiro Júnior JW, Mota RA (2019) Spatiotemporal analysis of glanders in Brazil. *J Equine Vet* 78:14–19. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.03.216>
12. Abreu DC, Gomes AS, Tessler DK, Chiebao DP, DelFava C, Romaldini AHCN et al (2020) Systematic monitoring of glanders-infected horses by complement fixation test, bacterial isolation, and PCR. *Vet Anim Sci* 10:100–147. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2020.100147>
13. Falcão MVD, Da Silveira PPM, De Assis Santana VL, Da Rocha LO, Chaves KP, Mota RA (2019) First record of *Burkholderia mallei* Turkey 10 strain originating from glanderous horses from Brazil. *Braz J Microbiol* 50:1125–1127. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00113-2>
14. Falcão MVD, Laroucau K, Vorimore F, Deshayes T, De Assis Santana VL, Silva KPC et al (2022) Molecular characterization of *Burkholderia mallei* strains isolated from horses in Brazil (2014–2017). *Infect Genet Evol* 99:105250. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2022.105250>
15. Girault G, Woudstra C, Martin B, Vorimore F, De Assis Santana VL, Fach P et al (2017) First draft genome for a *Burkholderia mallei* isolate originating from a glanderous mule from Brazil. *Genome Announc* 5:e00579–e617. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00579-17>
16. Laroucau K, De Assis Santana VL, Girault G, Martin B, Da Silveira PPM, Machado MB et al (2018) First molecular characterization of a Brazilian *Burkholderia mallei* strain isolated from a mule in 2016. *Infect Genet Evol* 57:117–120. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.11.014>
17. Mota RA, Da Fonseca Oliveira AA, Pinheiro Junior JW, Da Silva LBG, De Farias BM, Rabelo SSA (2010) Glanders in donkeys (*Equus asinus*) in the state of Pernambuco, Brazil: a case report. *Braz J Microbiol* 41:146–149. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100021>
18. Rocha LO, De Lima LAR, De Albuquerque RMS, Lages SLS, Nunes ACBT, De Castro RS et al (2021) Monitoring the outbreak of equine glanders in Alagoas, Brazil: clinical, immunological, molecular, and anatomopathological findings. *Ciência Rural* [online] 51:e20200834. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200834>
19. OIE (2018) Chapter 3.6.11 Glanders and melioidosis. Manual of diagnostic tests and vaccines. https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.11_GLANDERS.pdf. Accessed 22 Nov 2022

20. Appelt S, Rohleder AM, Jacob D, von Buttlar H, Georgi E, Muel-ler K et al (2022) Genetic diversity and spatial distribution of *Burkholderia mallei* by core genome-based multilocus sequence typing analysis. PLoS One 17(7):e0270499. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0270499>
21. Brangsch H, Saqib M, Sial AUR, Melzer F, Linde J, Elschner MC (2022) Sequencing-based genotyping of Pakistani *Burkholderia mallei* strains: a useful way for investigating glanders outbreaks. Pathogens 11:614. <https://doi.org/10.3390/pathogens11060614>
22. Scholz HC, Pearson T, Hornstra H, Projahn M, Terzioglu R, Wer-nery R et al (2014) Genotyping of *Burkholderia mallei* from an outbreak of glanders in Bahrain suggests multiple introduction events. PLoS Negl Trop Dis 8:e3195. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003195>
23. Losada L, Ronning CM, DeShazer D, Woods D, Fedorova N, Stanley Kim H et al (2010) Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements. Genome Biol Evol 2:102–116. <https://doi.org/10.1093/gbe/evq003>
24. Song H, Hwang J, Yi H, Ulrich RL, Yu Y, Nierman WC, Kim HS (2010) The early stage of bacterial genome-reductive evolution in the host. PLoS Pathogens 6(5):e1000922. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000922>
25. Laroucau K, Aaziz R, Vorimore F, Varghese K, Deshayes T, Bertin C et al (2021) A genetic variant of *Burkholderia mallei* detected in Kuwait: consequences for the PCR diagnosis of glanders. Transbound Emerg Dis 68(2):960–963. <https://doi.org/10.1111/tbed.13777>
26. Kinoshita Y, Cloutier AK, Rozak DA, Khan MS, Niwa H, Uchida- Fujii E et al (2019) A novel selective medium for the isolation of *Burkholderia mallei* from equine specimens. BMC Vet Res 15(1):1–7. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1874-0>
27. Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B et al (1993) Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 31:406–409. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.2.406-409.1993>
28. Werle E, Schneider C, Renner M, Völker M, Fiehn W (1994) Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. Nucleic Acids Res 22(20):4354. <https://doi.org/10.1093/nar/22.20.4354>
29. Sanger F (1988) Sequences, sequences, and sequences. Annu Rev Biochem 57:1–29. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.57.070188.000245>
30. Silva KP, Mota RA, Cunha AP, Silva LB, Leal NC, Cavalcante YV et al (2009) Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. Pesquisa Veterinária Brasileira 29:439–444. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2009000500015>
31. Khan I, Wieler LH, Melzer F, Elschner MC, Muhammad G, Ali S et al (2013) Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. Transbound Emerg Dis 60(3):204–221. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01342.x>
32. Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettelin H, Nelson KE, Feld-blyum T et al (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. Proc Natl Acad Sci 101(39):14246–14251. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403306101>

5. ARTIGO CIENTÍFICO: Diagnóstico de mormo em uma égua assintomática do Brasil: insights de sorologia, cultura microbiológica, espectrometria de massa e sequenciamento do genoma



Artigo

Diagnóstico de mormo em uma égua assintomática do Brasil: insights de sorologia, cultura microbiológica, espectrometria de massa e sequenciamento do genoma

Paula Adas Pereira Suniga ^{1,2}, Cynthia Mantovani ³, Maria Goretti dos Santos ⁴, Andréa Alves do Egito ^{1,4}, Newton Valério Verbisck ⁴, Lenita Ramires dos Santos ^{4,*}, Alberto Martín Rivera Dávila ⁵, Cristina Kraemer Zimpel ⁶, Maria Carolina Sisco Zerpa ⁷, Daniela Pontes Chiebao ⁸, Ana Márcia de Sá Guimarães ⁷, Alessandra Figueiredo de Castro Nassar ⁸ and Flávio Ribeiro de Araújo ⁴

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-FAMEZ/UFMS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Senador Filinto Muller, 2443, Campo Grande 79074-460, MS, Brasil; paula_adas@hotmail.com (P.A.P.S.); andrea.egito@embrapa.br (A.A.d.E.)

² Bolsista MAI/DAI, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Cidade Universitária, Av. Costa E Silva, Campo Grande 79070-900, MS, Brasil

³ Bolsa Embrapa Gado de Corte/Ministério da Agricultura e Pecuária, Embrapa Gado de Corte, Av. Rádio Maia, 830, Campo Grande 79106-550, MS, Brasil; cymant@hotmail.com

⁴ Embrapa Gado de Corte, Campo Grande 79106-550, MS, Brasil; goretti.santos@embrapa.br (M.G.d.S.); newton.verbisck@embrapa.br (N.V.V.); flavio.araujo@embrapa.br (F.R.d.A.)

⁵ Laboratório de Biologia Computacional e de Sistemas, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, RJ, Brasil; amrdavila@gmail.com

⁶ Departamento de Microbiologia e Genética Molecular, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, EUA; kraeme19@msu.edu

⁷ Laboratório de Pesquisa Aplicada em Micobactérias, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-000, SP, Brasil; carolsisco@gmail.com (MCSZ); anamarcia@usp.br (A.M.d.S.G.)

⁸ Centro de Pesquisa em Saúde Animal, Instituto Biológico, Av. Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, São Paulo 04014-002, SP, Brasil; daniela.chiebao@sp.gov.br (DPC); afcnassar@sp.gov.br (A.F.d.C.N.)

* Correspondência: lenita.santos@embrapa.br

Resumo: Este manuscrito elucidou a ocorrência de mormo em uma égua assintomática do Brasil apresentando títulos positivos de anticorpos contra *Burkholderia mallei*. O diagnóstico foi estabelecido através de uma abordagem multifacetada que abrange cultura microbiológica, espectrometria de massa e sequenciamento do genoma. O surto ocorreu em 2019 em Tatuí, São Paulo, Brasil, e a égua infectada, apesar de não apresentar sintomas clínicos, apresentava múltiplas lesões miliares no fígado, além de intensa secreção catarral na traqueia. Amostras foram coletadas de vários órgãos e submetidas a isolamento bacteriano, detecção molecular e identificação. A cepa foi identificada como *B. mallei* por PCR e confirmada por espectrometria de massa MALDI-TOF. O sequenciamento do genoma completo revelou um tamanho de genoma de 5,51 Mb com um conteúdo de GC de 65,8%, 5.871 genes (incluindo 4 genes de rRNA e 53 genes de tRNA) e 5.583 sequências codificantes de DNA

(CDSs). Além disso, foram detectados 227 pseudogenes previstos. A análise *in silico* de diferentes loci genômicos que permitem a diferenciação com *Burkholderia pseudomallei* confirmou a identidade do isolado como *B. mallei*, além do tamanho característico do genoma. A cepa BAC 86/19 foi identificada como linhagem 3, sub-linhagem 2, que inclui outras cepas do Brasil, Índia e Irã. O sequenciamento do genoma desta estirpe fornece informações valiosas que podem ser utilizadas para melhor compreender o agente patogênico e a sua epidemiologia, bem como para desenvolver ferramentas de diagnóstico para o mormo.

Palavras-chave: *Burkholderia mallei*; genoma; mormo

Introdução

Burkholderia mallei é uma bactéria Gram-negativa que causa mormo, uma doença contagiosa e potencialmente fatal em equídeos como cavalos, mulas e burros [1]. Também pode infectar outras espécies animais, incluindo humanos [2], particularmente aquelas que estão em contacto próximo com equídeos infectados. Além de sua patogenicidade em animais, *B. mallei* também é uma preocupação significativa para a saúde pública devido ao seu potencial como agente de bioterrorismo [3]. O CDC listou a bactéria como um agente de bioterrorismo de categoria B, indicando seu potencial para um impacto significativo na saúde pública [4].

A Organização Mundial de Saúde Animal (WOAH) reconhece quatro apresentações clínicas do mormo, incluindo formas nasais, pulmonares, cutâneas e portadoras assintomáticas. A forma nasal é caracterizada pelo desenvolvimento de nódulos inflamatórios e úlceras nas fossas nasais, levando a uma secreção amarela pegajosa e cicatrizes estreladas durante o processo de cicatrização. A forma pulmonar resulta em abscessos nodulares nos pulmões, fraqueza progressiva, tosse e diarreia, enquanto a forma cutânea (também conhecida como “farcy”) causa aumento dos vasos linfáticos e abscessos nodulares ao longo de seu curso, que podem ulcerar e produzir pus amarelo. Nódulos no fígado e baço podem levar ao desgaste e eventual morte [5].

No Brasil, de 1999 a 2022, foram notificados 3.385 casos de mormo. Destes, 715 casos ocorreram nos últimos 3 anos, segundo relatórios do Ministério da Agricultura e Pecuária do Brasil [<https://indicadores.agricultura.gov.br/saudeanimal> (acessado em 5 de outubro de 2023)]. Isto pode ser parcialmente atribuído ao uso de métodos diagnósticos mais sensíveis e específicos para o diagnóstico do mormo em comparação com o teste de fixação do complemento [6].

No Brasil, equídeos que trabalham em canaviais na zona florestal do Nordeste são mais frequentemente relatados como apresentando casos sintomáticos de mormo [7–9]. Por outro lado, relatos de mormo em outras regiões geralmente descrevem animais assintomáticos ou com alterações clínicas leves [10,11]. No entanto, não houve nenhum estudo sistemático para avaliar a abrangência dos exames clínicos e físicos que levaram à determinação do estado assintomático destes animais.

Os testes de diagnóstico do mormo em todo o mundo dependem fortemente da sorologia. No

Brasil, a regulamentação anterior (Instrução Normativa nº 6 de 2018) determinava a eutanásia para equídeos soropositivos. No entanto, confiar apenas na serologia como critério de diagnóstico, especialmente em cavalos assintomáticos, tem causado desconfiança no sector equino. Consequentemente, surgiram judicializações quando os proprietários de cavalos se opuseram à eutanásia obrigatória.

Recentemente, a legislação no Brasil mudou (Portaria MAPA nº 593, 2023) e os casos suspeitos de mormo são identificados como equinos suscetíveis e que apresentam sinais clínicos ou patológicos compatíveis com mormo ou quando há ligação epidemiológica com surto confirmado ou caso. A confirmação de casos envolve o isolamento e identificação de *B. mallei* em uma amostra de um equino ou a detecção de antígenos específicos, material genético ou anticorpos relacionados a *B. mallei* em uma amostra de um equino apresentando sinais clínicos ou patológicos compatíveis com mormo.

Há uma necessidade crescente de isolar e caracterizar cepas brasileiras de *B. mallei* para melhor compreender seus aspectos de transmissão e virulência [10–12]. Este artigo tem como objetivo ilustrar a detecção de *B. mallei* em uma égua soropositiva que não apresentou sintomas, empregando uma abordagem abrangente que integra cultura microbiológica, espectrometria de massa e sequenciamento do genoma.

Materiais e métodos

Caso Clínico

Em 2019, um surto de mormo em cavalos foi identificado na cidade de Tatuí, São Paulo, Brasil, pelos serviços estaduais de defesa agropecuária. Durante o surto, uma égua jovem apresentou resultado positivo tanto no teste de triagem de fixação de complemento (FC) (procedimento a frio) quanto no Western blot (WB), realizados em laboratório oficial do Programa Brasileiro de Saúde Equina. No Brasil, o teste de FC utiliza antígenos do USDA, EUA, mas passa por um processo interno de padronização, resultando em precisão variável do teste. Por outro lado, o teste WB (Biovotech, Recife, Brasil) apresenta sensibilidade e especificidade diagnóstica de 100%. Apesar de apresentar escore de condição corporal saudável e não apresentar sintomas clínicos, a égua apresentou múltiplas lesões miliares no fígado e intensa secreção catarral na traquéia (ver Figura 1) durante a necropsia. Além disso, os linfonodos mediastinais estavam aumentados e o baço estava hipoplásico. Amostras de secreção e/ou tecido foram coletadas de vários órgãos, incluindo pulmões, traquéia, gânglios linfáticos, coração, baço, rim e fígado.

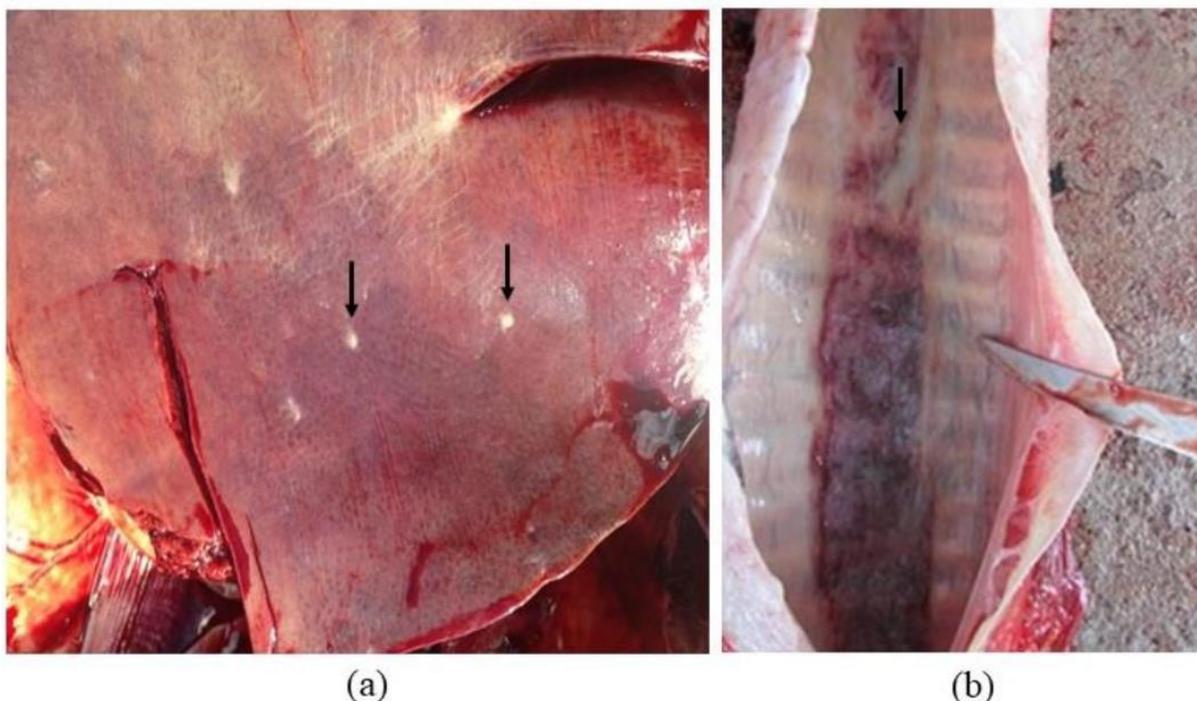


Figura 1. Achados de necropsia (setas) de égua sem sinais clínicos. (a) Múltiplas lesões miliares no fígado. (b) Descarga catarral intensa na traqueia.

Isolamento Bacteriano e Detecção Molecular

Todas as amostras de tecido foram suspensas em solução salina estéril a 0,85% na concentração de 1:5 p/v, e 10 μ L da suspensão foram plaqueados em ágar sangue de ovelha a 5% suplementado com glicerina a 1% e 2.500 UI de benzilpenicilina potássica. As placas foram então incubadas a 37°C por 48-72 horas [10,13,14]. As colônias bacterianas resultantes foram examinadas quanto às suas características morfológicas, incluindo tamanho, forma, cor e presença e tipo de hemólise. Após coloração de Gram, as colônias foram examinadas posteriormente quanto à sua distribuição celular e características de coloração. Testes bioquímicos, incluindo catalase, oxidase, indol, redução de nitrato, teste de Voges-Proskauer, motilidade e fermentação de açúcares, também foram realizados conforme descrito por Quinn et al. (2011) [13] e Winn et al. (2008) [14]. Para confirmar a presença de *B. mallei*, as colônias foram ressuspensas em solução salina 0,85%, inativadas a 100 °C por 10 min e armazenadas a -20 °C para análise molecular. A PCR foi realizada visando o fliP-IS407 utilizando primers descritos por Abreu et al. (2020) [10], que produziu um fragmento de 528 pb (fliP-IS407 F: 5' TCAGGTTTGTATGTCGCTCGG 3' e fliP-IS407 R: 5' GCCCGACGAGCACCTGATT 3'. Uma cepa de referência de *B. mallei* INCQS 00.115 (ATCC 15310) da Coleção de Referência Microrganismos da Vigilância Sanitária, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, Brasil, foi utilizado como controle positivo, e água deionizada estéril foi utilizada como controle negativo.

Espectrometria de Massa MALDI-TOF

Amostras bacterianas foram inativadas com etanol e os perfis proteicos foram adquiridos e analisados pelo MALDI Biotyper™ (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), conforme descrito [15,16]. Resumidamente, as colônias isoladas foram colhidas e lavadas duas vezes com água estéril centrifugada durante 1 min a 10.000 g à temperatura ambiente. O sedimento celular foi suspenso em 300 µL de água estéril e inativado pela adição de 900 µL de etanol absoluto. Após centrifugação a 10.000 g à temperatura ambiente durante 2 min, as proteínas bacterianas foram extraídas com ácido fórmico a 70% e acetonitrila pura. O sobrenadante contendo proteínas foi coletado após centrifugação a 10.000 g à temperatura ambiente por 2 min, e 1 µL foi colocado em um alvo MALDI de aço inoxidável limpo (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) em triplicata. Após a secagem ao ar, as proteínas bacterianas foram cobertas com 1 µL de solução de matriz de ácido a-ciano-4-hidroxicinâmico (5 mg/mL) e deixadas secar ao ar. Os espectros de massa foram adquiridos com um Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) em uma faixa de massa para carga (m/z) de 2.000 a 20.000 Daltons após calibração com um padrão de *E. coli* (IVD BTS, Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), conforme descrito [17]. Para identificação bacteriana, os espectros de massa foram processados com MALDI Biotyper™v.3.1 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA) usando o método padrão e critérios de identificação com MBT Compass Library DB-7311 v.7.0.0.0 (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA), contendo 7.311 perfis de espectro de massa (MSPs) para 434 gêneros e 2.509 espécies de microrganismos. Como a biblioteca DB-7311 de Bruker não possui MSPs de *B. mallei* e *B. pseudomallei*, incluímos espectros de massa de referência para essas espécies usando espectros de massa de *B. mallei* ATCC 23344 e *B. pseudomallei* do Robert Koch Institut (RKI), Berlim, Alemanha, disponíveis em Zenodo [18] e MSPs para *B. mallei* ATCC 15310 e sete outros isolados clínicos de *B. mallei* e *B. pseudomallei* previamente caracterizados por nosso grupo [19]. O MSP de *B. mallei* para o isolado clínico BAC 86/19 descrito neste trabalho foi gerado com o método padrão MALDI Biotyper™ após processamento de 30 espectros de massa usando sinais de 70 m/z com frequência superior a 50%.

Sequenciamento do genoma completo

A análise da Sequência Completa do Genoma (WGS) para BAC 86/19 foi realizada na plataforma multiusuário NGS da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), localizada no Rio de Janeiro, Brasil. Primeiro, a quantificação do DNA foi realizada utilizando o kit Qubit™ dsDNA HS Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e o kit Agilent High Sensitivity DNA (Agilent, Santa Clara, CA, EUA). O procedimento WGS foi realizado em um equipamento HiSeq (Illumina, San Diego, CA, EUA) usando a química HiSeq Rapid SBS Kit v2 (200 ciclos) e o kit de preparação Nextera

DNA Flex Library (Illumina, San Diego, CA, EUA) seguindo as orientações do fabricante. As leituras resultantes foram depositadas no SRA (Sequence Read Archive), NCBI (National Center for Biotechnology Information) sob o número de acesso SRR19621772.

Avaliação de qualidade, montagem e anotação

As leituras foram avaliadas usando FastQC [20] antes e depois do corte. O corte de qualidade foi realizado usando Trimmomatic v. 0.39 (janela deslizante: 5:20) [21]. Leituras com qualidade foram montadas usando o montador de genoma SPAdes v3.15.4 com parâmetros padrão [22]. Os contigs resultantes foram organizados em scaffolds utilizando RagTag [23] usando o genoma de referência de *B. mallei* ATCC 23344 (números de acesso: CP000010.1 e CP000011.2). O genoma montado foi depositado no NCBI e anotado com PGAP (Prokaryotic Genome Annotation Pipeline) (número de acesso: JANCTE01).

Marcadores Genéticos para Confirmação de Espécies

Primers e sondas utilizados em ensaios de PCR em tempo real para diferenciar entre *B. mallei* e *B. pseudomallei* foram utilizados para confirmar as espécies bacterianas do isolado. Resumidamente, sequências de primers e sondas usadas para detectar genes orf11 e orf13 (iniciadores: PM122, orf11R, orf13f, orf13r; sondas: orf11pro, orf13pro) [24], bem como as regiões associadas a BMA10229_0375 [25] e mprA (iniciadores: 14F5, 14R5) [26], foram comparados contra as sequências do isolado usando a ferramenta “filter” da aba “Reads” do Run Browser do SRA das leituras do isolado depositado. Apenas correspondências exatas (ou seja, 100% de identidade) podem ser identificadas usando esta ferramenta e, quando detectadas, o número mínimo de leituras observadas com correspondências idênticas aos primers e sondas consultados foi 48. Além disso, os genes 23S rRNA e serB do isolado aqui sequenciado foi recuperado e submetido a um alinhamento global contra os genes 23S rRNA e serB do genoma de referência *B. pseudomallei* Mahidol-1106a (ASM75612v1; números de acesso: NZ_CP008781.1 e NZ_CP008782.1).

Identificação de Linhagem

A linhagem de *B. mallei* BAC 86/19 foi identificada seguindo esquema previamente relatado por Girault et al. (2018) [27]. O esquema usa 15 SNPs filogeneticamente informativos para definir 3 linhagens e 12 sublinhagens. Para isso, leituras de qualidade cortada de *B. mallei* BAC 86/19 foram mapeadas para o genoma de referência *B. mallei* ATCC 23344 usando BWA-MEM [28] com parâmetros padrão. A atribuição da variante foi realizada usando GATK versão 4.1.9.0 [29,30], selecionando uma

profundidade de qualidade de 7, valor de fita de Fisher de 60, qualidade de mapeamento de 40 e razão de probabilidade de fita de 3. As ferramentas BaseCalibrator e ApplyBQSR foram aplicadas antes da determinação final da variante e filtragem, e alelos foram anotados usando SnpEff versão 5 [31]. Todas as 15 posições genômicas [27] foram investigadas no arquivo vcf para determinar os nucleotídeos utilizados para determinar a linhagem e sublinhagem.

Resultados

Isolamento Bacteriano e Detecção Molecular

Durante a necropsia, foram coletadas um total de onze amostras. Dentre estas, uma amostra de secreção traqueal apresentou colônias sugestivas de crescimento de *B. mallei* em meio seletivo enriquecido com sangue, conforme descrito anteriormente por Abreu et al. (2020) [10]. As colônias exibiram características pequenas, cinzentas, brilhantes e não hemolíticas. Após a identificação fenotípica, o isolado foi confirmado através da PCR fliP-IS407.

Espectrometria de Massa MALDI-TOF

A cepa BAC 86/19 foi analisada por MALDI-TOF MS, e a identificação em nível de espécie foi alcançada após inclusão de seu próprio MSP na biblioteca Biotyper™ disponível localmente (Tabela Suplementar S1). Como validação de nossa análise, utilizamos MSPs de *B. mallei* e *B. pseudomallei* de referência de Zenodo.org [18] e de cepas clínicas isoladas e fornecidas pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais, Brasil, previamente caracterizadas por nosso grupo [19]. Após a inclusão do *B. mallei* BAC 86/19 MSP, os valores da pontuação Biotyper™ ficaram acima de 2,3, consistente com a identificação confiável em nível de espécie, o que foi observado em todas as amostras de cepa 86/19 testadas (Tabela Suplementar S1). Vale ressaltar que *B. pseudomallei*, que está intimamente relacionado com *B. mallei*, foi frequentemente observado como a segunda melhor combinação, com pontuações relativamente mais baixas.

O Projeto do Genoma de *B. mallei* BAC 86/19

O sequenciamento do isolado bacteriano gerou um total de 1.368.490 leituras, que totalizaram 260,6 Mpb com cobertura de aproximadamente 47x. A montagem do genoma resultou em 2.067 contigs, que foram posteriormente montados em 48 scaffolds. O N50 dos scaffolds foi encontrado em 3.324.748 pb, com lacunas estendidas em 2019 e um comprimento total sem lacunas de 5.305.955 pb. Sabe-se que a presença de sequências repetitivas no genoma de *B. mallei* resulta em um número substancial de contigs durante a montagem do genoma usando leituras curtas [32]. O tamanho

estimado do genoma foi de 5.507.851 pb. A anotação do genoma PGAP (*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*) é um processo que identifica as regiões funcionais ou de relevância biológica ao longo das sequências genômicas. Isso envolve a identificação de genes que codificam proteínas, genes de RNA, promotores, sítios de ligação ribossomal (RBS), entre outros elementos¹². revelou um conteúdo de GC de 65,8%, 5.871 genes (incluindo 4 genes de rRNA e 53 genes de tRNA) e 5.583 sequências codificantes de DNA (CDSs). Além disso, o PGAP previu 227 pseudogenes.

Confirmação de espécies usando marcadores genéticos

O genoma foi inicialmente analisado usando o software Kaiju v.1.9.0 [33], mostrando que mais de 97% dos reads eram *Burkholderia spp.*, com 12% dos reads atribuídos especificamente a *B. mallei*. As análises de Krona [34] também atribuíram mais de 99% dos reads a *Burkholderiaceae*. Portanto, o isolado estava livre dos principais contaminantes bacterianos (ou seja, espécies não-*Burkholderia*) e foi formado um tamanho de genoma estimado de 5,51 Mb, um tamanho consistente com as expectativas.

Identificação de Linhagem

De acordo com um esquema proposto anteriormente [27], *B. mallei* BAC 86/19 foi identificado como linhagem 3, sublinhagem 2 (Tabela 1).

Discussão

O mormo é uma zoonose que causa perdas econômicas significativas, principalmente quando endêmica. A caracterização das cepas circulantes nos países é uma forma importante de contribuir para o desenvolvimento de estratégias de saneamento e erradicação do patógeno. O isolamento bacteriano é um fator desafiador relatado na literatura, especialmente para animais crônicos com menores cargas de patógenos nos tecidos e maior diversidade microbiana [10,11].

Neste estudo, uma égua assintomática foi diagnosticada com mormo, inicialmente com base na sorologia utilizando FC como teste de triagem e WB como teste confirmatório. As diretrizes da Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) recomendam que o diagnóstico de mormo seja apoiado por resultados positivos de testes sorológicos. Isso normalmente envolve uma triagem inicial com FC, seguida de confirmação por meio de um segundo teste com sensibilidade e especificidade igual ou superior, como o WB de lipopolissacarídeo específico de *B. mallei* (LPS), entre outros métodos recomendados [5].

Recentemente, a legislação brasileira introduziu critérios adicionais para confirmação do mormo em animais soropositivos. Esses critérios incluem a presença de sinais clínicos ou patológicos

consistentes com mormo, detecção direta de *B. mallei* em culturas microbiológicas ou identificação de antígenos específicos ou material genético em amostras biológicas. No entanto, há evidências acumuladas que apoiam a alta especificidade dos testes sorológicos atualmente utilizados no Brasil, como ELISA e WB, conforme documentado por [11].

Tabela 1. Identificação da linhagem de *Burkholderia mallei* BAC 86/19 com base em um esquema descrito anteriormente (Girault et al., 2018 [27]).

Linhagem	Posição Genômica*	Nucleotídeo referência para determinar a linhagem**	Nucleotídeo em <i>B. mallei</i> BAC 86/19
L1	330,697	C	T
L2	2,621,027	A	G
L2B1	354,181	A	G
L2B2	1,408,904	C	T
L2B2sB1	1,853,849	T	C
L2B2sB1Gp1	1,163,826	T	C
L2B2sB1Gp2	559,637	G	A
L2B2sB2	707,292	T	C
L3	2,557,840	T	T
L3B1	309,945	T	C
L3B2***	1,767,871	A	A
L3B3	135,971	T	C
L3B3sB1	155,657	T	C
L3B3sB2	1,560,255	A	G
L3B3sB3	922,706	T	C

* Posição genômica de acordo com o genoma de referência de *B. mallei* ATCC 23344. ** Nucleotídeo que deve estar presente em uma determinada região genômica para que um isolado seja definido como a linhagem correspondente. *** *B. mallei* BAC 86/19 é identificado como linhagem 3, sublinhagem 2.

Foram escolhidas colônias bacterianas com morfologia característica: redondas, acinzentadas, não hemolíticas e isoladas. Além disso, para caracterizar as bactérias de interesse, foram utilizados testes bioquímicos. Estudos anteriores no Brasil com uma cepa do Nordeste brasileiro relataram pequenas diferenças na fermentação de alguns carboidratos, mas sem comprometer a identificação bacteriana [35].

A diferenciação de *B. mallei* de *B. pseudomallei* tem sido historicamente difícil devido à sua alta similaridade genômica [32]. Uma grande diferença fenotípica entre as duas espécies é a motilidade. Devido à inserção de um elemento IS407A no gene *fliP*, *B. mallei* perdeu sua capacidade de motilidade. Consequentemente, o gene *fliP* da cepa aqui sequenciada foi previsto pelo PGAP como um

pseudogene (locus_tag = "LV178_14020"). Os eventos genéticos que levam à pseudogenização são classificados pelo PGAP como frameshift, códon de parada interno ou incompleto. O pseudogene *flIP* é descrito como incompleto, o que concorda com uma potencial ruptura causada por uma sequência de inserção. O tamanho do genoma também pode ser usado para distinguir *B. mallei* de *B. pseudomallei*; *B. mallei* tem um tamanho de genoma menor que *B. pseudomallei* (~ 7,2 Mb) [32]. Assim, *B. mallei* BAC 86/19 apresentou um tamanho de genoma estimado de 5,51 Mb, o que está de acordo com outras cepas de *B. mallei* e menor que o de *B. pseudomallei* [32].

Muitos ensaios de PCR foram desenvolvidos para diferenciar entre *B. mallei* e *B. pseudomallei* [32]. Correspondências exatas (100% de identidade de sequência) com sequências de primer e sonda das regiões *orf13* e *BMA10229_0375* foram identificadas entre as leituras sequenciadas, enquanto correspondências exatas com as sequências de primer e sonda das regiões associadas a *orf11* e *mprA* não foram detectadas, o que também confirma a espécie isolada como *B. mallei*. Finalmente, o alinhamento da sequência global entre o rRNA 23S e os genes *serB* da cepa sequenciada com o genoma de referência de *B. pseudomallei* Mahidol-1106a também mostrou a presença de SNPs previamente identificados como específicos de *B. mallei* [36,37].

Segundo Falcão et al. (2022) [38], a linhagem L3B2 no Brasil consiste em vários isolados de *B. mallei*, incluindo 9902 RSC, BM_campo 1, BM_campo 3 e UFAL2, que foram obtidos na região Nordeste do Brasil. Laroucau et al. (2018) também confirmaram que a cepa 16-2438_BM#8, coletada na mesma região, faz parte desta linhagem. Além disso, esta linhagem abrange isolados da Índia (NCTC3708, NCTC3709) e do Irã (A200) [27].

A linhagem L3B2 no Brasil inclui isolados que causaram infecções clínicas (como UFAL 2 e 16-2438_BM#8) ou infecções assintomáticas (como BAC 86/19, 9902 RSC, BM_campo 1 e BM_campo 3) [38,39].

Devido aos desafios envolvidos no cultivo de *B. mallei*, como a necessidade de coleta e preservação de tecidos, crescimento lento em meios sem suplementação de glicerol e a necessidade de um laboratório de biossegurança, as análises bacteriológicas nem sempre são viáveis ou bem-sucedidas [39]. Para reduzir os riscos e dificuldades de lidar com patógenos de alto risco como *B. mallei*, o MALDI-TOF é uma alternativa segura e rápida para identificação precisa, devido à sua inativação com etanol, para extrair proteínas em nível de biossegurança [40].

A análise da cepa 86/19 utilizando MALDI-TOF envolveu sua caracterização em vários meios de cultura, resultando na identificação em nível de espécie. Esta etapa mitigou efetivamente um viés previamente reconhecido [41]. O processo de preparação da amostra desempenhou um papel fundamental no refinamento dos resultados espectrais. Notavelmente, a metodologia que produziu a

qualidade de espectro mais superior envolveu a utilização de etanol e ácido fórmico. Esta escolha resultou da sua maior eficiência de extração de proteínas e do seu impacto não prejudicial nas condições de armazenamento. Além disso, a incorporação de um conjunto de referência especializado, juntamente com a aquisição de espectros de alto calibre, permitiu uma diferenciação clara entre as duas espécies distintas [40].

A expansão do isolamento de *B. mallei* em diferentes regiões do Brasil [11] permitirá uma caracterização genômica abrangente, gerando conhecimento sobre diversidade genética, eventos de transmissão e marcadores genéticos para diferentes cepas.

Materiais Suplementares: As seguintes informações de apoio podem ser baixadas em: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens12101250/s1>, Tabela S1: Classificação da cepa *Burkholderia mallei* BAC 86/19 por MALDI-TOF MS.

Contribuições dos autores: Conceitualização: F.R.d.A., A.F.d.C.N. e A.M.d.S.G. Metodologia: PAPS, CM, MGdS, NVV, AFdCN, CKZ, MCSZ, DPC e A.M.d.S.G. Validação de análise de dados genômicos: P.A.P.S., A.A.d.E., C.K.Z., M.C.S.Z., A.M.d.S.G., A.M.R.D. e F.R.d.A. Writing - preparação do rascunho original: P.A.P.S., C.M., N.V.V., L.R.d.S., A.M.d.S.G., A.A.d.E., A.M.d.S.G., L.R.d.S., A.F.d.C.N. e F.R.d.A. Administração do projeto: L.R.d.S. e F.R.d.A. Aquisição de financiamento: F.R.d.A. e L.R.d.S. Todos os autores leram e concordaram com a versão publicada do manuscrito.

Financiamento: Esta pesquisa foi financiada pelo Departamento de Defesa Agropecuária (SDA)/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (bolsa 20.21.10.006.00.00), CNPq (bolsa 315857/2021). -8 e 403651/2020-4) e CNPq (código 403651/2020-5, cooperação UFMS-EMBRAPA 25/2022).

Declaração do Conselho de Revisão Institucional: Não aplicável.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Não aplicável.

Declaração de disponibilidade de dados: A montagem do genoma está disponível em https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCA_024748885.1/ (acessado em 5 de outubro de 2023). As leituras estão disponíveis em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/SRX15672395> (acessado em 5 de outubro de 2023).

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. Wang, G.; Glaser, L.; Scott, N.E.; Fathy Mohamed, Y.; Ingram, R.; Laroucau, K.; Valvano, M.A. A glycoengineered antigen exploiting a conserved protein O-glycosylation pathway in the *Burkholderia* genus for detection of glanders infections. *Virulence* **2021**, *12*, 493–506. [CrossRef]

2. Waag, D.M.; Chance, T.B.; Trevino, S.R.; Rossi, F.D.; Fetterer, D.P.; Amemiya, K.; Welkos, S.L. Comparison of three nonhuman primate aerosol models for glanders, caused by *Burkholderia mallei*. *Microb. Pathog.* **2021**, *155*, 104919. [[CrossRef](#)]
3. Johnson, M.M.; Ainslie, K.M. Vaccines for the prevention of melioidosis and glanders. *Curr. Trop. Med. Rep.* **2017**, *4*, 136–145. [[CrossRef](#)]
4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Bioterrorism Agents/Diseases. 2018. Available online: <https://emergency.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp> (accessed on 1 May 2023).
5. OIE. Glanders and Melioidosis. 2018. Available online: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.11_GLANDERS.pdf (accessed on 28 September 2023).
6. Fonseca-Rodríguez, O.; Júnior, J.W.P.; Mota, R.A. Spatiotemporal analysis of glanders in Brazil. *J. Equine Vet. Sci.* **2019**, *78*, 14–19. [[CrossRef](#)]
7. Mota, R.A.; Brito, M.F.; Castro, F.J.; Massa, M. Mormo em equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesqui. Veterinária Bras.* **2000**, *20*, 155–159. [[CrossRef](#)]
8. Mota, R.A.; Oliveira, A.A.D.F.; Pinheiro Junior, J.W.; Silva, L.B.G.D.; Brito, M.D.F.; Rabelo, S.S.A. Glanders in donkeys (*Equus asinus*) in the state of Pernambuco, Brazil: A case report. *Braz. J. Microbiol.* **2010**, *41*, 146–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Rocha, L.O.D.; Lima, L.A.R.D.; Albuquerque, R.M.S.D.; Lages, S.L.S.; Nunes, A.C.B.T.; Castro, R.S.D.; Falcão, M.V.D. Monitoring the outbreak of equine glanders in Alagoas, Brazil: Clinical, immunological, molecular and anatomopathological findings. *Ciência Rural* **2021**, *51*. [[CrossRef](#)]
10. Abreu, D.C.; Gomes, A.S.; Tessler, D.K.; Chiebao, D.P.; Del Fava, C.; Romaldini, A.H.D.C.N.; Nassar, A.F.C. Systematic monitoring of glanders-infected horses by complement fixation test, bacterial isolation, and PCR. *Vet. Anim. Sci.* **2020**, *10*, 100147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Suniga, P.A.P.; Mantovani, C.; Santos, M.G.; Rieger, J.S.G.; Gaspar, E.B.; Santos, F.L.; Mota, R.A.M.; Chaves, K.P.; Egito, A.A.; Filho, J.C.O.; et al. Molecular detection of *Burkholderia mallei* in different geographic regions of Brazil. *Braz. J. Microbiol.* **2023**, *54*, 1275–1285. [[CrossRef](#)]
12. Appelt, S.; Rohleder, A.M.; Jacob, D.; Von Buttler, H.; Georgi, E.; Mueller, K.; Scholz, H.C. Genetic diversity and spatial distribution of *Burkholderia mallei* by core genome-based multilocus sequence typing analysis. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0270499. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Leonard, F.C.; Hartigan, P.; Fanning, S.; Fitzpatrick, E. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2011.
14. Winn, W.C., Jr.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Koneman, E.; Procop, G.; Schreckenberger, P.C.; Woods, G. Bacilos gram-negativos não fermentadores. In *Koneman Diagnostico Microbiológico*; Texto e Atlas Colorido: Guanabara, RJ, Brazil, 2008; Volume 6, pp. 302–386.
15. Sauer, S.; Freiwald, A.; Maier, T.; Kube, M.; Reinhardt, R.; Kostrzewa, M.; Geider, K. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2843. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Freiwald, A.; Sauer, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 732–742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Bacanelli, G.; Orlarte, L.C.; Silva, M.R.; Rodrigues, R.A.; Carneiro, P.A.; Kaneene, J.B.; Verbisck, N.V. Matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry identification of *Mycobacterium bovis* in Bovinae. *J. Vet. Med. Sci.* **2019**, *81*, 1400–1408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Lasch, P.; Stämmler, M.; Schneider, A. A MALDI-TOF mass spectrometry database for identification and classification of highly pathogenic microorganisms from the Robert Koch-Institute (RKI). *Zenodo* **2016**, *27*. [[CrossRef](#)]
19. Verbisck, N.; Araujo, F.; Gaspar, E.; Fonseca Júnior, A.; Mota, R.; Silva, K.; Alvarenga, L.; Lima, D. Caracterização e identificação de *Burkholderia mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF: Resultados de um estudo piloto. Campo Grande; MS: Embrapa Gado de Corte. *Bol. Pesqui. E Desenvolv.* **2020**, *47*, 2.
20. Andrews, S. FastQC: A Quality Control for High Throughput Sequence Data. 2010. Available online:

- <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 1 May 2023).
21. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114–2120. [[CrossRef](#)]
 22. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Pevzner, P.A. SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* **2012**, *19*, 455–477. [[CrossRef](#)]
 23. Alonge, M.; Lebeigle, L.; Kirsche, M.; Jenike, K.; Ou, S.; Aganezov, S.; Wang, X.; Lippman, Z.B.; Schatz, M.C.; Soyk, S. Automated assembly scaffolding using RagTag elevates a new tomato system for high-throughput genome editing. *Genome Biol.* **2022**, *23*, 1–19. [[CrossRef](#)]
 24. Thibault, F.M.; Valade, E.; Vidal, D.R. Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei* and *B. thailandensis* by real-time PCR targeting type III secretion system genes. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 5871–5874. [[CrossRef](#)]
 25. Lowe, C.W.; Satterfield, B.A.; Nelson, D.B.; Thiriot, J.D.; Heder, M.J.; March, J.K.; Robison, R.A. A Quadruplex Real-Time PCR Assay for the Rapid Detection and Differentiation of the Most Relevant Members of the *B. pseudomallei* Complex: *B. mallei*, *B. pseudomallei* and *B. thailandensis*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0164006. [[CrossRef](#)]
 26. Lee, M.A.; Wang, D.; Yap, E.H. Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR FEMS. *Immunol. Med. Microbiol.* **2005**, *43*, 413–417. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 27. Girault, G.; Wattiau, P.; Saqib, M.; Martin, B.; Vorimore, F.; Singha, H.; Laroucau, K. High-resolution melting PCR analysis for rapid genotyping of *Burkholderia mallei* infection. *Genet. Evol.* **2018**, *63*, 1–4. [[CrossRef](#)]
 28. Li, H.; Durbin, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 1754–1760. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 29. Poplin, R.; Ruano-Rubio, V.; DePristo, M.A.; Fennell, T.J.; Carneiro, M.O.; Van der Auwera, G.A.; Banks, E. Scaling accurate genetic variant discovery to tens of thousands of samples. *bioRxiv* **2017**, 201178. [[CrossRef](#)]
 30. McKenna, A.; Hanna, M.; Banks, E.; Sivachenko, A.; Cibulskis, K.; Kernytsky, A.; DePristo, M.A. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **2010**, *20*, 1297–1303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 31. Cingolani, P.; Platts, A.; Wang, L.L.; Coon, M.; Nguyen, T.; Wang, L.; Ruden, D.M. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly* **2012**, *6*, 80–92. [[CrossRef](#)]
 32. Brangsch, H.; Singha, H.; Laroucau, K.; Elschner, M. Sequence-based detection and typing procedures for *Burkholderia mallei*: Assessment and prospects. *Front. Vet. Sci.* **2022**, *9*, 1056996. [[CrossRef](#)]
 33. Menzel, P.; Ng, K.L.; Krogh, A. Fast and sensitive taxonomic classification for metagenomics with Kaiju. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 11257. [[CrossRef](#)]
 34. Ondov, B.D.; Bergman, N.H.; Phillippy, A.M. Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC Bioinform.* **2011**, *12*, 385. [[CrossRef](#)]
 35. Silva, K.P.; Mota, R.A.; Cunha, A.P.; Silva, L.B.; Leal, N.C.; Cavalcante, Y.V.; Teles, J.A.A.; Pereira, M.C.C. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. *Pesqui. Veterinária Bras.* **2009**, *29*, 439–444. [[CrossRef](#)]
 36. Bauernfeind, A.; Roller, C.; Meyer, D.; Jungwirth, R.; Schneider, I. Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia Pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* **1998**, *36*, 2737–2741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 37. Bowers, J.R.; Engelthaler, D.M.; Ginther, J.L.; Pearson, T.; Peacock, S.J.; Tuanyok, A.; Keim, P.S. BurkDiff: A real-time PCR allelic discrimination assay for *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15413. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 38. Falcão, M.V.; Laroucau, K.; Vorimore, F.; Deshayes, T.; Santana, V.L.; Silva, K.P.; Mota, R.A. Molecular characterization of

- Burkholderia mallei* strains isolated from horses in Brazil (2014–2017). *Infect. Genet. Evol.* **2022**, *99*, 105250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Laroucau, K.; Santana, V.L.A.; Girault, G.; Martin, B.; Silveira, P.M.; Machado, M.B.; Madani, N. First molecular characterization of a Brazilian *Burkholderia mallei* strain isolated from a mule in 2016. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *57*, 117–120. [[CrossRef](#)]
 40. Karger, A.; Stock, R.; Ziller, M.; Elschner, M.C.; Bettin, B.; Melzer, F.; Maier, T.; Kostrzewa, M.; Scholz, H.C.; Neubauer, H.; et al. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. *BMC Microbiol.* **2012**, *12*, 229. [[CrossRef](#)]
 41. Suttisunhakul, V.; Pumpuang, A.; Ekcharyawat, P.; Wuthiekanun, V.; Elrod, M.G.; Turner, P.; Currie, B.J.; Phetsouvanh, R.; Dance, D.A.B.; Limmathurotsakul, D.; et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Burkholderia pseudomallei* from Asia and Australia and differentiation between *Burkholderia* species. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0175294. [[CrossRef](#)]

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O primeiro artigo científico dessa tese demonstra, através da detecção molecular de *Burkholderia mallei*, a presença de mormo em todas as regiões brasileiras. A zoonose mostra-se presente tanto em animais portadores de sintomatologia clínica como em animais aparentemente saudáveis, sendo que nesses últimos é possível obter a bactéria viável até mesmo em vias externas como narinas e palato.

Com isso, verifica-se importância da vigilância contínua, inclusive em equídeos assintomáticos, e realça a relevância de uma estratégia integrada para o controle do mormo, considerando suas significativas implicações econômicas e zoonóticas.

A evolução genômica de *B. mallei* através de recombinações aleatórias pode levar a geração de variantes que escapem da detecção por PCR previamente padronizados, sugerindo a necessidade premente do desenvolvimento de ensaios diagnósticos robustos e a identificação de marcadores fidedignos. Para o rastreamento das infecções causadas por *B. mallei* é necessário que sejam criados métodos mais sofisticados para identificação dos genótipos e diferenciação de suas cepas, por ser um organismo altamente clonal.

O sequenciamento do genoma da cepa BAC 86/19, aqui apresentado no segundo artigo, fornece dados valiosos para futuras pesquisas que visem melhorar a vigilância e o controle dessa zoonose. A partir do isolamento e caracterização dessa cepa desenvolveu-se um experimento para avaliar sua virulência, o que pode contribuir para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos (GASPAR et al., 2023).

Em suma, espera-se que este estudo gere conhecimentos fundamentais para embasar futuros trabalhos com o objetivo de erradicação do patógeno no território nacional, contribuindo assim com a sanidade e produtividade dos equídeos e com potencial impacto na saúde humana.