



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Marcus Vinícius Dias Falcão

Caracterização molecular e estudo do genoma de *Burkholderia mallei* isoladas de equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas, Brasil

Recife

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Marcus Vinícius Dias Falcão

Caracterização molecular e estudo do genoma de *Burkholderia mallei* isoladas de equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas, Brasil

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Biociência animal na área de concentração biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Recife

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- F178c Falcão, Marcus Vinícius Dias
Caracterização molecular e estudo do genoma de Burkholderia mallei isoladas de equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas, Brasil / Marcus Vinícius Dias Falcão. - 2021.
122 f. : il.
- Orientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Inclui referências e anexo(s).
- Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, 2021.
1. Sequenciamento. 2. Genoma. 3. Marcadores moleculares. 4. Mormo. I. Mota, Rinaldo Aparecido, orient. II. Título

CDD 636.089

FOLHA DE APROVAÇÃO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biociência Animal, outorgado pela Universidade Federal Rural de Pernambuco, à disposição na Biblioteca Central desta universidade. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas as normas de ética científica.

Marcus Vinícius Dias Falcão

Aprovado em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rinaldo Aparecido Mota
Professor Titular de Doenças Infecciosas – UFRPE
Orientador

Profa. Dra. Karla Patricia Chaves da Silva
Professora de Doenças infecciosas – DMV/UFAL

Dra. Vania Lucia de Assis Santana
Auditora Fiscal Agropecuária – SFA/PE

Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Professor de Doenças Infecciosas – DMV/UFRPE

Dra. Renata Pimentel Bandeira de Melo
Médica Veterinária – DMV/UFRPE

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido a vida e a força para seguir esse caminho. Aos meus pais, por terem sempre me apoiado e incentivado na minha jornada; minha família, sempre interessada e disposta a ajudar sempre que necessário.

À minha namorada, Mariana, por ter me ajudado nos momentos mais árduos, por me aconselhar, incentivar, e sempre me ajudar quando preciso e quando não preciso.

Ao meu orientador, Prof. Rinaldo, primeiramente pelo apoio e investimento conferido desde meu estágio de conclusão de curso, Mestrado e por fim o Doutorado, pelas oportunidades oferecidas, minha gratidão!

À equipe do LANAGRO-PE, por ter me iniciado na área da bacteriologia, me ajudado sempre que necessário e me ensinado o trabalho em equipe.

À equipe da UFAL pelo auxílio dado durante a obtenção das amostras e contribuições científicas, em especial a prof^a. Karla pela disponibilidade e cooperação desde o início dessa jornada e pela disponibilização das fotos que compõe essa tese.

As equipes da defesa sanitária animal de Pernambuco e Alagoas, ADAGRO, SFA-PE e ADEAL, pelo auxílio na obtenção das amostras, em especial a Dr.^a Vania, por sempre me apoiar, orientar e me cobrar, para cada vez ser um melhor profissional, além de me ajudar na obtenção das amostras, participação nas necropsias e pela disponibilização das fotos que compõe essa tese.

Aos meus colegas do LDIC – UFRPE, a todos pós-graduandos, residentes, PIBICs e estagiários pelas conversas, ajudas, preparações de géis, meios, PCRs e cultivos. Aprendi muito sobre vários assuntos diferentes, fora da minha área de estudo graças a vocês, só deixando mais claro a importância da amizade no meio científico, realizar parcerias e trocas, obrigado!

À toda equipe do ANSES, local da realização do período sanduíche, pela convivência e integração na equipe, pelo auxílio técnico e pelos todos os ensinamentos passados.

Je remerci à ma superviseure et amie, Karine Laroucau de m'avoir donné l'opportunité de revenir à l'Anses pour une autre expérience inoubliable, à la fois culturelle

et académique, à Thomas et Fabien, pour les conversations, échangé des expériences et de la patience pour m'enseigner de nouvelles choses dans une nouvelle langue. A toute l'équipe, même si non mentionnée, mais toujours disponible à m'aider, merci beaucoup!

Obrigado a todos que contribuíram direta e indiretamente para realização desse trabalho!

*La vie n'est pas facile pour aucun d'entre nous.
Mais que dire de qui ?
Nous devons persévérer et surtout avoir confiance en nous-mêmes.
Nous devons croire que nous sommes doués
pour quelque chose et que nous devons l'atteindre.*

Marie Curie

FONTE FINANCIADORA

Discente fomentado pela CAPES, tanto pela concessão da bolsa de pós-graduação durante o tempo de estudo no Brasil, bem como de bolsa de Doutorado Sanduíche no Programa CAPES/PrInt, realizado na *Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail* (ANSES), Maisons-Alfort, França.

Resumo: Mormo é uma doença infectocontagiosa primeiramente relatada entre os séculos II e IV e que causa graves perdas econômicas para a equideocultura. O objetivo desse estudo foi caracterizar geneticamente isolados de *Burkholderia mallei* obtidos de equídeos com mormo nos estados de Pernambuco e Alagoas. Durante as necropsias dos animais soropositivos foram coletadas amostras das lesões piogranulomatosas. O material foi submetido ao isolamento bacteriano e confirmação pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional e tempo real. No total, seis isolados foram identificados nas propriedades de equinos nos dois estados, sendo cinco isolados do estado Pernambuco e um isolado de Alagoas. Os produtos das ampliações foram sequenciados e comparados ao banco de dados encontrado no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), onde foi possível observar similaridade com o isolado *Turkey 10*, relatado primeiramente na Turquia. Os isolados foram submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase – *High Resolution Melting* (PCR-HRM) para caracterização genética por meio da variação dos *Single Nucleotide polymorphisms* (SNPs) e posteriormente ao sequenciamento completo do genoma (WGS). O sequenciamento do genoma revelou uma correlação entre as cepas circulantes nos dois estados, com uma variação genética entre cepas isoladas de animais de Pernambuco. Foram descritos dois genótipos de *Burkholderia mallei* circulantes no Brasil, sendo o genótipo L3B2, anteriormente descrito para um isolado brasileiro e o genótipo L3B3Sb3Gp1SbGp1, ainda não descrito anteriormente no país. Este é a primeira descrição de um isolado com similaridade genética com outras cepas relatadas na Europa, sugerindo mais de um evento de introdução da doença no Brasil. A caracterização dos isolados de *B. mallei* circulantes é importante para o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de diagnóstico sorológico e desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para detecção de cepas brasileiras, além de ser um meio de adicional no controle da doença, possibilitando estabelecer ligações entre os diversos casos e identificar cadeias de transmissão.

Palavras-chaves: Sequenciamento, Genoma, Marcadores moleculares, Mormo.

Abstract: Glanders is an infectious-contagious disease first reported between the 2nd and 4th centuries and that causes serious economic losses for equidae culture. The aim of this study was to genetically characterize *Burkholderia mallei* isolates obtained from equine glanders in the states of Pernambuco and Alagoas. During necropsies of seropositive animals, samples of pyogranulomatous lesions were collected. The material was subjected to bacterial isolation and bacterial cultures were analyzed by conventional and real time Polymerase Chain Reaction (PCR) for confirmation. In total, six isolates were identified on horse farms in both states, five from Pernambuco state and one from Alagoas. The amplicons were sequenced and compared to the database found at the National Center for Biotechnology Information (NCBI), where it was possible to observe similarity with the *Turkey 10* isolate, first reported in Turkey. In order to confirm the result, the isolates were submitted to Polymerase Chain Reaction - High Resolution Melting (PCR-HRM) for genetic characterization through the variation of Single Nucleotide polymorphisms (SNPs) and subsequently to complete genome sequencing (WGS). The complete genome sequencing revealed a correlation between the circulating strains between the two states, but a genetic variation was observed among strains isolated from animals from Pernambuco. Two genotypes of *Burkholderia mallei* circulating in Brazil have been described, being the L3B2 genotype previously described for a Brazilian isolate and the L3B3Sb3Gp1SbGp1 genotype, never previously described for contemporary strains in Brazil. This is the first current description of an isolate with genetic similarity to other strains reported in Europe, suggesting more than one event of introduction of the disease in Brazil. The characterization of circulating *B. mallei* isolates is important for the development and improvement of serological diagnostic techniques and the development of specific molecular markers for the detection of Brazilian strains, in addition to being an additional means of controlling the disease, making it possible to establish links between the different cases and identify transmission chains.

Key-words: Sequencing, Genome, Molecular Markers, Glanders.

Sumário

1. Introdução	15
2. Revisão de Literatura	17
2.1. Histórico	17
2.2. Características bacteriológicas	18
2.3. Características genéticas	19
2.4. Epidemiologia.....	21
2.4.1 Transmissão	21
2.4.2 Distribuição mundial e nacional	22
2.5 Patogenia e Sinais clínicos	24
2.6 Diagnóstico	26
2.6.1 Bacteriológico	28
2.6.2 Imunológico	29
2.6.2.1 Teste de Imunidade Celular.....	29
2.6.2.1.1 Maleinização	29
2.6.2.2 Testes Sorológicos	30
2.6.2.2.1 Teste de Fixação do Complemento	30
2.6.2.2.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática	32
2.6.2.2.3 <i>Western Blotting</i>	33
2.6.3 Técnicas moleculares e de genotipagem.....	34
2.6.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Convencional e Tempo Real.....	34
2.6.3.2 Tipagem Sequencial de Multilocus (MLST)	35
2.6.3.3 Análise do Número Variável de Repetições em Tandem (VNTR – MLVA)	35
2.6.3.4 Sequenciamento Completo do Genoma – WGS	36
2.6.3.5 PCR <i>High-Resolution Melting Single - Nucleotide Polymorphisms</i> (PCR HRM –SNP)	37
3. Objetivos	39
4. Referências	40
5. Artigos	59
5.1 Artigo 1	59
5.2. Artigo 2.....	68
6. Considerações finais	81
7. Anexos	82

Lista de Figuras

Figura 1. Desenho esquemático do gene *fliP* em *B. mallei* e *B. pseudomallei*. 20

Figura 2. Distribuição do mormo entre Janeiro e Junho/21. 22

Figura 3. Surtos de mormo entre 2009 e 2021..... 23

Figura 4. Número de focos e casos de mormo entre 1999 e 2019 no Brasil... 23

Figura 5. Incidência de mormo nas propriedades por estados entre os anos de 2005 e 2016, os valores representam as propriedades sobre 100.000..... 24

Figura 6. A: Equino: piogranulomas difusos de tamanhos variados em pulmão. B: Equino: separação do piogranulomas em pulmão. C: Equino: piogranulomas difusos de tamanhos variados em fígado. D: Equino: cicatriz em baço..... 25

Figura 7. A: Equino, secreção nasal purulenta. B: Equino, emagrecimento. C: Equino, úlceras em membro posterior. D: Muar, emagrecimento, úlceras em plano nasal e secreção nasal purulenta. E: Equino, cicatriz em forma de estrela em cavidade nasal. F: Equino, presença de nódulos linfáticos aumentados na região cervical..... 27

Figura 8. Árvore filogenética com base em 15 SNPs a partir de 45 genomas de *B. mallei*..... 38

Artigo 1. Fig. 1. PCR específico para gel de agarose de *B. mallei*. Linha 1, marcador molecular; linhas 2 e 3, controles positivos; e linha 4, controle negativo. As linhas 5, 6, 7, 8, 9 e 10 são amostras positivas.....63

Artigo 2. Figure 1: Glanderous horse (No. 6), from Alagoas (A) and pictures of nodules observed during the necropsy on lungs (B) and of nodule and congestion in lung's parenchyma (C).....79

Artigo 2. Figure 2. SNP-based of *B. mallei* incorporating two newly sequenced strains from Brazil (UFAL2 and BM_campo2.1). A representative strain of each lineage (L1 to L3), branches, sub-branches and groups were included, as well as all available genomes related to branches L3B2 and L3B3sB3 as previously determined (Girault *et al.*, 2018). New subgroups were introduced: L3B3Sb3Gp1, L3B3Sb3Gp1SbGpr1, L3B3Sb3Gp1SbGpr2, L3B3Sb3Gp2. PCR HRM clustering results for the six Brazilian *B. mallei* DNAs included in the study, without preliminary WGS information, are shown in blue.....80

Lista de Abreviatura

a.C. – Antes de Cristo

BimA – Proteína de Motilidade Celular A de *Burkholderia*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimático

EUA – Estados Unidos da América

fg – Fragmento

fliP – Gene flagelina P

IB – *Imunoblotting*

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

iELISA – Ensaio de Imunoabsorção Enzimático Indireto

IS - Inserção de Sequência

LPS – Lipopolissacarídeo

MLST – Tipagem Sequencial de Multilocus

MLVA – Análise do Número Variável de Repetições em Tandem

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

orf 11 – *Open Reading Frame 11*

orf 13 – *Open Reading Frame 13*

pb – Pares de Bases

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCR HRM – SNP – PCR *High-resolution Melting - Single Nucleotide polymorphism*

rRNA – Ácido Ribonucleico Ribossomal

SNP - *Single Nucleotide polymorphisms*

ST – Tipagem Sequencial

ST-VNTR – Tipagem Sequencial do Número Variável de Repetições em Tandem

TFC – Teste de Fixação do Complemento

TTS1 – Região de Secreção Tipo III

USDA – Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

VNTR – Número Variável de Repetições em Tandem

VP – Voges Proskauer

WB – *Western Blotting*

WGS – Sequenciamento Completo do Genoma

1. Introdução

A população de equídeos no Brasil é bastante significativa com 5.228.434 animais (IBGE, 2019), ocupando a 4ª posição no *ranking* mundial populacional de equídeos e o 1º lugar na população de asininos. O comércio desses animais movimenta cerca de R\$ 16 bilhões e gera 607.239 empregos diretos e 2.429.316 empregos indiretos (Brasil, 2016). Nesse contexto, o mormo tem grande relevância para o país, pois é uma doença responsável por grandes prejuízos econômicos e sanitários aos criadores de equídeos (Cárdenas et al., 2018; OIE, 2018).

O primeiro relato da doença data entre os séculos II e IV a.C. por Aristóteles e Hipócrates (Langenegger et al., 1960). O primeiro caso no Brasil foi relatado em 1811, no entanto, entre 1968 e 1999 acreditava-se que a doença havia sido erradicada no país quando, então, surgiram novos casos e desde então focos de mormo têm sido identificados em todo o país (Fonseca-Rodriguez et al., 2019; Mota et al., 2000).

Essa importante enfermidade causa impacto na produção de equídeos no país por não existir tratamento, assim como vacinas, além de ser considerada uma zoonose e haver a necessidade de sacrifício dos animais positivos pelo Serviço Veterinário Oficial (Brasil, 2018a; Mota, 2006).

Em 1980, o agente etiológico do mormo foi incluído na *Approved List of Bacterial Names* como *Pseudomonas mallei*, mas devido às caracterizações fenotípicas e baseado na homologia do rRNA 16S com outros gêneros *Burkholderia*, foi reclassificado para *Burkholderia (B.) mallei* (Yabuuchi et al., 1993).

O diagnóstico do mormo se baseia na associação dos aspectos clínico-epidemiológicos, anatomohistopatológicos, isolamento bacteriano, inoculação em animais de laboratório, reação imunoalérgica (maleinização) e testes sorológicos como a prova de fixação do complemento e o Ensaio de Imunoabsorção Enzimático (ELISA), *Western Blotting* (Elschner et al., 2011; Mota et al., 2000; Nierman et al., 2004) e testes moleculares (OIE, 2018; Scholz et al., 2006; Ulrich et al., 2006).

Devido à grande similaridade genética encontrada entre *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*, maior que 90% (Lee et al., 2005; Thibault et al., 2004), técnicas moleculares como a PCR (Scholz et al., 2006; Ulrich et al., 2006), métodos de caracterização molecular (Neubauer et al., 2005; Schmooch et al., 2009; U'ren et al., 2005), e sequenciamento completo do genoma (WGS) (Girault et al., 2018; Laroucau et al., 2018) são fundamentais para identificação da bactéria e para melhorar a confiança no diagnóstico.

O WGS é uma ferramenta de caracterização genética bastante utilizado em casos de surtos, com alto poder discriminatório e que permite a reconstrução filogenética dos isolados (Girault et al., 2018; Laroucau et al., 2018; Lu et al., 2016). A obtenção do genoma completo de *B. mallei* possibilitou o desenvolvimento de uma nova técnica de caracterização, mais rápida, barata e de fácil execução, a PCR *High Resolution Melting* (PCR HRM) a partir da localização e identificação do polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no genoma (Laroucau et al., 2018). Aliado à PCR HRM, é possível obter um panorama, com maior poder discriminatório, entre os isolados brasileiros de *B. mallei* e isolados descritos no mundo, além de poder relacionar a amostra clínica com o evento e o ambiente (Abdelbarya et al., 2018; Girault et al., 2018; Silva et al., 2009).

A caracterização genética dos isolados de *Burkholderia mallei* é essencial para melhoraria da segurança e confiabilidade do diagnóstico do mormo

2. Revisão de Literatura

2.1. Histórico

O Mormo é uma das mais antigas doenças descritas em equídeos no mundo; relatada pelos filósofos Aristóteles, Hipócrates e Vegetius entre os séculos II e IV a.C. que apresentaram um relato de sintomatologia e descrição epidemiológica similar à descrição atual da doença (Blancou, 1994; Udal, 1943). Inicialmente a enfermidade ficou conhecida como “Malleus” que significa martelo (Loeffler, 1886).

Durante a Primeira Guerra Mundial, o agente etiológico do mormo, denominado *Bacillus mallei* (*Burkholderia mallei*) (Yabuuchi et al., 1993) e do Antraz (*Bacillus anthracis*) foram amplamente utilizados pelos alemães como arma biológica (Wheelis, 1998). Em 1914, um membro do exército alemão levou isolados de *B. mallei* e *B. anthracis* para os Estados Unidos da América (EUA), cultivando-os em seu laboratório em Maryland. Os microrganismos foram entregues em Baltimore para serem inoculados em uma remessa de equinos aguardando o envio para tropas Aliadas na Europa (Welkos et al., 2018). Posteriormente, diversos animais de produção como bovinos e mulas também inoculados. Desde então, a Alemanha lançou uma campanha ambiciosa de sabotagem biológica nas linhas de frente leste e oeste, incluindo os EUA, França, Romênia e Rússia. Assim, os casos de doença nos animais aumentaram e surgiram os casos em humanos na Rússia (Wheelis, 1998).

Existem relatos datados de 1932 e 1945 que indicam que o Japão utilizou *B. mallei* como arma biológica para infecção de equinos, civis e prisioneiros de guerra, durante a invasão da China na Segunda Guerra Mundial. No Instituto Ping Fan, Manchuria, dois trabalhadores se acidentaram com isolados de *B. mallei* e morreram em 1937 (Regis, 1999). A ex-União Soviética também foi acusada de usar *B. mallei* como arma biológica contra a força opositora na guerra do Afeganistão entre 1982 e 1984 (Alibek e Handelman, 1999).

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez em 1811 e acredita-se que foi devido à introdução de animais procedentes da Europa (Pimentel, 1938) e em 1968 a doença foi considerada erradicada no país. Contudo, no ano 2000, Mota et al. identificaram novamente os casos da doença (reemergência do mormo) por meio de aspectos microbiológicos, epidemiológicos e clínico-patológicos, alertando para a necessidade imediata de implementação de medidas de controle e erradicação da enfermidade. Durante aproximadamente três décadas a doença foi provavelmente subnotificada e/ou novas fontes de infecção podem ter sido introduzidas com a importação de animais de todo o mundo (Mota et al., 2000).

2.2. Características bacteriológicas

Burkholderia mallei é um cocobacilo Gram negativo, imóvel, não hemolítico, aeróbio e não esporulado com extremidades arredondadas, medindo 2 - 5µm de comprimento e 0,3 - 0,8µm de largura (OIE, 2018; Sprague e Neubauer, 2004), sendo uma bactéria intracelular facultativa (Khan et al., 2012). Taxonomicamente é classificada como uma espécie do domínio Bactéria, filo *Proteobacteria*, classe *Betaproteobacteria*, ordem *Burkholderiales*, família *Burkholderiaceae*, gênero *Burkholderia* (NCBI, 2019; OIE, 2018). Foi primeiramente descrita em 1882 a partir do isolamento do fígado e baço de um equino (Schadewaldt, 1975) e, hoje essa bactéria é identificada pelo código NCBI: txid 13373 do *National Center for Biological Information* (NCBI). Ao longo dos anos, a bactéria recebeu diversas nomenclaturas como "***Bacillus mallei***" (Zopf, 1885), "***Pfeifferella mallei***" (Zopf, 1885) (Buchanan, 1918), "***Actinobacillus mallei***" (Zopf, 1885) (Thompson, 1933), "***Malleomyces mallei***" (Zopf, 1885) (Pribram, 1933), "***Loefferella mallei***" (Zopf, 1885) (Holden, 1935, apud NCBI, 2019), "***Acinetobacter mallei***" (Zopf, 1885) (Steel e Cowan, 1964), "***Pseudomonas mallei***" (Zopf, 1885) (Redfearn et al., 1966) nomenclatura incluída na "Approved list of bacterium names" em 1980, e finalmente denominada ***Burkholderia mallei*** (Zopf, 1885) (Yabuuchi et al., 1993) devido à homologia DNA-DNA, lipídeos, composição de ácidos graxos

celulares, características fenotípicas e o gene 16s (Godoy et al., 2003; Henning, 1956; NCBI, 2019).

Al-Ani et al. (1992) realizaram microscopia eletrônica e demonstraram que a bactéria possui um núcleo, partículas citoplasmáticas e três camadas do componente de membrana da unidade exterior da parede celular e uma cápsula de lipopolissacarídeo, sendo esta estrutura responsável pela sua virulência. A cápsula é constituída por hidratos de carbono neutros e auxilia na proteção contra fatores ambientais desfavoráveis (Deshawer et al., 2001; Fritz et al., 2000; Popov et al., 1995, 2000; OIE, 2018).

B. mallei, diferentemente da *B. pseudomallei* que pode sobreviver no ambiente por até 16 anos (Pumpuang et al., 2011) é sensível à ação da luz solar, calor e desinfetantes comuns e dificilmente sobrevive em ambientes contaminados por mais de duas semanas, porém em ambientes favoráveis, pode sobreviver por seis semanas ou até alguns meses (Neubauer et al., 1997; OIE, 2018).

2.3. Características genéticas

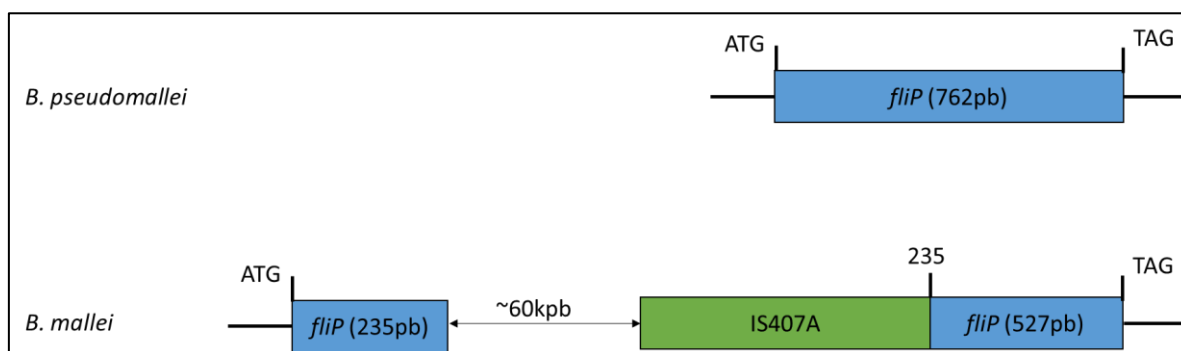
As bactérias, na maioria das vezes, possuem seu genoma constituído em apenas um cromossomo, porém podem existir genomas mais complexos com dois cromossomos, sendo o maior contendo a maioria dos genes essenciais e o menor (secundário), possuindo relativamente menos genes essenciais (Egan et al., 2005; Kolsto, 1999). Isso acontece com *Burkholderia mallei* que possui dois cromossomos circulares com aproximadamente 3.500.000 bases no cromossomo 1 e 2.300.000 bases no cromossomo 2, 22.398 genes totais e 3.456 genes em seu genoma núcleo, portanto se mostra bastante complexa comparada aos demais procaríotos (Diniz et al., 2008; Losada et al., 2010).

Como as espécies de *Burkholderia* são adaptadas à sobrevivência fora do hospedeiro (Mahenthiralingam et al., 2005) é provável que seu complexo genoma seja responsável por essa versatilidade, devido à adição de material genético exógeno ao seu genoma básico. Esse material genético exógeno poderia ser incorporado aos seus cromossomos e mantido separado em *replicons* durante a evolução de *Burkholderia* spp. (Dubarry et al., 2006).

Existe uma similaridade genética elevada entre *B. mallei* e *B. pseudomallei* que compartilham 90% dos seus genes (Schmoock et al., 2009). Deste modo, Losada et al. (2010) demonstraram que *B. mallei* evoluiu de um único ancestral de *B. pseudomallei*, por meio da perda genética e arranjo do genoma mediado por elementos de inserção de sequência (IS).

Atualmente existem vários métodos moleculares para identificar *B. pseudomallei* e *B. mallei* que utilizam várias plataformas como sequenciamento de Sanger (Gee et al., 2003), PCR multiplex (Lee et al., 2005), PCR em tempo real (Novak et al., 2006; Supaprom et al., 2007; Thibault et al., 2004; Tomaso et al., 2006) e amplificação isotérmica de DNA (Chantratita et al., 2008). Vários desses ensaios são promissores como alternativas rápidas aos testes bioquímicos; no entanto, poucos foram amplamente validados quanto à robustez e especificidade. *B. pseudomallei* e *B. mallei* são bactérias geneticamente correlatas, dificultando o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico de ensaios de loco único (Holden et al., 2004; Nierman et al., 2004). Contudo, o gene flagelina P (*fliP*) foi utilizado com sucesso por Scholz et al. (2006) como alvo para diferenciar essas duas espécies, pois foi constatado que o gene *fliP* em *B. mallei* sofreu um evento de recombinação do seu ancestral (*B. pseudomallei*) que possui o mesmo gene com 762 pb. O gene em *B. mallei* foi separado em dois fragmentos de 235 pb e 527 bp, respectivamente, na posição 235 do elemento IS407A, causando um afastamento de aproximadamente 60 kpb dos dois fragmentos (Figura 1).

Figura 1. Desenho esquemático do gene *fliP* em *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*.



Fonte: O autor, adaptada de Scholz et al. (2006)

2.4. Epidemiologia

2.4.1 Transmissão

Por anos se debate como acontece a transmissão de *B. mallei*, porém sabe-se que a presença de animais doentes ou assintomáticos são as principais fonte de infecção (Al-Ani e Roberson, 2007). Os nódulos pulmonares e da pele se rompem e liberam o conteúdo purulento repleto de *B. mallei* para as vias áreas superiores onde são posteriormente excretados pela via nasal e oral (Mota, 2006).

A principal porta de entrada é a digestiva, pela ingestão de alimentos e água contaminados pelos animais doentes (Radostits et al., 2002). Em um estudo conduzido por Gangulee et al. (1966) demonstrou-se que a sobrevivência de *B. mallei* em água parada permite que esta seja uma via de transmissão por várias semanas após sua contaminação. A infecção pelas vias respiratória e cutânea são menos comuns comparadas à via digestiva, porém devem ser levadas em consideração quando se estuda a doença (Hirsh e Zee, 2003; Mota et al, 2000; Radostits et al., 2002). Moscas domésticas (*Musca domestica*) podem ser vetores na transmissão da bactéria, uma vez que podem carrear o agente das lesões da pele para os demais animais da propriedade (Henning, 1956).

Os fatores de risco associados à doença incluem a superpopulação animal, precárias condições de higiene, compartilhamento de cochos, fontes de água e utensílios utilizados no manejo dos animais (Mota, 2006; Radostits et al., 2002). Mesmo sendo comprovado que equídeos de todas as idades e sexos são suscetíveis à infecção, aqueles animais submetidos à tração, estresse e má alimentação, geralmente são os mais acometidos (Mota, 2006; Pritchard, 1995; Sharrer, 1995)

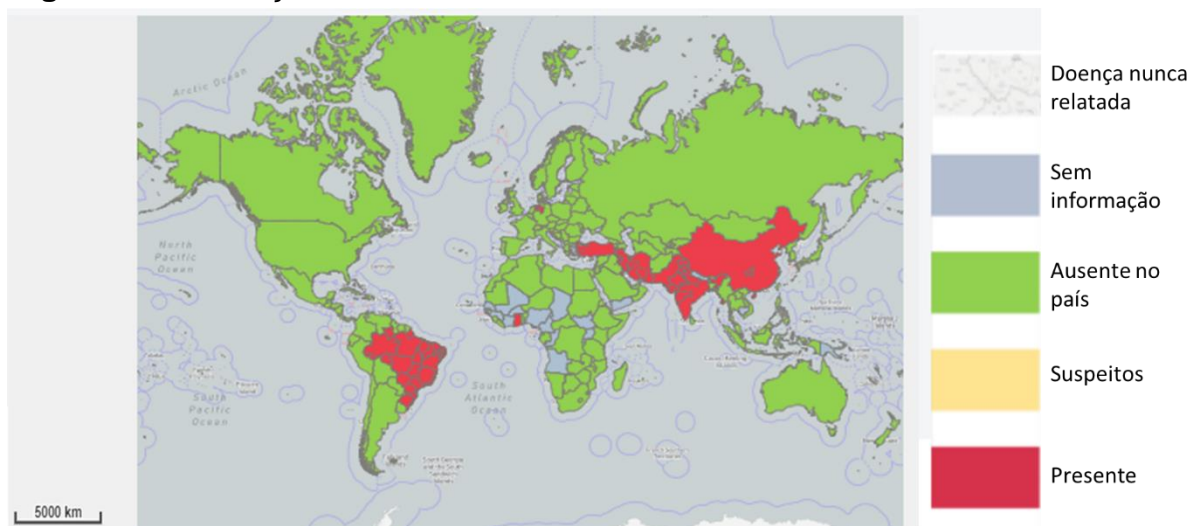
A maioria dos animais domésticos podem ser acometidos, sendo os solípedes os mais suscetíveis (equinos, muares e asininos) e os carnívoros podem se infectar após consumo da carne dos animais infectados (Alibasoglu et al., 1986; Henning, 1956; Knowles e Moulton, 1982; Van der Schaaf, 1964; Verma, 1998) e a infecção também já foi demonstrada em camelos, dromedários,

ursos, lobos e cães, porém bovinos e suínos se mostram resistente à infecção por *B. mallei* (OIE, 2018; Wernery et al., 2011).

2.4.2 Distribuição mundial e nacional

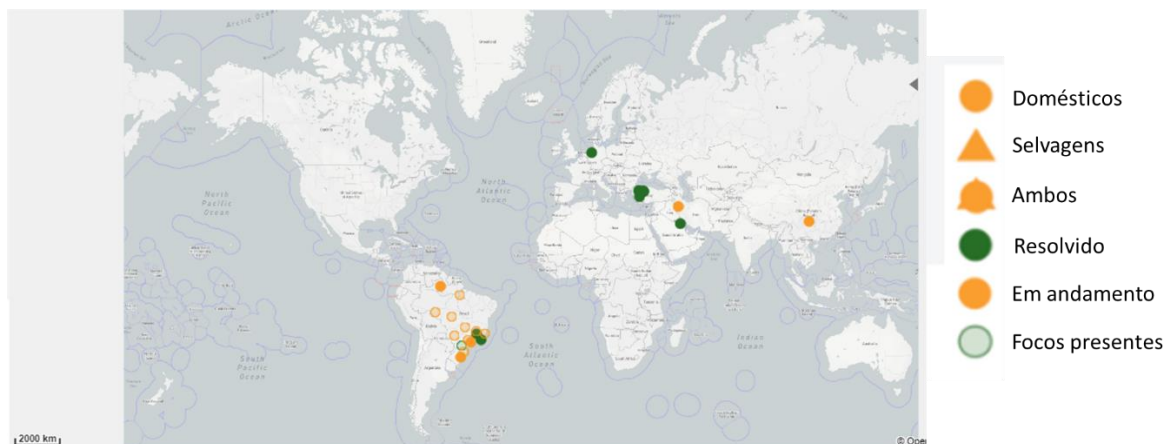
O mormo já foi relatado em várias regiões que são consideradas livres como América do Norte e Europa (Bierer, 1940; Derbyshire, 2002; Wilkinson, 1992). Em 2006 houve um caso de mormo em equino na Alemanha, originado de um animal importado do Brasil, sem sinais clínicos e com o teste negativo para trânsito internacional de animais (Elschner et al., 2009; OIE, 2018). Excluindo esse caso, a doença é considerada erradicada nos países europeus e norte-americanos (Figura 2) desde o século passado, porém ainda existem surtos na região sul-americana (Elschner et al., 2009; Mota et al., 2010) e no continente asiático (Ghori et al., 2017; Hornstra et al., 2009; Malik et al., 2015; Scholz et al., 2006; Wernery et al., 2011) (Figura 3).

Figura 2. Distribuição do mormo entre Janeiro e Junho de 2021.



Fonte: OIE, (2021a).

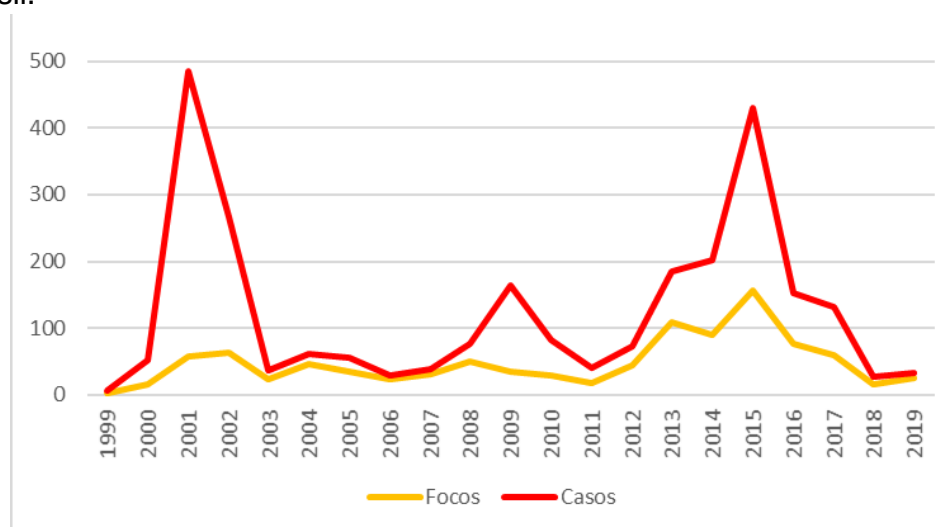
Figura 3. Surtos de mormo em equídeos entre 2009 e 2021.



Fonte: OIE (2020b).

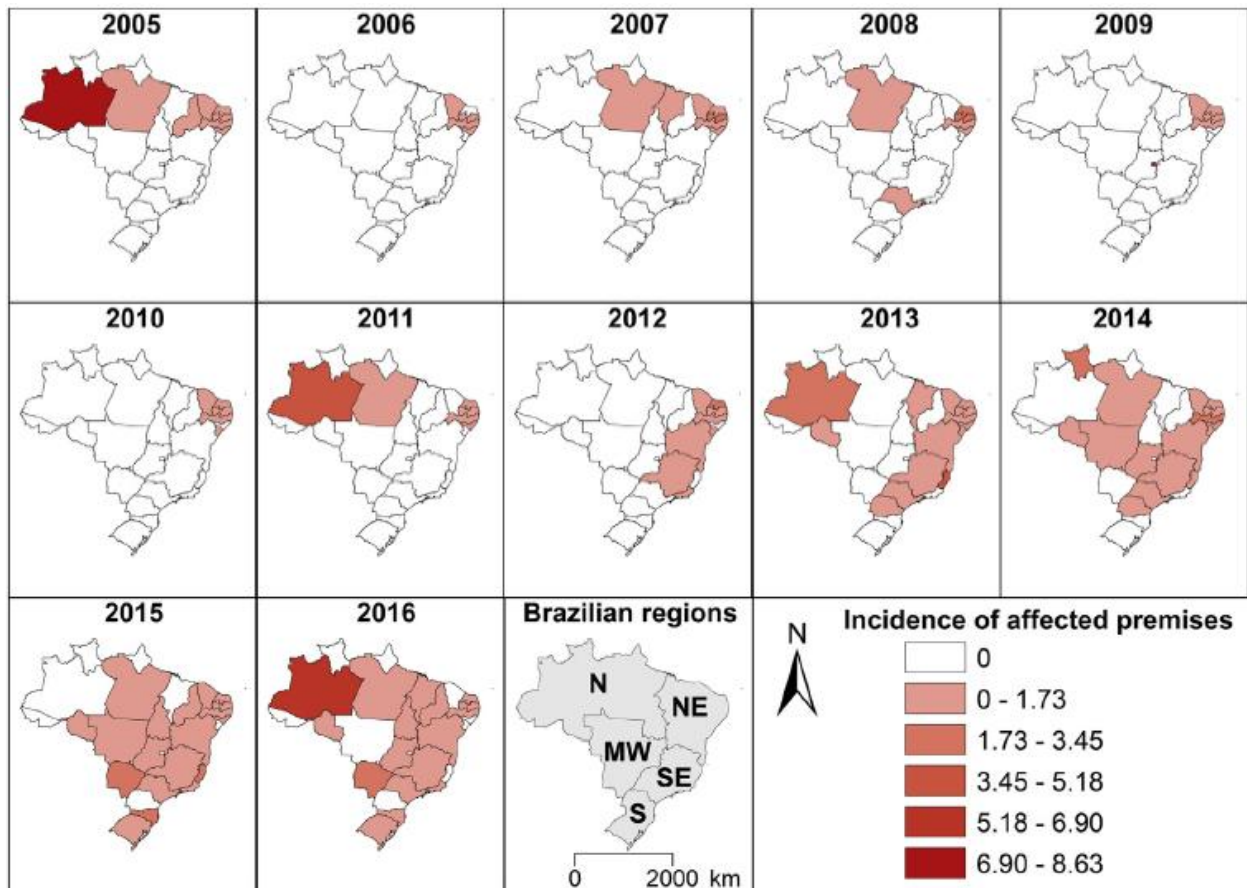
Após a descrição da reemergência do mormo em 2000 foi possível observar um aumento do número de casos acompanhado do aumento no número de surtos ao longo de 20 anos (Figura 4). O crescente aumento do número de casos de mormo no Brasil é bastante preocupante, pois a presença da doença prejudica o comércio e a exportação de animais e produtos (Brasil, 2016; OIE, 2018). A expansão da doença no país (Figura 5) ocorre principalmente pelo trânsito de animais assintomáticos para comércio, reprodução e prática de esportes (Fonseca-Rodriguez et al., 2019).

Figura 4. Número de focos e casos de mormo em equídeos entre 1999 e 2019 no Brasil.



Fonte: O autor com dados extraídos da OIE, Handistatus II (2016); WAHIS (2020).

Figura 5. Incidência de mormo nas propriedades de equídeos por estados entre os anos de 2005 e 2016, os valores representam as propriedades sobre 100.000



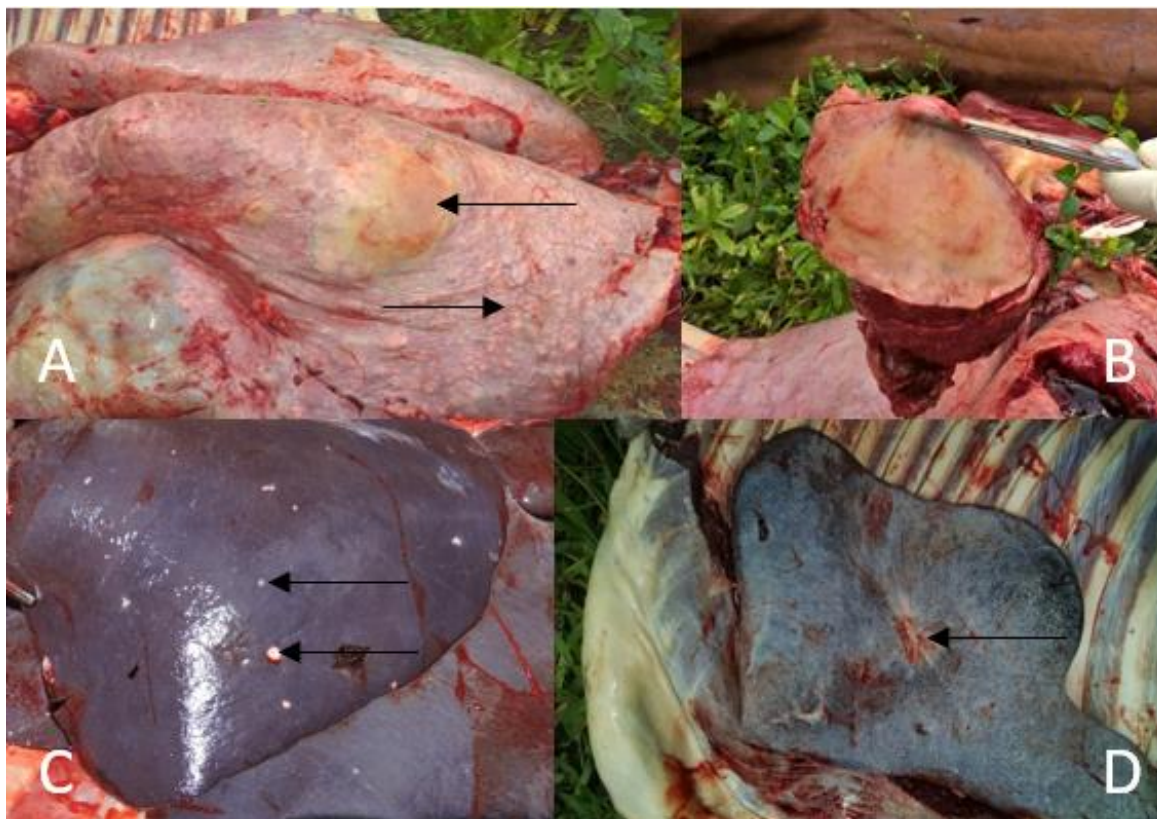
Fonte: Fonseca-Rodriguez et al. (2019).

2.5 Patogenia e Sinais clínicos

Após a ingestão de água e/ou alimentos contaminados, a bactéria penetra na mucosa intestinal, atingindo a via hematogena e se estabelece no sistema respiratório, principalmente nos pulmões, pele e posteriormente no sistema linfático, onde surgem as lesões nodulares; o agente se dissemina pelo organismo, atingindo preferencialmente o fígado e baço, onde formam nódulos firmes (Figura 6) (Mota, 2006). Os nódulos característicos da doença são formados pela infiltração de neutrófilos, hemácias e fibrina na lesão. Uma área necrótica central é formada pela degeneração dos neutrófilos e macrófagos

epitelióides, células gigantes multinucleadas e linfócitos que circundam a área (Hirsh e Zee, 2003).

Figura 6. A: Equino: piogranulomas difusos de tamanhos variados em pulmão. B: Equino: separação do piogranulomas em pulmão. C: Equino: piogranulomas difusos de tamanhos variados em fígado. D: Equino: cicatriz em baço.



Al-Ani et al. (2007), em estudo sobre patogenia e sinais clínicos em cobaio, hamsters, caprinos e ovinos, concluíram que a virulência da cepa e o tipo de inoculação influenciam os sinais clínicos, justificando assim, as diferentes formas de apresentação do mormo nos equídeos.

O mormo, conhecido popularmente como “garrotilho atípico”, “catarro de mormo” ou catarro de burro” (Santos et al., 2001) é uma doença aguda para os muares e asininos e geralmente crônica nos equinos, podendo ainda apresentar uma forma hiperaguda, rápida e letal (Mota e Ribeiro, 2016). Possui quatro apresentações clínicas: cutânea, respiratória, linfática, podendo essas três formas estarem associadas ou não, além da forma assintomática (Jubb et al., 1993; Mota et al., 2006). O período de incubação pode variar de alguns dias a

meses, porém algumas cepas mais virulentas podem causar a doença em 7 a 10 dias (Al-Ani et al, 1998).

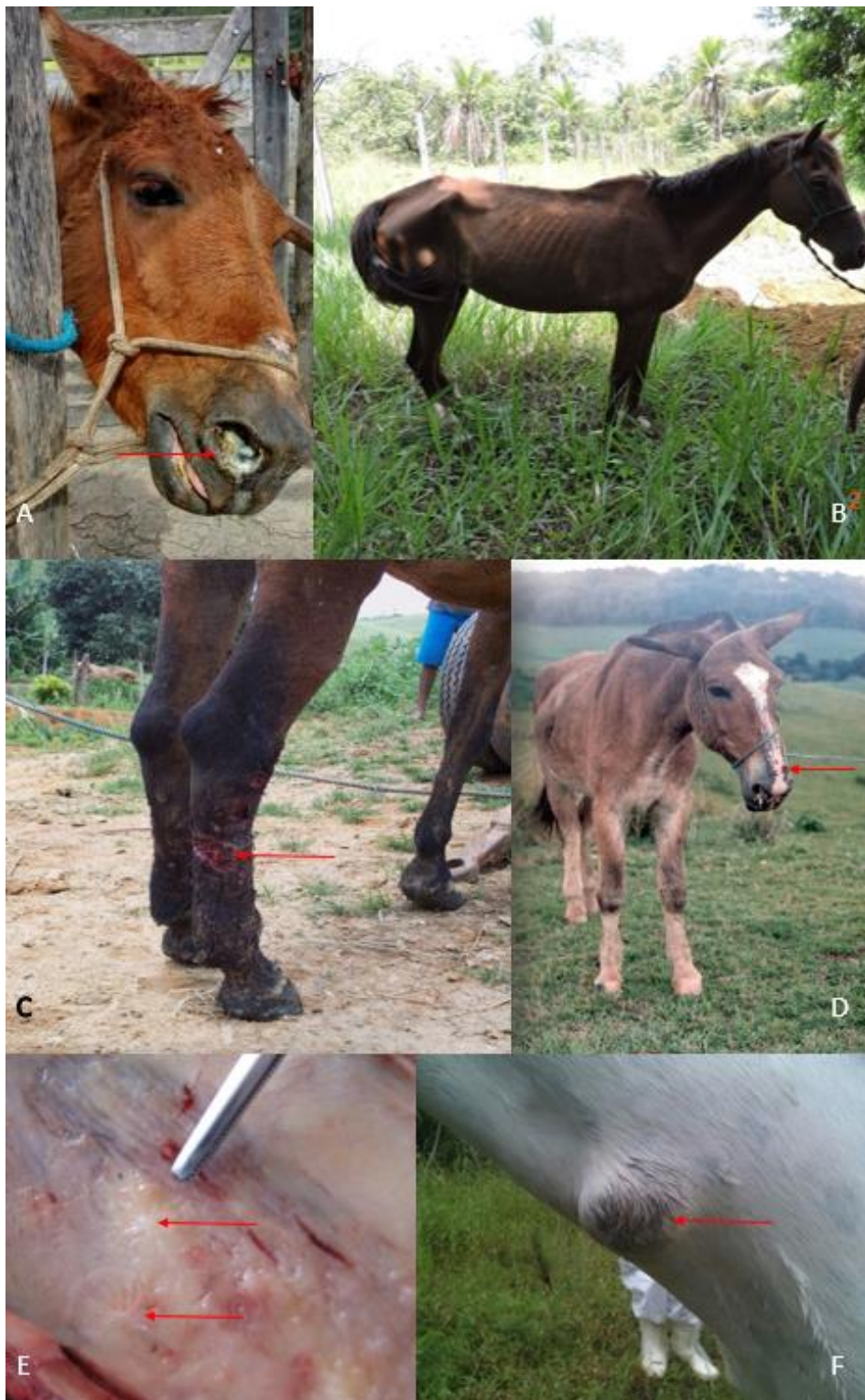
Os sinais clínicos mais frequentes são tosse, febre, corrimento nasal, emagrecimento progressivo, lesões nodulares (quando localizadas na região cervical são denominadas de colar de pérolas) que evoluem para úlceras que cicatrizam em forma de estrela na cavidade nasal (Pritchard, 1995). A pneumonia é um sinal clínico comumente encontrado nos animais acometidos, que ainda podem apresentar epistaxe e dispneia (Mota e Ribeiro, 2016).

Na fase inicial, é possível visualizar uma secreção nasal serosa que pode evoluir para uma secreção purulenta com estrias de sangue (Al-Ani et al., 1992). A forma cutânea da doença normalmente vem acompanhada da forma linfática (Mota et al., 2004) e na pele é possível observar nódulos endurecidos ao longo do leito linfático (Mohammad et al., 1989). Com o decorrer da doença, os nódulos tendem a ser mais flexíveis e moles, e então fistulam, secretando conteúdo purulento e rico em *B. mallei* e evoluem para úlceras (Pritchard, 1995; Sharrer, 1995). Estas lesões são mais claramente vistas em região abdominal, costado e nos membros posteriores, como vista na figura 7 (Mota, 2006).

2.6 Diagnóstico

O diagnóstico do mormo em equídeos baseia-se nos achados clínicos, epidemiológicos, além dos exames microbiológico, de imunidade celular e humoral e técnicas moleculares. Desde sua reemergência no Brasil (Mota et al., 2000), diversos métodos de diagnóstico foram empregados, como a maleinização, o teste de fixação do complemento utilizando diferentes antígenos e métodos de incubação, o ensaio de imunoabsorção enzimático indireto com base em proteína recombinante (TssB) (Brasil, 2016; 2018b) e *Western Blotting* baseado em lipopolissacarídeo de três cepas de *B. mallei* (Elschner et al., 2011).

Figura 7. A: Equino, secreção nasal purulenta. B: Equino, emagrecimento. C: Equino, úlceras em membro posterior. D: Muar, emagrecimento, úlceras em plano nasal e secreção nasal purulenta. E: Equino, cicatriz em forma de estrela em cavidade nasal. F: Equino, presença de nódulos linfáticos aumentados na região cervical.



2.6.1 Bacteriológico

Preferencialmente a bactéria é isolada mais facilmente de secreções de lesões recentes e fechadas, de amostras de sangue e secreções de animais infectados (Nierman et al., 2004; OIE, 2018). Em esfregaços de lesões recentes, as bactérias são bastante numerosas em relação aos esfregaços de lesões mais antigas. O isolamento bacteriano em meios de cultura produz colônias pequenas, mucóides e acinzentadas, porém se tornam pleomórficas quando as colônias são mais velhas (OIE, 2018). As culturas antigas formam ramificações na superfície (Neubauer et al., 2005).

Burkholderia mallei cresce bem em meios que contenham sangue e/ou glicerol sendo suas colônias de aspecto mucóide, acinzentadas e brilhantes (Hirsh e Zee, 2003). São aeróbias e anaeróbias facultativas na presença de nitrato, crescem a 37°C, porém lentamente, portanto uma incubação de 48 - 72h é recomendada. Devido a seu crescimento lento, mesmo utilizando meios comerciais disponíveis (Glass et al., 2009) e coletando o material de maneira estéril e de lesões fechadas, seu isolamento é difícil, pois facilmente outras bactérias podem inibir o seu crescimento durante a incubação (Wernery, 2009). O uso do meio ágar *Burkholderia mallei* se mostrou bastante promissor no isolamento de *B. mallei* devido a sua composição rica em antibióticos e substâncias inibidoras de crescimento de outras bactérias com período de incubação entre 48 - 72h (Kinoshita et al., 2019).

As reações bioquímicas para a identificação da bactéria incluem os testes de oxidase positiva, redução de nitrato, utilização da arginina dihidrolase, assimilação de glucose, N-acetil-glucosamina e gluconato, além disso, algumas cepas podem apresentar variação na assimilação na reação de arabionose, frutose, manose, manitol, ácido edípico, malato, citrato de trisódio, ácido fenilacetico e teste de Voges-Proskauer (VP) (Mota, 2005). Também é imprescindível a avaliação da motilidade para diferenciar bioquimicamente *B. mallei* e *B. pseudomallei*, sendo a primeira móvel e a segunda imóvel (Al-Ani et al., 1998).

O isolamento bacteriano pode ser utilizado para confirmação de casos clínicos em animais, porém deve-se analisar o custo, confiabilidade e outros

fatores que podem limitar a execução da técnica (OIE, 2018). O agente é classificado como risco biológico nível 3 pela portaria número 2349 de 14 de setembro de 2017 do Ministério da Saúde, porém com possibilidade de manipulação em laboratórios com nível de biossegurança 2 em ambientes de contenção (Brasil, 2017).

2.6.2 Imunológico

O diagnóstico imunológico do mormo é importante e amplamente utilizado para identificação da doença nas criações (Brasil, 2018), pois são mais rápidos e possuem um custo menor na execução quando comparadas com as demais técnicas de diagnóstico. Contudo nenhuma das ferramentas para detecção da imunidade celular ou humoral é capaz de diferenciar a infecção por *B. mallei* e *B. pseudomallei* (Laroucau et al., 2020).

2.6.2.1 Teste de Imunidade Celular

2.6.2.1.1 Maleinização

O teste de maleinização foi o primeiro teste para mormo a ser utilizado a campo pelos programas de erradicação desde a década de 1980, os veterinários militares russos Gelman e Kalning desenvolveram o teste primeiramente em 1891 (Kovalev, 1971; Rutherford, 1906). Os Estados Unidos e o Canadá começaram a usar essa ferramenta diagnóstica em 1905 (Steele, 1979). Atualmente a maleína é produzida e distribuída pelo Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais - Brasil, Instituto Pasteur em Bucaresta - Romênia e pelo Instituto Central de Pesquisa em Controle Veterinário em Ankara - Turquia.

O teste funciona similarmente ao de tuberculina, exibindo dor e edema no local da aplicação, também podendo aparecer sinais sistêmicos como

hipertermia (Welkos et al., 2018). O diagnóstico se baseia na detecção da resposta monocelular que é uma reação retardada de hipersensibilidade tipo IV com alta especificidade (Silva et al., 2013).

A administração da maleína pode ser feita pela via intradermopalpebral ou subcutânea na região cervical e ainda há um terceiro método, que seria instilar poucas gotas no canto medial do olho (teste oftálmico). O teste intradermopalpebral é o mais indicado (Blood, 1989). A aplicação e a leitura devem ser feitas pelo Serviço Veterinário Oficial e entre 48h e 72h após aplicação (Brasil, 2018a; Hagebock et al., 1993).

Em alguns casos, a sua utilização não é indicada, como em doença avançada em equinos ou em casos agudos em asininos e muares, pois o resultado pode ser inconclusivo (Welkos et al., 2018). Em equinos com doença crônica ou debilitados, o resultado pode ser negativo (Allen, 1929; Welkos et al., 2018). Equinos com melioidose também podem ser positivos no teste (OIE, 2018).

O teste pode ser utilizado em diversas situações, como em populações livres, animal individual para trânsito, em políticas de erradicação, confirmação de casos clínicos e mensuração de prevalência da doença, porém devem-se analisar os fatores limitantes da técnica (OIE, 2018). A maleinização é considerada uma técnica complementar de diagnóstico, assim como a técnica de *Western Blotting* (Brasil, 2018b). Animais negativos no teste de triagem, o ELISAI, só poderão ser submetidos à maleinização se possuírem sinais clínicos do mormo e, animais com até 180 dias de idade também podem ser submetidos a maleinização caso possuam sinais clínicos (Brasil, 2018b).

2.6.2.2 Testes Sorológicos

2.6.2.2.1 Teste de Fixação do Complemento

O teste de fixação do complemento (TFC) se baseia na detecção de anticorpos específicos contra *B. mallei*, devendo ser realizado em laboratórios oficiais ou credenciados pelo MAPA (Brasil, 2018b).

Atualmente o TFC é o teste oficial recomendado pela Organização Mundial de Saúde Animal para trânsito internacional de animais (OIE, 2018) e a técnica

consegue detectar as formas crônica e assintomática da doença (Neubauer et al., 2005; Sprague et al., 2009). O melhor período para a realização do exame para diagnóstico do mormo situa-se no período de 4 a 12 semanas após a infecção, período de maior pico de produção de anticorpos pelo animal (Schlater, 1992).

A sensibilidade e especificidade do TFC é estimada em 98% e 96,4%, respectivamente (Elschner et al., 2019) e é comum a obtenção de resultado falso positivo (Cravitz e Miller, 1950; OIE, 2018). O resultado do teste pode ser influenciado pelo protocolo utilizado e fatores inerentes como hemácias, complemento, temperatura de incubação e em especial o antígeno de *B. mallei* (Khan et al., 2011; 2012; 2014; Laroucau et al., 2016; Neubauer et al., 2005).

Para a execução do teste existem quatro antígenos comerciais disponíveis: Ccpro (Alemanha), CIDC (Holanda), Bioveta (República Tcheca), produzidos a partir da mistura das cepas Bogor, Zagreb e Mukteswar de *B. mallei*, e o antígeno USDA (Estados Unidos), produzido a partir da cepa China de *B. mallei*. Essa variedade de antígenos pode justificar a variação da sensibilidade e especificidade da técnica, como também devem ser considerados a concentração do antígeno empregado, o tempo e o método de incubação (Khan et al., 2014; Laroucau et al., 2016).

Quando o TFC é executado com o antígeno Ccpro, a técnica aparenta ter maior sensibilidade quando comparado com o antígeno USDA, não obstante o antígeno USDA é mais específico, em contrapartida, este apresenta títulos sempre menores que os outros antígenos (Khan et al., 2011; 2014).

A TFC é um teste de difícil execução e padronização, exige pessoal treinado e laboratório com um rigoroso sistema de qualidade e não existe método padronizado para sua execução (Khan et al., 2011), além de não ser capaz de diferenciar a infecção por *B. mallei* e *B. pseudomallei* (Elschner et al., 2019).

A técnica é mais adequada para aplicação em situações de controle e erradicação da doença e para determinar a prevalência da doença em uma região (Elschner et al., 2019; Laroucau et al., 2016; OIE, 2018). No Brasil, o teste é recomendado como triagem segundo a instrução normativa nº 6 de 16 de janeiro de 2018 (Brasil, 2018a). Porém, a Fixação do Complemento é utilizada apenas para trânsito internacional de animais de acordo com a recomendação

da OIE (2018), e no Brasil, nos demais casos, os animais devem ser submetidos ao ELISAi (Brasil 2018b).

2.6.2.2.2 Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

O Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) para o diagnóstico do mormo é utilizado para a detecção de anticorpos contra *B. mallei* (Brasil, 2018b). Esse método se mostra ideal para controle, erradicação e para determinar a prevalência da doença em populações (OIE, 2018). No Brasil, o laboratório Biovetech em parceria com a UFRPE, desenvolveu e padronizou um ELISA indireto para diagnóstico de mormo (Biovetech, 2020). A sensibilidade e especificidade da técnica é estimada entre 93-96% e 99,5%, respectivamente, sendo essa variação justificada pelo antígeno utilizado (Elschner et al., 2019).

Vários antígenos recombinantes foram desenvolvidos para aplicação no ELISA, como proteína de motilidade celular A de *Burkholderia* (BimA) (Kumar et al., 2011), proteína de secreção tipo 6 TssB (Singha et al., 2014), proteína de secreção tipo 6 TssA (Elschner et al., 2019), proteína de secreção tipo 6 Hcp1 (Elschner et al., 2019) e a proteína de choque térmico GroEL (Dohre et al., 2017). Mesmo com a diversidade de métodos e antígenos desenvolvidos, nenhum ainda é capaz de diferenciar a infecção por *B. mallei* e *B. pseudomallei* (Elschner et al., 2019; Katz et al., 2000; Kumar et al., 2011; Pal et al., 2012; Sprague et al., 2009; Teles et al., 2012).

Katz et al. (2000) utilizaram maleína e um anticorpo lipossacarídeo LPS-específico anti-*B. mallei* como anticorpo indicador no teste ELISA e provaram que este ELISA não é influenciado pela atividade anticomplementar do soro, evitando erros de diagnóstico como ocorre no TFC (Neubauer et al., 2005; Verma et al., 1990) e detecta anticorpos nos estágios iniciais da infecção (Verma, 1998).

Teles et al. (2012) padronizaram e testaram um ELISA indireto (iELISA) utilizando 300 amostras de soro equino e a maleína como antígeno obtido de animais com mormo. Ao final, o teste se mostrou promissor no diagnóstico de mormo no Brasil, pela sua praticidade e versatilidade com potencial para substituir o TFC. Laroucau et al. (2014) em parceria com o laboratório IDVet - França também padronizaram um teste ELISA indireto a partir de frações de *B.*

mallei. O ELISA é classificado e recomendado como teste de triagem de acordo com a legislação vigente no Brasil, devendo ser utilizado como teste de trânsito de animais; caso algum animal seja reagente nesta técnica, este então deve ser submetido ao exame confirmatório (Brasil, 2018b).

2.6.2.2.3 Western Blotting

Western Blotting (WB) ou *Imunoblotting* (IB) é uma técnica desenvolvida com a finalidade de detectar proteínas e foi descrita por Towbin et al. (1979). Concomitantemente, com a necessidade de testes mais sensíveis e específicos e a utilização de proteínas imunológicas como antígenos (Wareth et al., 2014), o WB prova ser uma técnica bastante sensível e específica para o diagnóstico sorológico do mormo (Elschner et al., 2011). Quando comparada ao TFC e ao ELISA utilizando proteínas recombinantes, o WB apresentou uma sensibilidade de 96,8% e especificidade de 99,4% (Elschner et al., 2019).

A preparação de lipopolissacarídeo (LPS) para o uso no diagnóstico do mormo já tinha sido utilizada anteriormente (Katz et al., 1999; 2000; Sprague et al., 2009), porém os protocolos de extração e purificação do LPS eram laboriosos e arriscados para os operadores (Anuntagool e Sirisinha, 2002; Pitt et al., 1992). Em 2011, Elschner et al. desenvolveram um WB aplicável ao diagnóstico do mormo, utilizando o LPS extraído e purificado em meios solúveis de três cepas de *B. mallei*: Borgor (Indonésia), Zargreb (Iugoslávia) e Mukteswar (Índia), tornando a técnica mais sensível e específica e excluindo os resultados falso positivos obtidos no TFC. Porém, como as demais técnicas sorológicas, o *Western Blotting* não é capaz de diferenciar infecção por *B. mallei* e *B. pseudomallei* (Elschner et al., 2011).

No Brasil, o *Western Blotting* é considerado uma técnica de diagnóstico confirmatória. Toda amostra diferente de negativo nos testes de triagem, devem ser submetidas ao teste complementar de WB, exceto se o animal esteja em uma unidade epidemiológica foco de mormo e possua sinais clínicos compatíveis da doença. Animais negativos no teste de triagem só poderão ser submetidos ao teste complementar se possuírem sinais clínicos do mormo (Brasil, 2018b).

2.6.3 Técnicas moleculares e de genotipagem

2.6.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Convencional e Tempo Real

Ao longo dos anos, vários métodos para identificação molecular de *B. mallei* e *B. pseudomallei* foram desenvolvidos, baseando-se na identificação dos genes 16s rRNA, 23s rRNA e da região 16s-23s rRNA (Bauernfeind et al., 1998; Kunakorn and Markham, 1995; Sprague and Neubauer, 2004; Tyler et al., 1995), na detecção do gene flagelina C (*fliC*) (Altukhova et al., 2007) e os genes *open reading frame* (*orf*), *orf11*, *orf13* e da região de secreção tipo III (TTS1) (Thibault et al., 2004). Entretanto, devido à alta correlação genética entre as espécies, nenhum dos genes investigados foram capazes de diferenciá-las (Schmoock et al. 2009; Tomaso et al., 2006).

Uma PCR baseada no gene de motilidade intracelular A de *Burkholderia* (BimA) foi concebida buscando as diferenças entre *B. mallei*, *B. pseudomallei* e *B. thailandensis*, tendo sucesso em identificar aproximadamente 94% das 31 amostras testadas de *B. mallei* e sem amplificação em nenhuma amostra testada das demais espécies (Ulrich et al., 2006).

Em 2006, Scholz et al. desenvolveram primers específicos para detecção de *B. mallei* em amostras clínicas e de cultivo microbiológico. A reação se baseia nas diferenças entre *B. pseudomallei* K96243 (códigos de acesso NC_006350 e NC_006351) e *B. mallei* ATCC 23344^T (códigos de acesso NC_006348 e NC_006349) na detecção do gene flagelina P (*fliP*) devido à recombinação do seu ancestral, *B. pseudomallei*. O gene em *B. mallei* foi separado em dois fragmentos de 235pb e 527bp na posição 235 e então inserido o gene IS407A, causando um afastamento de aproximadamente 60kpb dos dois fragmentos. A PCR baseia-se na amplificação de um produto de 989 pares de base (pb) da região *fliP*-IS407A de *B. mallei*. O limite de detecção desta reação, nas condições experimentais utilizadas na pesquisa é de 10 fragmentos (fg) de DNA ou o equivalente a dois genomas (OIE, 2018; Scholz et al., 2006).

Partindo do mesmo princípio, Tomaso et al. (2006) desenvolveram uma PCR em tempo real para detecção de *B. mallei* em amostras clínicas. A reação

possui capacidade de detecção da bactéria em amostras clínicas de 60 fg de DNA, equivalente a quatro genomas, nas condições experimentais utilizadas pelos autores. Esta técnica é mais rápida, possui possibilidade de automação e evita o manuseio do produto de amplificação após a reação (OIE, 2018).

2.6.3.2 Tipagem Sequencial de Multilocus (MLST)

A Tipagem Sequencial de Multilocus (MLST) é uma técnica desenvolvida para indexação de *housekeeping genes*, preferencialmente neutros para a determinação do perfil alélico dos isolados a partir da variação dentro dos genes. A MLST se estabeleceu como técnica para caracterizar os isolados e tem sido descrita para diversas espécies como *Streptococcus pneumoniae* (Enright et al., 1998), *Staphylococcus aureus* (Enright et al., 2000), *Burkholderia mallei* e *B. pseudomallei* (Godoy et al., 2003).

Godoy et al. (2003) desenvolveram um método MLST para caracterizar *B. pseudomallei* relacionadas como *B. mallei* e *B. thailandensis*, baseando-se em sete *housekeeping genes* com 81 perfis alélicos. Atualmente, existem 1776 perfis alélicos descritos para diferenciar *B. pseudomallei* (PubMLST, 2020). A técnica não se mostrou eficaz para caracterizar *B. mallei*, sendo todas as amostras analisadas pertencentes ao mesmo perfil alélico, Tipagem Sequencial 40 (ST40) devido a sua estreita relação com *B. pseudomallei*, sendo esta considerada seu clone. Contudo, Losada et al. (2010) descreveram uma cepa pertencente a um outro perfil alélico (ST100), e mesmo assim em seu estudo a conclusão foi similar a obtida por Godoy et al. (2003).

2.6.3.3 Análise do Número Variável de Repetições em Tandem (VNTR – MLVA)

A análise se baseia na identificação do polimorfismo no tamanho dos fragmentos amplificados como resultado dos eventos de inserção e deleção dentro do genoma para diferenciar espécies bacterianas geneticamente homogêneas, quando analisadas por outra técnica (De Benito et al., 2004; Van

Belkum, 1998). As regiões repetitivas (VNTR) sofrem mutações, principalmente no número de repetições e dependendo da posição no genoma, os VNTR podem modificar a expressão genética (Adair et al., 2000; Strand et al., 1993).

O MLVA se mostrou uma boa ferramenta para caracterizar isolados bacterianos, como por exemplo *Bacillus anthracis* (Keim et al., 2000), *Yersinia pestis* (Adair et al., 2000), *B. pseudomallei* (U'Ren et al., 2007) e *Chlamydomphila psittaci* (Laroucau et al., 2008).

Em 2018, Laroucau et al. utilizaram 23 marcadores MLVA dos 32 descritos por U'Ren et al. (2007) para caracterizar 76 cepas de *B. mallei*, incluindo um isolado brasileiro (Girault et al., 2017) e obtiveram um novo tipo sequencial (ST-VNTR), diferente dos já relatados, classificando o isolado em um ramo distinto, mas próximo do isolado Paquistão PRL-1 relatado por Wernery et al. (2011). Não obstante, VNTR – MLVA se mostrou ineficiente para a análise do perfil genético de *B. mallei* e para determinar correlações evolucionárias entre as cepas e o perfil filogenético preciso (Hornstra et al., 2009).

2.6.3.4 Sequenciamento Completo do Genoma – WGS

O sequenciamento completo do genoma (*Whole Genome Sequencing - WGS*) se tornou uma ferramenta importante para caracterizar microrganismos em casos de surtos, como os de *Salmonella enterica* na Dinamarca (Leekitcharoenphon et al., 2014), *Klebsiella pneumoniae* na Holanda (Zhou et al., 2016), *Burkholderia cepacia* complex nos Estados Unidos (Abdelbarya et al., 2018) e recentemente na pandemia por SARS-CoV-2 (Munnink et al., 2020).

O WGS possui um potencial discriminatório muito maior que outros métodos de tipagem molecular (eletroforese em gel de campo pulsante, polimorfismo de DNA por amplificação aleatória, MLST e MLVA) e permite a detecção de parentesco genético em isolados antes considerados apenas como clones (Girault et al., 2018; Laroucau et al., 2018; Lu et al., 2016). Uma reconstrução filogenética pode diferenciar isolados em um surto que tem relação ou não com o evento e ainda determinar a relação com o ambiente e as amostras clínicas obtidas (Abdelbarya et al., 2018; Silva et al., 2009). Porém, a falta de

genomas de referência pode ser um desafio para aplicação dessa técnica, sendo um fator limitante na análise dos dados (Abdelbarya et al., 2018; Girault et al., 2018; Laroucau et al., 2018).

Entre as novas tecnologias de sequenciamento disponíveis estão o método Illumina® (2ª geração de WGS) e o método MinION (3ª geração de WGS) (tecnologia Roche® Nanopore). O método Illumina® baseia-se no sequenciamento por síntese com o uso de nucleotídeos com marcadores fluorescentes para sequenciar grandes números de pequenos fragmentos, garantindo maior confiabilidade da sequência dos fragmentos (McRobb et al., 2015). O MinION identifica as bases do DNA, medindo as mudanças na condutividade elétrica gerada à medida que os filamentos de DNA passam por um poro biológico (Lu et al., 2016).

A justaposição de dados de sequenciamento obtidos pela Illumina® (maior confiabilidade, porém maior fracionamento do produto sequenciado) e MinION (elevada taxa de erro, mas garantindo a leitura de grandes fragmentos sequenciados) permite agora ter sequências completas e confiáveis dos genomas estudados (Cárdenas et al., 2018; Girault et al., 2017; 2018; Laroucau et al., 2018; Losada et al., 2010; Lu et al., 2016).

2.6.3.5 PCR *High-Resolution Melting Single - Nucleotide Polymorphisms* (PCR HRM –SNP)

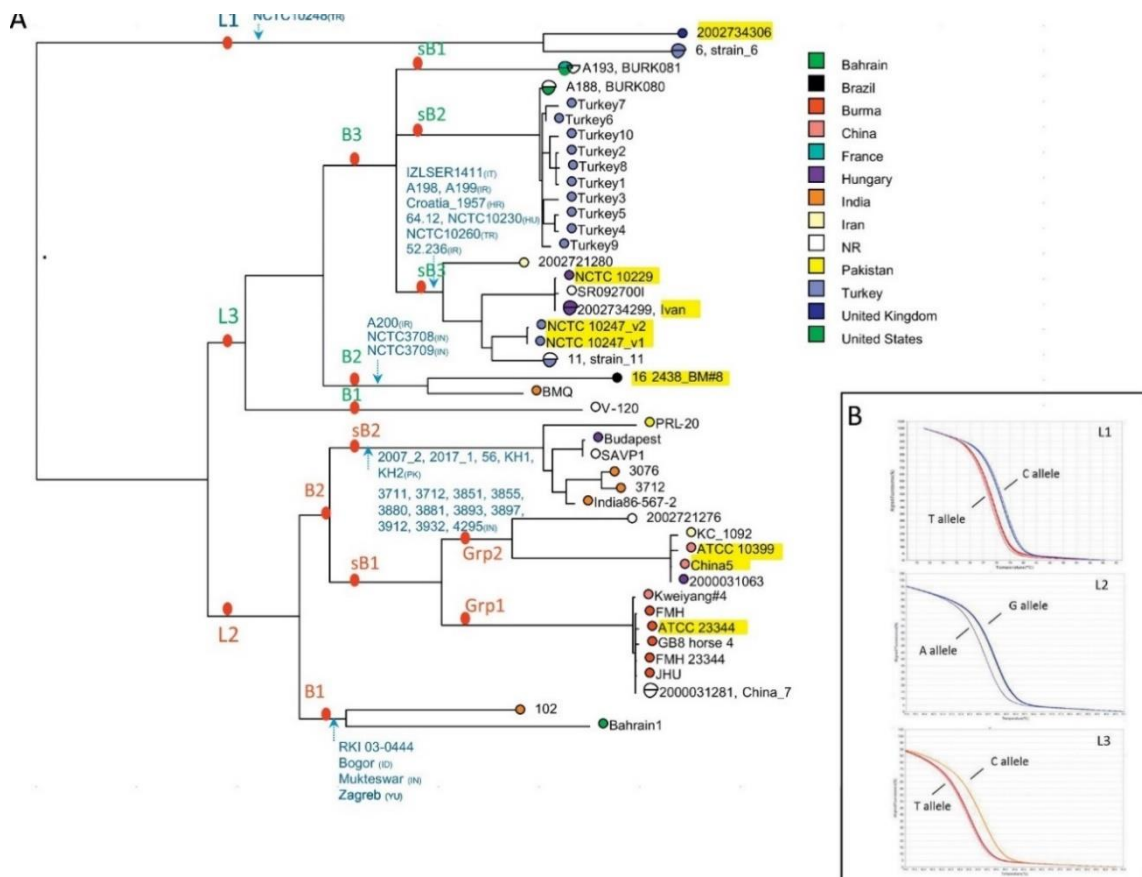
A partir da sequência completa do genoma foi possível identificar polimorfismos de nucleotídeo único (SNP), uma variação em apenas uma base nitrogenada em uma posição na sequência do DNA. Para ser considerado um SNP, o alelo modificado deve existir com uma frequência superior a 1%. Em princípio, a posição SNP pode ser ocupada pelos quatro nucleotídeos possíveis, no entanto, normalmente os SNP são bialélicos (Vignal et al., 2002).

Conhecendo as variações nos nucleotídeos e sua localização no genoma, foi possível desenvolver *primers* utilizados na PCR *High Resolution Melting* (HRM), uma técnica de genotipagem, com menor custo, rápida e de fácil execução quando comparada com o WSG (Laroucau et al., 2018). A partir das

sequências completas do genoma de isolados de *B. mallei*, Laroucau et al. (2018) construíram uma árvore filogenética de abrangência mínima com três linhagens distintas, a partir da variação entre os nucleotídeos em uma mesma posição no genoma. Posteriormente, Girault et al. (2018) desenvolveram uma PCR HRM com base em 15 SNPs em diferentes posições no genoma a partir das linhagens de *B. mallei* anteriormente descritas, obtendo filiais, sub-filiais e grupos (Figura 8), expandindo a árvore filogenética inicialmente construída por Laroucau et al. (2018).

Esta técnica é capaz de classificar os isolados em três linhagens (L1, L2 e L3), cinco ramos (L2B1, L2B2, L3B1, L3B2 e L3B3) e 7 sub-ramos e grupos (Girault et al., 2018). Atualmente, apenas uma cepa brasileira de *B. mallei*, denominada 16-2438_BM #8, isolada em 2016 foi caracterizada pela PCR-HRM. Esse isolado pertence ao genótipo L3B2 e está colocalizado próximo a uma linhagem indiana colocalizada (Girault et al., 2018; Laroucau et al., 2018).

Figura 8. Árvore filogenética com base em 15 SNPs a partir de 45 genomas de *B. mallei*.



Fonte: Girault et al. (2018).

3. Objetivos

3.1 Geral

- Caracterizar geneticamente isolados de *Burkholderia mallei* obtidos de equídeos com mormo nos estados de Pernambuco e Alagoas.

3.2 Específicos

- Realizar isolamento bacteriano de amostras biológicas coletadas de equídeos com mormo nos estados de Pernambuco e Alagoas.
- Realizar os testes de PCR convencional e *Real Time* para confirmação dos isolados de *B. mallei* de equídeos com mormo.
- Caracterizar molecularmente as cepas de *B. mallei* por WGS e PCR High Resolution Melting.

4. Referências

Abdelbarya, M.M.H.; Senna, L.; Moulina, E.; Prod'homb, G.; Croxattob, A.; Greubb, G.; Blanc, D.S. Evaluating the use of whole-genome sequencing for outbreak investigations in the lack of closely related reference genome. **Infect. Genet. Evol.** v.59, p.1-6, 2018.

Adair, D.M.; Worsham, P.L.; Hill, K.K.; Klevytska, A.M.; Jackson, P.J.; Friedlander, A.M.; Keim, P. Diversity in a Variable-Number Tandem Repeat from *Yersinia pestis*. **J. Clin. Microbiol.** v.38, p.1516-1519, 2000.

Al-Ani, F.K.; Ali, A.H.; Banna, H.B. Glanders in horses: histopathological and electron microscopic studies. **Pakistan. Vet. J.** v.12, p.1-3, 1992.

Al-Ani, F.K.; Al-Rawsashdeh, O.F.; Ali, H.A.; Hassan, F.K. Glanders in horses: clinical, biochemical and serological studies in Iraq. **Vet. Arhiv.** v.68, p. 155-162, 1998.

Al-Ani, F.K.; Roberson, J. Glanders in horses: a review of the literature. **Vet. Arski.** v.77(3), p.203-2018, 2007.

Alibasoglu, M.; Yesildere, T.; Calislar, T.; Inal, T.; Calsikan, U. Malleus outbreak in lions in the Istanbul zoo. **Berl. Munch. Tierarztl. H. Wochenschr.** v.99, p.57-63, 1986.

Alibek, K.; Handelman, S. **Biohazard: The Chilling True Story of the Largest Covert Biological Weapons Program in the World.** New York, NY: Random House; 1999.

Allen, H. The diagnosis of glanders. **J. Royal. Army. Vet. Corps.** v.1, p.241–245, 1929.

Altukhova, V.V.; Antonov, V.A.; Tkachenko, O.V.; Zinchenko, O.V.; Zamaraev, V.S.; Plekhanova, N.G.; Ilyukhin, V. I.; Torfimov, D.Y. Use of the polymerase chain reaction to detect the glanders and melioidosis pathogens in experimental infection. **Mol. Genet. Microbiol. Virol.** v.22, p.112–119, 2007.

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

Bauernfeind, A.; Roller, C.; Meyer, D.; Jungwirth, R.; Schneider, I. Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **J. Clin. Microbiol.** v.28, p.495–503, 1998.

Bierer, B.W. **American Veterinary History**. Baltimore: Privately printed, 1940, p.6–8.

Biovetech One Health. <<https://www.biovetech.com/>> acesso em: 12/05/2020.

Blancou, J. Les anciennes methods de surveillance et de controle de la morve. **Bull. Soco Vét. PraL de France**, v.78(1), p.35-55, 1994.

Blood, D.C.; Radostits, O.M. Diseases caused by bacteria. In____. **Veterinary Medicine**. 7^aed. London, England: Balliere Tindall, 1989, p.733–735.

Brasil, Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Revisão do Estudo do Complexo Agronegócio do Caval**. Brasília – DF, p.1-56, 2016.

Brasil, Ministérios da Saude. Portaria número 2349, de 14 de setembro de 2014. Aprova a Classificação de Risco dos Agentes Biológicos elaborada em 2017, pela Comissão de Biossegurança em Saúde (CBS), do Ministério da Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 22 de set. de 2017, Seção 1, p.51.

Brasil, Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa número 6 de 16 de janeiro de 2018. Ficam aprovadas as Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), na forma desta Instrução Normativa. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 17 de jan. de 2018, Seção 1, p.3. (a)

Brasil, Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria número 35, de 17 de abril de 2018. Definição dos testes laboratoriais para o diagnóstico do mormo. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 de abr. de 2018, Seção 1, p.6. (b)

Buchanan, R.E. Studies in the nomenclature and classification of the bacteria. V. subgroups and genera of the Bacteriaceae. **J. Bacteriol.** v.3, p.27-61, 1918.

Cárdenas, N.C.; Galvis, J.O.A.; Farinati, A.A.; Grisi-Filho, J.H.H.; Diehl, G.N.; Machado, G. *Burkholderia mallei*: The dynamics of networks and disease transmission. **Transbound. Emerg. Dis.** v.66, p.715-728, 2018.

Chantratita, N.; Meumann, E.; Thanwisai, A.; Limmathurotsakul, D.; Wuthiekanun, V. et al. Loop-mediated isothermal amplification method targeting the TTS1 gene cluster for detection of *Burkholderia pseudomallei* and diagnosis of melioidosis. **J. Clin. Microbiol.** v.46, p.568–573, 2008.

Cravitz, L.; Miller, W.R. Immunological studies with *Malleomyces mallei* and *Malleomyces pseudomallei*. II. Agglutination and complement fixation tests in man and laboratory animals. **J. Infect. Dis.** v.86, p.52-62, 1950.

De Benito, I. Cano ME1, Agüero J2,1, Lobo JMG2. A polymorphic tandem repeat potentially useful for typing in the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. **J. Gen. Microbiol.** v.150, p. 199-204, 2004.

Derbyshire, J.B. The eradication of glanders in Canada. **Can. Vet. J.**, v.43(9), p.722–726, 2002.

Deshawer, D.; Waag, D.M.; Fritz, D.L.; Woods, D.E. Identification of *Burkholderia mallei* polysaccharide gene cluster by subtractive hybridization and demonstration that the encoded capsule is an essential virulence determinant. **Microb. Pathog.** v.30, p.253-269, 2001.

Diniz, M.C.; Farias, K.M.; Pacheco, A.C.L.P.; Viana, D.A.; Araujo-Filho, R.; Lima, A.P.S.; Costa, R.B.; Oliveira, D.M. Análise Genômica de *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*: dois patógenos de primeira grandeza e de genomas surpreendentemente complexos. **Ver. Bras. Hig. San. Anim.** v.2(1), p.1-34, 2008.

Dohre, S.K.; Kamthan, A.; Singh, S.; Alam, S.I.; Kumar, S. Identification of a new diagnostic antigen for glanders using immunoproteome analysis. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.** v.53, p.26–32, 2017.

Dubarry, N.; Pasta, F.; Lane, D. ParABS Systems of the Four Replicons of *Burkholderia cenocepacia*: New Chromosome Centromeres Confer Partition Specificity. **J. Bacteriol.** v.188(4), p.1489-1496, 2006.

Egan, E.S.; Fogel, M.A.; Waldor, M.K. Divided genomes: negotiating the cell cycle in prokaryotes with multiple chromosomes. **Mol. Microbiol.**, v.56, p.1129-1138, 2005.

Elschner, M.; Klaus, C.; Liebler-Tenorio, E.; Schmoock, G.; Wohlsein, P.; Tinschmann, O.; Lange, E.; Kaden, V.; Klopffleisch, R.; Melzer, F.; Rassbach, A.; Neubauer, H. *Burkholderia mallei* Infection in a Horse Imported from Brazil. **Equine Vet. Educ.** v.21. p.147–150, 2009.

Elschner, M.C.; Scholz, H.C.; Melzer, F.; Saqib, M.; Marten, P.; Rassbach, A.; Dietzsch, M.; Schmoock, G.; Santana, V.L.de.A; Sousa, M.M.A.; Wernery, R.; Wernery, U. Neubauer, H. Use of Western Blot technique for the serodiagnosis of glanders. **BMC Vet. Resea.** v.7(4), p.1-6, 2011.

Elschner, M.C.; Laroucau, K.; Singha, H.; Tripathi, B.N.; Saqib, M.; Gardner, I.; Saini, S.; Kumar, S.; El-Adawy, H.; Melzer, F.; Khan, I.; Malik, P.; Sauter-Louis, C.; Neubauer, H. Evaluation of the comparative accuracy of the complement fixation test, Western blot and five enzyme-linked immunosorbent assays for serodiagnosis of glanders. **PLoS ONE**. v.14(4), 2019.

Enright, M.C.; Spratt, B.G. A multilocus sequence typing scheme for *Streptococcus pneumoniae*: identification of clones associated with serious invasive disease. **Microbiol.** v.144, p.3049–3060, 1998.

Enright, M.C.; Day, N.P.J.; Davies, C.E.; Peacock, S.J.; Spratt, B.G. Multilocus sequence typing for the characterization of methicillin resistant (MRSA) and methicillin susceptible (MSSA) clones of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.** v.38, p.1008–1015, 2000.

Fonseca-Rodriguez, O.; Pinheiro Junior, J.W.; Mota, R.A. Spatiotemporal Analysis of Glanders in Brazil. **J. Equine Vet. Sci.** v.78, p. 14-19, 2019.

Fritz, D.L.; Vogel, P.; Brown, D.R.; Deshazer, D.; Waag, D.M. Mouse model of sublethal and lethal intraperitoneal glanders (*Burkholderia mallei*). **Vet. Pathol.** v.37, p.626-636, 2000.

Gangulee, P.C.; Sen, G.P.; Sharma, G.L. Serological diagnosis of glanders by hemagglutination test. **Indian Vet. J.** v.43, p.386-391, 1966.

Gee, J.E.; Sacchi, C.T.; Glass, M.B.; De, B.K.; Weyant, R.S.; Levett, P.N.; Whiney, A.M.; Hoffmaster, A.R.; Popovic, T. Use of 16SrRNA gene sequencing for rapid identification and differentiation of *Burkholderia pseudomallei* and *B. mallei*. **J. Clin. Microbiol.** v.41, p.4647–4654, 2003.

Ghori, M.T.; Khan, M.S.; Khan, J.A.; Rabbani, M.; Shabbir, M.Z.; Chaudhry, H.R.; Ali, M.A.; Muhammad, J.; Elschner, M.C; Jayarao, B.M. Seroprevalence and risk factors of glanders in working equines—Findings of a cross-sectional study in Punjab province of Pakistan. **Acta trop.** v.176, p.134–139, 2017.

Girault, G.; Woudstra, C.; Martin, B.; Vorimore, F.; Santana, V. L. A.; Fach, P.; Madani, N.; Laroucau, K. First draft genome for a *Burkholderia mallei* isolated originating from a glanderous mule from Brazil. **Genome Annunc.** v.5, n.28, 2017.

Girault, G.; Wattiau, P.; Saqib, M.; Martin, B.; Vorimore, F.; Singha, H.; Engelsma, M.; Roest, H.J.; Spicic, S.; Grunow, R.; Vicari, N.; De Keersmaecker, S.C.J.; Roosens, N.H.C.; Fabbi, M.; Tripathi, B.N.; Zientara, S.; Madani, N.; Laroucau, K. High-resolution melting PCR analysis for rapid genotyping of *Burkholderia mallei*. **Infec. Genet. Evol.** v.63, p.1-4, 2018.

Glass, M.B.; Beesley, C.A.; Wilkins, P.P.; Hoffmaster, A.R. Comparison of four selective media for the isolation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.80(6), p.1023–1028, 2009.

Godoy, D.; Randle, G.; Simpson, A.J.; Aanensen, D.M.; Pitt, T.L.; Kinoshita, R.; Spratt, B.G. Multilocus sequence typing and evolutionary relationships amongs the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **J. Clin. Microbiol.** v.41, p.2068-2079, 2003.

Hagebock, J.M.; Schlater, L.K.; Frerichs, W.M.; Olson, D.P. Serologic responses to the mallein test for glanders in solipeds. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.5, p.97-99, 1993.

Henning, M. W. Glanders, Farcy, Dries, Malleus. In____. **Animal diseases in South Africa, being an account of the infectious diseases of domestic animals.** South Africa. Central News Agency. 1956. p.159-176.

Hirsh, D.C.; Zee, Y.C. **Microbiologia Veterinária.** 1ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 446p.

Holden, M.T.G.; Titball, R.W.; Peacock, S.J.; Cerdeño-Tárraga, A.M.; Atkins, T.; Crossman, L.C.; Pitt, T.; Churcher, C.; Mungall, K.; Bentley, S.D.; Sebahia, M.;

Thomson, N.R.; Bason, N.; Beacham, I.R.; Brooks, K.; Brown, K.A. Brown, N.F.; Challis, G.L.; Cherevach, I.; Chillingworth, T.; Cronin, A.; Crossett, B.; Davis, P.; DeShazer, D.; Feltwell, T.; Fraser, A.; Hance, Z.; Hauser, H.; Holroyd, S.; Jagels, K.; Keith, K.E.; Maddison, M.; Moule, S.; Price, C.; Quail, M.A.; Rabbinowitsch, E.; Rutherford, K.; Sanders, M.; Simmonds, M.; Songsivilai, S.; Stevens, K.; Tumapa, S.; Vesaratchavest, M.; Whitehead, S.; Yeats, C.; Barrell, B.G.; Oyston, P.C.; Parkhill, J. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.101, p.14240–14245, 2004.

Hornstra, H.; Pearson, T.; Georgia, S.; Liguori, A.; Dale, J.; Price, E.; O'Neill, M.; Deshazer, D.; Muhammad, G.; Saqib, M.; Naureen, A.; Keim, P. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. **Emerg. Infect. Dis.** v.15, p.2036–2039, 2009.

IBGE. Censo Agropecuário 2019.
<https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html> Acesso em: 10/11/2019

Katz, J.B.; Chieves; Hennager, S.G.; Nicholson, J.M.; Fisher, T.A; Byers, P.E. Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine and glanders using an arrayed immunoblotting method. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.11, p.292–294, 1999.

Katz, J.; Dewald, R.; Nicholson, J. Procedurally similar competitive immunoassay systems for the serodiagnosis of *Babesia equi*, *Babesia caballi*, *Trypanosoma equiperdum* and *Burkholderia mallei* infection in horses. **J. Vet. Diagn. Invest.** v.12, p.46-50, 2000.

Keim, P.; Price, L.B.; Klevytska, A.M.; Smith, K.L.; Schupp, J.M.; Okinaka, R.; Jackson, P.J.; Hugh-Jones, M.E. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals genetic relationships within *Bacillus anthracis*. **J. Bacteriol.** v.182, p.2928-2936, 2000.

Khan, I.; Wieler, L.H.; Melzer, F.; Gwida, M.; Santana, V.L.; de Souza, M.M.; Saqib, M.; Elschner, M.C.; Neubauer, H. Comparative evaluation of three

commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. **Vet. Rec.** v.169(19), p.495, 2011.

Khan, I.; Wieler, L.H.; Melzer, F.; Elschner, M.C.; Muhammad, G.; Ali, S.; et al. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. **Transbound Emerg. Dis.** v.60, p.204-221, 2012.

Khan, I.; Wieler, L.H.; Saqib, M.; Melzer, F.; Santana, V.L.; Neubauer, H.; Elschner, M.C. Effect of incubation temperature on the diagnostic sensitivity of the glanders complement fixation test. **Revue. Scientifique et Technique.** v.33, p.869–875, 2014.

Kinoshita, Y.; Cloutier, A.K.; Rosaz, D.A.; Khan, M.S.R.; Niwa, H.; Uchida-Fujii, E.; Katayama, Y.; Tunyok, A. A novel selective medium for the isolation of *Burkholderia mallei* from equine specimens. **BMC Veterinary Research.** v.15, p.133, 2019.

Knowles, R. C.; Moulton, W. M. Exotic diseases. In: Mansmann, R. A., McAleister, E. S. **Equine medicine and surgery.** Santa Barbara: AVP, 1982. p.359-360.

Kolsto, A.B. Time for a fresh look at the bacterial chromosome. **Trends. Microbiol.** v.7, p.223-226, 1999.

Kovalev, G.K. Glanders (Review). **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.** v.48, p.63–70, 1971.

Kumar, S.; Malik, P.; Verma, S.K.; Pal, V.; Gautam, V.; Mukhopadhyay, C.; Rai, G.P. Use of a Recombinant *Burkholderia* Intracellular Motility A Protein for Immunodiagnosis of Glanders. **Clin. Vaccine Immunol.** v.18(9), p.1456–1461, 2011.

Kunakorn, M.; Markham, R.B. Clinically practical seminested PCR for *Burkholderia pseudomallei* with and without solution hybridization. **J. Clin. Microbiol.** v.33, p.2131–2135, 1995.

Langenegger, J.; Döbereiner, J.; Lima, A.C. Foco de mormo (*Malleus*) na região de Campos, estado do Rio de Janeiro. **Arq. Inst. Biol. Animal.** v.3(91), p.108, 1960.

Laroucau, K.; Thierry, S.; Vorimore, F.; Blanco, K.; Kaleta, E.; Hoop, R.; Magnino, S.; Vanrompay, D.; Sachse, K.; Myers, G.S.; Bavoil, P.M.; Vergnaud, G.; Pourcel, C. High resolution typing of *Chlamydophila psittaci* by multilocus VNTR analysis (MLVA). **Infection, Genetics and Evolution.** v.8, p.171-181, 2008.

Laroucau, K.; Bertin, C.; Roche, M.; Donnet, F.; Colaneri, C.; Falcão, M.D.; Madani, N. et al. **A new ELISA assay for glanders diagnosis.** III Pan-American Congress of Zoonoses, La Plata, Argentine, 2014.

Laroucau, K.; Colaneri, C.; Jaÿ, M.; Corde, Y.; Drapeau, A.; Durand, B.; Zientara, S.; Beck, C.; et al. Interlaboratory ring trial to evaluate CFT proficiency of European laboratories for diagnosis of glanders in equids. **Vet. Rec.** v.178(25), p.632, 2016.

Laroucau, K.; Santana, V.L.A.; Girault, G.; Martin, B.; Miranda da Silveira, P.P.; Brasil Machado, M.; Joseph, M.; Wernery, R.; Wernery, U; Zientara, S.; Madani, N. First molecular characterisation of a Brazilian *Burkholderia mallei* strain isolated from a mule in 2016. **Infect. Genet. Evolut.** v.57, p.117-120, 2018.

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.** v.43, p.413 - 417, 2005.

Leekitcharoenphon, P.; Nielsen, E.M.; Kaas, R.S.; Lund, O.; Aarestrup, F.M. Evaluation of whole genome sequencing for outbreak detection of *Salmonella enterica*. **PLoS One.** v.9(2), 2014.

Loeffler, F. The etiology of glanders. **Arb. Kaiserl. Gesundheits.** v.1, p.141–198, 1886.

Losada, L.; Ronning, C.M.; DeShazer, D.; Woods, D.; Fedorova, N.; Kim, H.S.; Shabalina, S.A.; Pearson, T.R.; Brinkac, L.; Tan, P.; Nandi, T.; Crabtree, J.; Badger, J.; Beckstrom-Sternberg, S.; Saqib, M.; Schutzer, S.E.; Keim, P.; Nierman, W.C. Continuing evolution of *Burkholderia mallei* through genome reduction and large-scale rearrangements. **Genome Biol. Evol.** v.22(2), p.102-16, 2010.

Lu, H.; Giordano, F.; Ning, Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. **Genom. Proteom. Bioinf.** v.14, p.265-279, 2016.

Mahenthiralingam, E.; Urban, T.A.; Goldberg, J.B. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. **Nat. Rev. Microbiol.**, v.3, p.144-156, 2005.

Malik, P.; Singha, H.; Goyal, S.K.; Khurana, S.K.; Tripathi, B.N.; Dutt, A.; Singh, D.; Sharma, N.; Jain, S. Incidence of *Burkholderia mallei* infection among indigenous equines in India. **Vet. Rec. Open.** v.2(2), 2015.

McRobb, E.; Sarovich, D.S.; Price, E.P.; Kaestli, M.; Mayo, M.; Keim, P.; Currie, B.J. Tracing melioidosis back to the source: using whole-genome sequencing to investigate an outbreak originating from a contaminated domestic water supply. **J. Clin. Microbiol.** v.53, p.1144–1148, 2015.

Mohammad, T.J.; Sawa, M.I.; Yousif, Y.A. Orchitis in Arab stallion due to *Pseudomonas mallei*. **Indian J. Vet. Med.** v.9, p.15-17, 1989.

Mota, R.A.; Brito, M.F.; Castro, F.J.C.; Massa, M. Mormo em equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas. **Pesqui. Vet. Bras.** v.20(4), p.155–159, 2000.

Mota, R.A.; Farias, A.F.A.; Silva, L.B.G.; Rabelo, S.S.A.; Soares, P.C.; Cunha, A.P. Influência de bactérias isoladas das vias aéreas superiores no diagnóstico microbiológico do mormo em eqüídeos. **Vet. Not.** v.10(1), p.41-46, 2004.

Mota, R.A.; Silva, L.B.G.; Silva, K.P.C.; Silva Neto, J.B.; Cunha, A.P.; Nascimento Sobrinho, E.S. Caracterización bioquímica y perfil de sensibilidad antimicrobiana in vitro de muestras de *Burkholderia mallei* aisladas de équidos de la región nordeste de Brasil. **Arqs Inst. Biológico, São Paulo**. v.72(1), p.7-11, 2005.

Mota, R.A. Aspectos etiopatológicos, epidemiológicos e Clínicos do Mormo. **Vet. Zootec**. v.13(2), p.117-124, 2006.

Mota, R.A.; da Fonseca Oliveira, A.A.; da Silva, A.M.; Junior, J.W.; da Silva, L.B.; de Farias Brito, M., et al. Glanders in donkeys (*Equus Asinus*) in the state of pernambuco, Brazil: A case report. **Braz. J. Microbiol.**; v.41(1) p.146–9, 2010.

Mota, R.A.; Ribeiro, M.G. Mormo. In. Megid, J.; Ribeiro, M.G.; Paes, A.C. **Doenças infecciosas em animais de produção e de companhia**. 1ª Ed. Editora Roca, p. 423-435, 2016.

Munnink, B.B.O.; Nieuwenhuijse, D.F.; Stein, M. et al. Rapid SARS-CoV-2 whole-genome sequencing and analysis for informed public health decision-making in the Netherlands. **Nat Med**. V.26, p.1405–1410, 2020.

NCBI, **National Center for Biological Information**, 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=13373&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock&mod=1&log_op=modifier_toggle#modif> Acesso em: 10/12/2019.

Neubauer, H.; Finke, E.J.; Meyer, H. Human glanders. **Inter. Rev. Arm. Forc. Med. Servi**. v.70, p.258–265, 1997.

Neubauer, H.; Sprague, L.D.; Zacharia, R.; Tomaso, H.; Al Dahouk, S.; Wernery, R.; Wernery, U.; Scholz, H.C. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. **J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health**. v.52, p.201–205, 2005.

Nierman, W.C.; DeShazer, D.; Kim, H.S.; Tettelin, H.; Nelson, K.E. ; Feldblyum, T.; Ulrich, R.L.; Ronning, C.M.; Brinkac, L.M.; Daugherty, S.C.; Davidsen, T.D.; Deboy, R.T.; Dimitrov, G.; Dodson, R.J.; Durkin, A.S.; Gwinn, M.L.; Haft, D.H.; Khouri, H.; Kolonay, J.F.; Madupu, R.; Mohammoud, Y.; Nelson, W.C.; Radune, D.; Romero, C.M.; Sarria, S.; Selengut, J.; Shamblin, C.; Sullivan, S.A.; White, O.; Yu, Y.; Zafar, N.; Zhou, L.; Fraser, C.M. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.101, p.14246–14251, 2004.

Novak, R.T.; Glass, M.B.; Gee, J.E.; Gal, D.; Mayo, M.J.; Currie, B.J.; Wilkins, P.P. Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting the type III secretion system of *Burkholderia pseudomallei*. **J. Clin. Microbiol.** v.44, p.85–90, 2006.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **HANDISTATUS II**. 2016. <http://web.oie.int/hs2/sit_pays_mald_pl.asp?c_pays=26&c_mald=67> Acesso em 12/02/2020.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. Capítulo 2.5.11. Glanders and Melioidose. **OIE Terrestrial Manual**, 2018.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface, Disease distribution maps**. 2021a. <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>. Acesso em 25/03/21.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface, Disease outbreak maps**. 2021b. <https://wahis.oie.int/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>. Acesso em 25/03/21.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. **World Animal Health Information Database (WAHIS) Interface, Detailed country disease incidence**. 2020. <

https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/statusdetail/index/newlang/en?header_disease_type_hidden=0&header_disease_id_hidden=0&header_selected_disease_name_hidden=0&header_disease_type=0&header_disease_id_terrestrial=63&header_disease_id_aquatic=-999&header_selected_start_month=1&header_selected_start_year=2005&header_selected_end_month=12&header_selected_end_year=2020&header_submit2=OK> Acesso em 12/02/2020.

Pal, V.; Kumar, S.; Malik, P.; Rai, G.P. Evaluation of recombinant proteins of *Burkholderia mallei* for serodiagnosis of glanders. **Clin. Vaccina Immunol.** v.19, p.1193–1198, 2012.

Pimentel, W. História e organização do serviço veterinário do exército. **Revta. Milit. Med. Vet.** v.1(4) p.283–322, 1938.

Pitt, T.L.; Aucken, H.; Dance, D.A. Homogeneity of lipopolysaccharide antigens in *Pseudomonas pseudomallei*. **J. Infect.** v.25, p.139-146, 1992.

Popov, S.F.; Kurilov, V.; Iakovlev, A.T. *Pseudomonas pseudomallei* and *Pseudomonas mallei* – capsule-forming bacteria. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.** v.5, p.32-36, 1995.

Popov, S.F.; Tikhonov, N.G.; Piven, N.N.; Kurilov, V.; Dement'ev, I.P. The role of capsule formation in *Burkholderia mallei* for its persistence *in vivo*. **Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.** v.3, p.73-75, 2000.

Pribram, E. Klassifikation der Schizomyceten. **F. Deuticke, Leipzig.** p.1-143, 1933.

Pritchard, D.G. Glanders. **Eq. Vet. Educ.** v.7, p.29, 1995.

PubMLST, *Burkholderia pseudomallei* MLST Databases, 2020. <<https://pubmlst.org/bpseudomallei/>>. Acesso em 28/01/2020.

Pumpuang, A.; Chantratita, N.; Wikraiphath, C.; Saiprom, N.; Day, N.P.; Peacock, S.J.; Wuthiekanun, V. Survival of *Burkholderia pseudomallei* in distilled water for 16 years. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.105, p.598–600, 2011.

Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Blood, D.C.; Hinchcliff, K.W. **Clin. Vet.** 9^{ed}. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 1737p.

Redfearn, M.S.; Palleroni, N.J.; Stainer, R.Y. A comparative study of *Pseudomonas pseudomallei* and *Bacillus mallei*. **J. Gen. Microbiol.** v.43, p.293-313, 1966.

Regis, E. **The Biology of Doom.** New York, NY: Henry Holt and Company; 1999.

Rutherford, J.G. **Special Report on Glanders (from the Veterinary Director-General and Livestock Commissioner).** Ottawa, Canada: Canada Department of Agriculture, Health of Animals Branch, 1906.

Santos, F.L.; Kerber, C.E.; Manso Filho, H.C.; Lyra, T.M.P.; Souza, J.C.A.; Marques, S.R.; Silva, H.V. Mormo / Glanders. **Rev. Educ. contin. CRMV-SP, São Paulo**, v.4 (3), p.20-30, 2001.

Schadewaldt, H. Discovery of glanders bacillus. **Dtsch. Med. Wochenschr.** v.100, p.2292–2295, 1975.

Schlater, L.K. **Glanders.** In: Robinson, N.E. Currenty therapy in equine medicine. Philadelphia: Saunders. v.3, p.761-762, 1992.

Schmoock, G.; Ehricht, R.; Melzer, F.; Rassbach, A.; Scholz, H.C.; Neubauer, H.; Sachse, K.; Mota, R.A.; Saqib, M.; Elschner, M. DNA microarray-based detection and identification of *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia* spp. **Mol. Cell. Probe.** v.23, p.178-187, 2009.

Scholz, H.C.; Joseph, M.; Tomaso, H.; al Dahouk, S.; Witte, A.; Kinne, J.; Hagen, R.M.; Wernery, R.; Wernery, U.; Neubauer, H. 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. **Diag. Infect. Dis.** v.54(4), p.241–247, 2006.

Sharrer, G.Y. The great glanders epizootic USA, In: **A Civil Warlegacy. Agric. History.** v.69, p.79-97, 1995.

Silva, K.P.C.; Mota, R.A.; Cunha, A.P.; Silva, L.B.G.; Leal, N.C.; Cavalcante, Y.V.N.; Teles, J.A.A.; Pereira, M.C.C.; Freitas, N.S. Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** v.29(5), p.439-444, 2009.

Silva, K.P.C.; Takaki, G.M.C.; Silva, L.B.G.; Saukas, T.N.; Santos, A.S.; Mota, R.A. Assessment of the effectiveness of the PPD-mallein produced in Brazil for diagnosing glanders in mules. **Braz. J. Microbiol.** v.44(1), p.179-181, 2013.

Singha, H.; Malik, P.; Goyal, S.K.; Khurana, S.K.; Mukhopadhyay, C.; Eshwara, V.K.; Singh, R.K. Optimization and validation of indirect ELISA using truncated TssB protein for the serodiagnosis of glanders amongst equines. **Sci. World J.** v.2014, p.6, 2014.

Sprague, L.D.; Neubauer, H. A review on animal melioidosis with special respect to epizootiology, clinical presentation and diagnostics. **J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health**, v.51, p.305–320, 2004.

Sprague, L.D.; Zachariah, R.; Neubauer, H.; Wernery, R.; Joseph, M.; Scholz, H.C.; Wernery, U. Prevalence-dependent use of serological tests for diagnosing glanders in horses. **BMC Vet. Res.** v.5(32), 2009.

Steel, K.J.; Cowan, S.T. Le rattachement de *Bacterium antratum*, *Moraxella lwoffii*, *Bacillus mallei* et *Haemophilus parapertussis* au genre *Acinetobacter* Brisou et Prevot. **Ann. Inst. Pasteur, Paris.** v.106, p.479-483, 1964.

Steele, J.H. Glanders. In: Steele, J.H. **CRC Handbook Series in Zoonoses**. Boca Raton, Fla: CRC Press, 1979, p.339–362.

Strand, S.T.A.; Prolla, T.A.; Liskay, R.M.; Petes, T.D. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature**. v.365, p.274-276, 1993.

Supaprom, C.; Wang, D.; Leelayuwat, C.; Thaewpia, W.; Susaengrat, W. et al. Development of real-time PCR assays and evaluation of their potential use for rapid detection of *Burkholderia pseudomallei* in clinical blood specimens. **J. Clin. Microbiol.** v.45, p.2894–2901, 2007.

Teles, J.A.A.; Campos, A.C.; Silva, K.P.C.; Santos, A.S.; Santana, V.L.de A.; Castro, R.S.; Mota, R.A. Desenvolvimento e Avaliação de um teste ELISA indireto para o Diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. **Pesq. Vet. Bras.** v.32 (9), p.838-842, 2012.

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.** v.42, p.5871–5874, 2004.

Thompson, L. The systematic relationship of Actinobacillus. **J. Bact.** v.26, p.221-227, 1933.

Tomaso, H.; Scholz, H.C.; Al Dahouk, S.; Eickhoff, M.; Treu, T.M. et al. Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting *fljP* for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. **Clin. Chem.** v.52, p.307–310, 2006.

Towbin, H.; Staehelin, T.; Gordon, J. Eletrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.76, p.4350-4354, 1979.

Tyler, S.D.; Strathdee, C.A.; Rozee, K.R. Oligonucleotide primers designed to differentiate pathogenic pseudomonads on the basis of the sequencing of genes coding for 16S–23S rRNA internal transcribed spacer. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.** v.2, p.448–453, 1995.

U'Ren, J.M.; Schupp, J.M.; Pearson, T.; Hornstra, H.; Friedman, C.L.; Smith, K.L. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. **BMC Microbiol.** v.7(23), 2007.

U'Ren, J.M.; Van Ert, M.N.; Schupp, J.M.; Easterday, W.R.; Simonson, T.S.; Okinaka, R.T.; Pearson, T.; Keim, P. Use of real-time PCR TaqMan assay for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. **J. Clin. Microbiol.** v.43, p.5771–5774, 2005.

Udall, D.H. Glanders. In____. **The practice veterinary medicine.** New York. [s.n.], p.579-587, 1943.

Ulrich, R.L.; Ulrich, M.P.; Schell, M.A.; Kim, H.S.; DeShazer, D. Development of a polymerase chain reaction assay for the specific identification of *Burkholderia mallei* and differentiation from *Burkholderia pseudomallei* and other closely related Burkholderiaceae. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v.55, p.37-45, 2006.

Van Belkum, A; Scherer, S.; Van Alphen, L.; Verbrugh, H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** v. 62, p. 275-293, 1998.

Van der Schaaf, A. Malleus. In: Van der Höeden, J. **Zoonoses.** Amsterdam: EPC. 1964, p.184-201.

Verma, R.D. Diagnosis and control of glanders in equids. **Equi. Infect. Dis.** v.3, p.99-102, 1998.

Verma, R.D.; Sharma, J.K.; Venkateswaran, K.S.; Batra, H.V. Development of an avidinbiotin dot enzyme-linked immunosorbent assay and its comparison with

other serological tests for diagnosis of glanders in equines. **Vet. Microbiol.** v.25, p.77-85, 1990.

Vignal, A.; Milan, D.; SanCristobal, M.; Eggen, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet. Sel. Evol.** v.34, 275-305, 2002.

Wareth, G.; Melzer, F.; Weise, C.; Neubauer, H.; Roesler, U.; Murugaiyan, J. Proteomics-based identification of immunodominant proteins of *Brucellae* using sera from infected hosts points towards enhanced pathogen survival during the infection. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.456, p.202–206, 2014.

Welkos, S.L.; Gregory, B.C.; Waag, D.M.; Burtnick, M.N. Glanders. In: Bozue, J., Cote, C.K.; Glass, P.J. **Medical Aspects of Biological Warfare.** Texas, E.U.A., 2018.

Wernery, U. Glanders. In: Mair, T.S.; Hutchinson, R.E. **Infectious Diseases of the Horse.** Eds, Equine Veterinary Journal Ltd, Cambridge shire, UK, 2009, p.253–260.

Wernery, U.; Wernery, R.; Joseph, M.; Al-Salloom, F.; Johnson, B.; Kinne, J.; Jose, S.; Jose, S.; Tappendorf, B.; Hornstra, H.; Scholz, HC. Natural *Burkholderia mallei* Infection in Dromedary, Bahrain. **Emerging Infect. Dis.** v.17(7), p.1277-1279, 2011.

Wheelis, M. First shots fired in biological warfare. **Nature.** v.395, p.213, 1998.

Wilkinson, L. **Animals and Disease.** Cambridge: Cambridge Univ Pr, 1992, p.116–123.

Yabuuchi, E.; Kosako, Y.; Oyaizu, H.; Yano, I.; Hotta, H.; Hashimoto, Y.; Ezaki, T.; Arakawa, M. "Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group II to the new genus, with the type species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov."

Microbiol. Immunol. (1992) v.36, p.1251-1275, 1992. [Erratum: **Microbiol. Immunol.** v.37, p.335, 1993.]

Zhou, K.; Lokate, M.; Deurenberg, R.H.; Tepper, M.; Arends, J.P.; Raangs, E.G.; Lo-Ten-Foe, J.; Grundmann, H.; Rossen, J.W.; Friedrich, A.W. Use of whole-genome sequencing to trace, control and characterize the regional expansion of extended spectrum beta-lactamase producing ST15 *Klebsiella pneumoniae*. **Sci. Rep.** v.6, 2016.

Zopf, W. **Die Spaltpilze**, 3^aed., Edward Trewendt, Breslau, p.1-127, 1885.

5. Artigos

5.1 Artigo 1

**First record of *Burkholderia mallei* Turkey 10 strain originating from
glanders horses from Brazil**

(Primeiro relato da cepa *Turkey 10* de *Burkholderia mallei* originada de equinos
com mormo no Brasil)

Artigo publicado na revista *Brazilian Journal of Microbiology* em 25 de junho de
2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00113-2>

First record of *Burkholderia mallei* Turkey 10 strain originating from glanderous horses from Brazil

(Primeiro relato da cepa Turkey 10 de *Burkholderia mallei* originada de equinos com mormo no Brasil)

Abstract: *Burkholderia (B.) mallei* is the causative agent of glanders in Equidae. This study describes the first record of the Turkey 10 strain of *B. mallei* in glanderous horses in Northeastern of Brazil. This description should contribute to the future actions of diagnosis, control, and eradication of this disease in Brazil.

Keywords: Sequencing, Diagnosis, Glanders, Brazil.

Glanders is a zoonotic disease caused by *Burkholderia (B.) mallei* with compulsory notification to the World Organization for Animal Health (OIE). While glanders was eradicated in Europe and North America during the first half of the last century by restrictive measures to sacrifice infected animals, in Asia, the Middle East, and South America, the disease is still endemic. In recent years, outbreaks of the disease have been reported and continue to grow numbers of countries, including Brazil, Pakistan, Iran, the United Arab Emirates, Lebanon, and India [13]. In Brazil, glanders was described in 1811 by Pimentel [15], and in 1960, the disease was officially considered eradicated. In 2000, Mota et al. Registered the emergence of new cases of glanders in the states of Pernambuco and Alagoas. Nowadays, the disease is registered in all Brazilian regions, and little progress has been made in the epidemiological, molecular, and control aspects of this important disease.

The molecular methods have a potential for detecting *B. mallei* in animals with clinical signs of glanders, differing from *Burkholderia pseudomallei* infections, which determine similar clinical signs, whereas these *Burkholderia* species have similarity in their genomes greater than 90% [9, 11, 12, 16, 17, 19,

20]. Polymerase chain reaction (PCR) has been used in the clinical setting and in public health laboratories for the identification of *B. mallei* [8, 14] and when associated with genetic sequencing, it is possible to reduce time and to improve the efficiency of the reagents used [1, 3, 5].

Due to the high similarity between *B. mallei* and *B. pseudomallei* in phenotypic characteristics in microbiological culture, biochemical and molecular tests, and the impossibility of serological differentiation [11], it is necessary to correctly identify this bacterium and the strain involved in suspected cases of glanders. The objective of this study was to know the circulating strains of *B. mallei* isolated from clinical cases of glanders in horses from Brazil.

The entire experimental procedure is in accordance with the ethical principles adopted by the Ethics Committee for the Use of Animals from the Federal Rural University of Pernambuco, license number 004/2018.

In total, six samples were collected from equine positive in official serological tests for glanders according to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) [2]. Five animals belonged to rural properties located in the Metropolitan Region of Recife (MRR), Pernambuco, and one animal came from the Metropolitan Region of Maceió (MRM), Alagoas. After euthanasia, the animals were submitted to necropsy and fragments of the piogranulomatous lesions were collected in the lung and liver, which were stored in sterile polypropylene bottles at room temperature and transported to the laboratory.

The isolation was done from the purulent material obtained from the interior of the piogranulomatous lesions and processed in a biological safety cabin. The purulent material was cultured using blood sheep agar containing 3% (v/v) glycerol at 37 °C for 48 h [16]. The suspected colonies were selected according to the phenotypic description provided by the OIE [13] and submitted to conventional PCR for confirmation of *B. mallei*.

DNA extraction was performed in suspected colonies after culturing using the genomic DNA purification Promega® kit for DNA extraction from Gram-negative bacteria following the manufacturer's recommendation. Conventional PCR was performed on SimpliAmp Applied Biosystems® thermal cycler looking for differences in the *fliP* sequences of *B. mallei* strain ATCC 23344T and *B.*

pseudomallei strain K96243. The oligonucleotides used were Bma-IS407-fliP-f (5'-TCA-GGTTTG-TAT-GTC-GCT-CGG-3') and Bma-IS407-fliP-r (5'-CTA-GGT-GAA-GCT-CTG-CGC-GAG-3') in a final reaction volume of 12.5 µL, using Go-Taq green mastermix Promega® and primers at 10 pmol concentration. The thermal profile conditions were an initial denaturation of 94 °C for 3 min, 34 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 67 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min, ending with an extension final at 72 °C for 7 min and as positive control, using standard strain *B. mallei* ATCC 15310. From the PCR reaction product, 9 µL was subjected to agarose gel electrophoresis (1.5%w/v in TAE buffer) to verify the presence of the 989-bp band [17].

PCR amplified products were purified using the Quiacki purification® kit following the manufacturer's recommendations and forwarded to the Central Laboratory (LABCEN) of the Center of Biological Sciences (CCB) from Federal University of Pernambuco (UFPE).

It was then performed a bidirectionally sequenced by standard protocols using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) following the manufacturer's recommendations using a 96-well plate and cycled in a Veriti thermocycler (Applied Biosystems®) for 40 cycles of 15 s at 96 °C, 15 s at 56 °C, and 4 min at 60 °C in an automated ABI-PRISM 3130 sequencer (Applied Biosystems®). Subsequently, the sequences acquired were analyzed with aid of software BioEdit® [7] and MEGA 5 to compare with the database found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

All six samples were submitted to GenBank which provided the following accession numbers:MK947136,MK947137, MK947138, MK947139, MK947140, and MK947141. The sequencing analysis results obtaining all six samples sequences were the same; the Turkey 10 strain of *B. mallei* then confirms the etiology of glanders (Fig. 1).

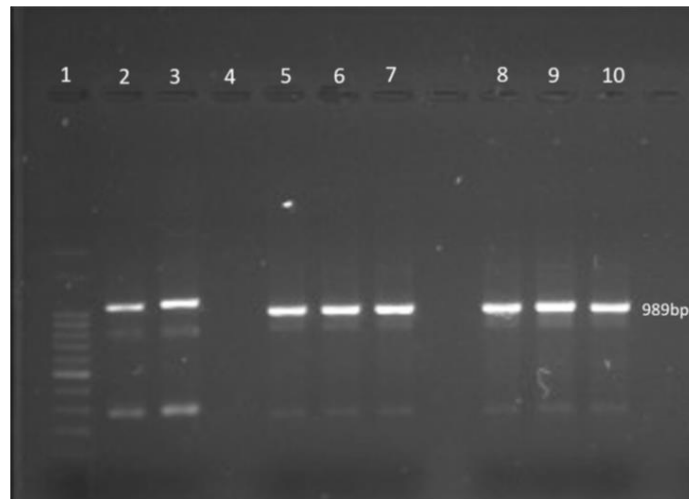


Fig. 1 Specific PCR for *B. mallei* agarose gel. Line 1, molecular marker; lines 2 and 3, positive controls; and line 4, negative control. Lines 5, 6, 7, 8, 9, and 10 are positive samples.

Glanders was described in Brazil in the nineteenth century, and since then, several measures have been suggested and implemented to control this disease [2, 10, 15]. Between 1960 and 1999 in Brazil, glanders was probably underreported and/or new sources of infection may have been introduced with the importation of animals from all over the world [10]. After confirmation of the disease in the country, there were some advances related to bacterial identification, including the use of a strain in the standardization of serological and intradermal diagnostic techniques. Silva et al. [18] studied animals from Pernambuco and Alagoas and observed four groups of genotypes with distinct biochemical characteristics, indicating differences of the circulating strains in the study area. Subsequently, Girault et al. [6] carried out the first draft of the genome of *B. mallei* strain 16-2438_BM#8 isolated from a mule in Pernambuco and concluded that a comparative genomic analysis of strains from different geographic regions and different hosts is necessary to improve the knowledge about this reemerging disease in the country.

The results obtained in our study indicate the circulation of the same strain of *B. mallei* in the studied animals. This finding is important from epidemiology aspect of glanders and was probably due to the strong trade in animals between

the two states and also the participation of animals from fairs and agricultural events. This strain is also reported in Turkey [4], raising the alert level for the global distribution of this bacterium.

The identification of the same *B. mallei* strain circulating in different regions is an important finding to develop and to improve serological and molecular diagnostic techniques, with the development of specific molecular markers for strains detection, and also to contribute to vaccine production, since the treatment is not recommended by the OIE.

Acknowledgments

We thank Silveira PPM, Santana VLA, Rocha LO, and Silva KPC for their technical assistance. Funding This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Compliance with ethical standards

The entire experimental procedure is in accordance with the ethical principles adopted by the Ethics Committee for the Use of Animals from the Federal Rural University of Pernambuco, license number 004/2018.

References

1. Bauernfeind A, Roller C, Meyer D, Jungwirth R, Schneider I (1998) Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. *J Clin Microbiol* 36:2737–2741
2. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 6 de 16 de janeiro de 2018. Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional. Diário Oficial da União de 17 de janeiro de 2018

3. Cárdenas NC, Galvis JOA, Farinati AA, Grisi-Filho JHH, Diehl GN, Machado G (2018) *Burkholderia mallei*: The dynamics of networks and disease transmission. *Transbound Emerg Dis*. <https://doi.org/10.1111/tbed.13071>
4. Daligault HE, Johnson SL, Davenport KW, Minogue TD, Bishop- Lilly KA, Broomall SM, Bruce DC, Coyne SR, Frey KG, Gibbons HS, Jaissle J, Koroleva GI, Ladner JT, Lo C-C, Munk C, Wolcott MJ, Palacios GF, Redden CL, Rosenzweig CN, Scholz MB, Chain PS (2016) Draft genomes for eight *Burkholderia mallei* isolates from Turkey. *Genome Announc* 4(1)
5. Diniz MC, Farias KM, Pacheco ACLP, Viana DA, Araújo-Filho R, Lima APS, Costa RB, Oliveira DM (2008) Análise Genômica de *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*: dois Patógenos de Primeira Grandeza e de Genomas surpreendentemente complexos. *Rev Bras Hig San Anim* 2(1):1–34
6. Girault G, Woudstra C, Martin B, Vorimore F, Santana VLA, Fach P, Madani N, Laroucau K (2017) First draft genome for a *Burkholderia mallei* isolate originating from a glanderous mule from Brazil. *Genome Announc* 5(28)
7. Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* 41:95–98
8. Laroucau K, Santana VLA, Girault G, Martin B, Silveira PPM, Machado MB, Joseph M, Wernery R, Wernery U, Zientara S, Madani N (2018) First molecular characterization of a Brazilian *Burkholderia mallei* strain isolated from a mule in 2016. *Infect Genet Evol* 57:117–120
9. Lee MA, Wang D, Yap EH (2005) Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. *FEMS Immunol Med Microbiol* 43:413–417
10. Mota RA, Brito MF, Castro FJC, Massa M (2000) Mormo em equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesqui Vet Bras* 20(4):155–159
11. Neubauer H, Sprague LD, Zacharia R, Tomaso H, Al Dahouk S, Wernery R et al. (2005) Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 52:201–205
12. Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettelin H, Nelson KE, Feldblyum T, Ulrich RL, Ronning CM, Brinkac LM, Daugherty SC, Davidsen TD, Deboy RT,

Dimitrov G, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Khouri H, Kolonay JF, Madupu R, Mohammoud Y, Nelson WC, Radune D, Romero CM, Sarria S, Selengut J, Shamblin C, Sullivan SA, White O, Yu Y, Zafar N, Zhou L, Fraser CM (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(39): 14246–14251

13. OIE (2018) Organização Mundial de Saúde Animal. Terrestrial manual, chapter 2.5.11 – glanders and melioidoses. Disponível em: <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.11_GLANDERS.pdf> Acesso em: 20/12/2018

14. Patel JB (2001) 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn* 6:313–321

15. Pimentel W (1938) História e organização do serviço veterinário do exército. *Revta Milit Med Vet* 1(4):283–322

16. Schmoock G, Ehricht R, Melzer F, Rassbach A, Scholz HC, Neubauer H, Sachse K, Mota RA, Saqib M, Elschner M (2009) DNA microarray-based detection and identification of *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia* spp. *Mol Cell Probes* 23:178–187

17. Scholz HC, Joseph M, Tomaso H, al Dahouk S, Witte A, Kinne J, Hagen RM, Wernery R, Wernery U, Neubauer H (2006) 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. *Diag Infect Dis* 54(4):241–247

18. Silva KPC, Mota RA, Cunha AP, Silva LBG, Leal NC, Cavalcante YVN, Teles JAA, Pereira MCC, Freitas NS (2009) Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. *Pesqui Vet Bras* 29(5):439–444

19. Thibault FM, Valade E, Vidal DR (2004) Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei* and *B. thailandensis* by real time PCR targeting type III secretion system genes. *J Clin Microbiol* 42:5871–5874

20. U'ren JM, Van Ert MN, Schupp JM et al. (2005) Use of real-time PCR TaqMan assay for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J Clin Microbiol* 43:5771–5774

5.2. Artigo 2

Molecular characterization of *Burkholderia mallei* strains isolated from Brazil (2014-2017)

(Caracterização molecular de cepas *Burkholderia mallei* isoladas no Brasil (2014-2017))

Artigo formatado e submetido ao periódico Infection, Genetics and Evolution
Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious
Diseases (MEEGID)

(<https://www.journals.elsevier.com/infection-genetics-and-evolution>)

Online ISSN: 1567-1348

Fator de impacto: 2,773

Molecular characterization of *Burkholderia mallei* strains isolated from Brazil (2014-2017)

[Caracterização molecular de cepas *Burkholderia mallei* isoladas no Brasil (2014-2017)]

Abstract

Glanders is an infectious zoonosis caused by *Burkholderia (B.) mallei* that mainly affects equids. The objective of this work was to provide additional knowledge on the diversity of the strains circulating in Brazil. Six *B. mallei* isolates obtained from necropsies of glanderous horses between 2014 and 2017 in two different states (Pernambuco and Alagoas) were analyzed by PCR-HRM. While four strains (9902 RSC, BM_campo 1, BM_campo 3 and UFAL2) clustered in the L3B2 branch, which already includes the Brazilian 16-2438_BM#8 strain, two strains (BM_campo 2.1, BM_campo 2.2) clustered within the L3B3sB3 branch, which mostly included ancient isolates, from European and Middle East origin. The whole genome sequencing of two of these strains (UFAL2 and BM_campo 2.1), belonging to different branches, confirmed the HRM typing results and refined the links between the strains, including the description of the L3B3Sb3Gp1SbGp1 genotype, never reported so far for contemporary strains. These results suggest different events of glanders introduction in Brazil, including a potential link with strains of European origin, related to colonization or trade.

Keywords: *Burkholderia mallei*, Genotyping, Horses, PCR-HRM, WGS.

Introduction

Burkholderia (B.) mallei is the cause of glanders, a zoonotic disease with compulsory notifications to the World Organization for Animal Health (OIE) (OIE, 2018) and, in Brazil, to the official veterinary services (Brasil, 2018). In Brazil, the disease was first described by Pimentel (1938) in 1811, and the country was officially considered free in 1960 till the description of re-emergent cases in the 2000s in the states of Pernambuco and Alagoas (Mota *et al.*, 2000). Nowadays,

glanders cases have been recorded in 25 of the 27 Brazilian states, with an increase in the affected areas although the incidence of the disease remains low (Fonseca-Rodríguez *et al.*, 2019).

Equids are known to be susceptible, carriers and disseminators of glanders (Mota, 2006; Neubauer *et al.*, 2005). The disease can present in several clinical forms: cutaneous, respiratory, lymphatic, or asymptomatic. The respiratory form is characterized by chronic pneumonia with cough, epistaxis, and dyspnea. In the cutaneous and lymphatic forms, which are usually associated, rigid lymph nodes are observed in the abdominal region and on the lateral and medial faces of the limbs (Al-Ani *et al.*, 1987; Mota *et al.*, 2006). In asymptomatic animals, characteristic lesions can be found during necropsies (Al-Ani and Roberson, 2007, Elschner *et al.*, 2009). Limited clinical signs expressed in the early stage of disease also makes the clinical and laboratory diagnoses difficult. Serological tests such as complement fixation test or ELISA and/or malleinization can be complemented by bacteriology or molecular biology.

Specific *B. mallei* molecular-based detection methods are available, including the OIE recommended and widely used PCR system targeting the *fljP*-IS407A sequence (Scholz *et al.*, 2006, Tomaso *et al.*, 2006). In contrast to the MLST typing scheme (Godoy *et al.*, 2003) which fails to discriminate between *B. mallei* strains, the MLVA method (U'Ren *et al.*, 2007) and more recently the PCR-HRM method (Laroucau *et al.*, 2018; Scholz *et al.*, 2014) have been able to highlight the diversity of strains within the *B. mallei* species.

Few molecular typing data are available from circulating *B. mallei* strains in Brazil with only one whole genomic sequence obtained from a strain isolated from a donkey in 2016 available to date (Girault *et al.*, 2017). Included in the PCR-HRM development work, this strain has been localized on the L3B2 branch (Laroucau *et al.*, 2018).

The present study aims to characterize six new *B. mallei* isolates from cases diagnosed in Pernambuco and Alagoas states between 2014 and 2017, using PCR-HRM and WGS. The aim was to provide additional knowledge about the circulating strains in the Northeast Region of Brazil.

Material and Methods

Animals

From December 2014 to October 2017, six horses submitted to CFT in the frame of the National surveillance and control of animal movement program, tested positive and were submitted to compulsory sanitary slaughtering by the local veterinary service (Brasil, 2018) (**Table 1**). The entire experimental procedure was in accordance with the ethical principles adopted by the Ethics Committee for the Use of Animals from the Federal Rural University of Pernambuco, license number 004/2018.

Five horses came from four different farms in Recife, a city in Pernambuco (PE) State while the sixth animal came from Satuba, a city in Alagoas (AL) State. Both states are located in the Northeast region of Brazil.

Isolates

Tissues collected during necropsies were cultured on blood sheep agar containing 3% (v/v) glycerol at 37°C for 48 to 72h (Schmooch *et al.*, 2009; OIE, 2018). Colonies were confirmed as *B. mallei* by PCR targeting the *fljP*-IS407A sequence, using conventional (Scholz *et al.*, 2006) and real-time PCR (Tomaso *et al.*, 2006) methods. The isolates were frozen at -80°C in a preservation liquid medium containing 50% glycerol.

SNP analysis and PCR-HRM markers

The PCR-HRM genotype of the isolates was determined as previously described (Girault *et al.*, 2018). In short, a set of 15 markers was used for PCR amplification, followed by a High-resolution melting PCR analysis, allowing the classification of the strains into three lineages (L1 to L3) and into branches, sub-branches and groups.

Whole genome sequencing

Genomic DNA from each *B. mallei* isolate was extracted using genomic DNA purification Promega® kit for DNA extraction from Gram-negative bacteria according to the manufacturer's instructions. For whole-genome sequencing, DNA libraries were prepared using the Nextera XT kit (Illumina) and sequencing reaction was performed according to the manufacturer's instructions. The MiSeq run was carried out on the DNA preparation, with paired-end reads of 250 bp

using MiSeq V2 reagents and with a sequencing depth comprised between 72 and 82 (data not shown). The raw reads were trimmed using Trimmomatic-0.36 with the following parameters (Leading:3, Trailing:3, SlidingWindow:4:15, Minlen:36) and assembled *de novo* using SPAdes 3.13 with the default parameters. MeDuSa has been used to perform the contig scaffolding against the *B. mallei* 23334 strain. The genome sequences have been deposited in the ENA database under accession numbers ERS6071509 and ERS6071510 (**Table 2**).

Whole genome phylogenetic analysis

Publicly available genomic sequences of 21 *B. mallei* strains were used for comparison (**Figure 2**). This set of strains includes at least one strain per lineage, sub-branch, groups identified so far, and all WGS available for strains related to L3B2 and L3B3sB3. The whole genome SNP (wgSNP) pipeline of the BioNumerics software v7.6.1 (Applied Maths, Belgium) was used in order to detect SNPs on whole genome sequences and perform cluster analyses on the resulting wgSNP matrix. The input of the wgSNP module is raw data except for the reference. Each genome file was processed with the ART-MountRainier-2016-06-05 simulation tool that generates synthetic paired-end reads with coverage 50 (Huang *et al.*, 2012). These reads were aligned and mapped against the reference sequence *B. mallei* ATCC 23344 using the BWA algorithm implemented in BioNumerics with a minimum of 90% sequence identity. A phylogenetic tree built using RAxML version 8.2.9 with the GTRGAMMA model and 1,000 bootstrap replicates based on the filtered SNP matrix (2278 SNPs) from BioNumerics (Stamatakis, 2014). Strain-specific SNPs were identified using the BioNumerics wgSNP module and then filtered using the following conditions: minimum 5x coverage to call a SNP, removal of positions with at least one ambiguous base, one unreliable base or non-informative SNP and minimum inter-SNP distance of 25 bp.

Results and Discussion

None of the six animals included in this study showed clinical signs, with the exception of animal No. 6, an 8-month-old foal from the city of Satuba, which showed clinical signs one month after having been in contact with other horses returning from a trade fair. The foal showed a left hind limb oedema and the

presence of ulcerated lesions, a disseminated lymphangitis, haemoptysis and a severe dyspnea, in addition to apathy and enlarged lymph nodes (**Figure 1**), corresponding to classic signs of glanders (Mota *et al.*, 2006). Nevertheless, the remaining five animals had characteristic lesions found at necropsy (pulmonary and hepatic abscesses and pulmonary congestion) and *B. mallei* strains were successfully recovered from the tissues of these six horses (**Table 1**).

The PCR-HRM typing scheme based on 15 signatures SNP (Girault *et al.*, 2018) was able to group four of these *B. mallei* isolates (9902 RSC, BM_campo 1, BM_campo 3 and UFAL2) in the L3B2 branch, which already includes the Brazilian 16-2438_BM#8 (Laroucau *et al.*, 2018), alongside the Indian BMQ strain (**Table 1, Figure 2**). The 16-2438_BM#8 strain was previously isolated from a glanderous donkey from Paudalho, a city in the state of Pernambuco. The location of these four new strains in this L3B2 branch suggests an active circulation of related strains in this state, but also in the neighboring state of Alagoas, since the UFAL2 strain isolated from a horse from Satuba also belongs to this L3B2 branch. Animal trade, exhibition fairs, auctions and sport are activities that may explain the transmission and the circulation of the disease between these two close states, as previously suggested by Fonseca-Rodríguez *et al.* (2019). Interestingly, BM_campo 2.1 and BM_campo 2.2 strains, both isolated from horses belonging to a same farm, grouped together within the L3B3sB3 branch, which includes several ancient strains of *B. mallei*: 11 (Turkey/1949), NCTC10247 (Turkey/1960), NCTC_10229 (Hungary/1961), 2002734299 (Hungary/1961), Ivan (Hungary/1961), 2002721280 (Iran/1972), and SR0952700I (unknown origin). Both BM_campo 2.1 and BM_campo 2.2 strains were isolated in 2016 from two asymptomatic but serologically positive horses. This is the first description of contemporary strains belonging to this L3B3sB3 group. Pimentel (1938) suggested that glanders may have been introduced to Brazil by infected animals imported from Europe at the beginning of the 19th century, these two strains may have links with strains from Europe and Middle East isolated in this period.

For further phylogenetic analysis of the Brazilian isolates, the UFAL2 and BM_campo 2.1 strains, which belong to the L3B2 and L3B3sB3 branches, respectively, were subjected to whole genome sequencing. These data were used to construct a tree based on 2278 SNPs, together with 21 other selected *B.*

mallei strains. Indeed, the selection includes one strain per branch, except for L3B2 and L3B3sB3 branches for which all available genomes have been integrated. The PCR-HRM typing results for these two strains were confirmed by SNP analysis (**Figure 2**), which provided additional information. Indeed, UFAL2 clustered close to the 16-2438_BM#8 strain, in a distinct branch than the BMQ strain. While within the L3B3sB3 branch, two groups (Gp1 and Gp2), and two subgroups within the Gp1 groups are observed, the BM_campo 2.1 strain clusters in the L3B3sB3Gp1SbGp1 group, in close proximity to Hungarian strains (NCTC_10229, 2002734299, Ivan), all of which were isolated in 1961 and to SR0952700I, of unknown origin. Interestingly, based on the 2278 SNPs selected for analysis, only a few differences were observed between these strains isolated 50 years apart, suggesting a potentially common origin and a low rate of mutation for this species. This was also recently observed from the analysis of ten contemporary Indian strains, which were found to be a very homogeneous clade (Harisankar *et al.*, 2021).

Among the six horses included in this study, only animal No. 6 showed clinical signs. It was a young animal. The strain isolated from this animal (UFAL 2) is closely related to strains isolated from asymptomatic (9902 RSC, BM_campo 1, BM_campo 3) or clinical (16-2438_BM#8) (Laroucau *et al.*, 2018) cases of glanders in Brazil. Inoculation routes and strains are probably important for the issue of the infection, but it is worth mentioning that the incubation period of the disease is variable, so the other animals could be in chronic or asymptomatic form, therefore without evident clinical signs (Jubb *et al.*, 1993, Al-Ani *et al.*, 1987; Al-Ani *et al.*, 2007; Mota *et al.*, 2006).

More typing data are needed to describe the diversity of *B. mallei* strains circulating in Brazil. One of limitation is the access to strains, as cultivation of *B. mallei* from field samples is highly dependent on the bacterial load (Mota *et al.*, 2004). The PCR-HRM typing method offers many advantages, including the ability to be applied directly to biological samples (Laroucau *et al.*, 2020) and also the possibility of integrating new SNP markers, depending on the availability of WGS sequences and the degree of identification required. However, the design of new markers must be considered the inherent limitation of the high GC rate of the genome, which means that strategies must be used to compensate for this

constraint in order to target a specific SNP, as was recently the case for specific markers designed for Indian strains (Harisankar *et al.*, 2021).

Knowledge of genotypes is an additional asset in the disease control strategy, making it possible to establish links between the various cases and to identify chains of contamination and transmission.

Conclusions

Two *B. mallei* genotypes in circulation in Brazil were described in this study, with the description of a new one, never reported for contemporary strains. These results suggest different events of introduction of glanders in Brazil, including a potential link with strains of European origin, in connection with colonization or trade.

Acknowledgements

This work was supported in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), and in part by the European Commission's Directorate-General for Health and Consumers.

Conflict of Interest Statement

All the authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval

The entire experimental procedure is in accordance with the ethical principles adopted by the Ethics Committee on Animals Use from the Federal Rural University of Pernambuco, license number 004/2018.

References

- Al-Ani, F.K., Al-Delami, A.K., Ali, A.H. (1987). Glanders in Horse: clinical and epidemiological studies in Iraq. *Pakistan Vet. J*, 7, 126-129.
- Al-Ani, F.K., & Roberson, J. (2007). Glanders in horses: a review of the literature. *Vet. Arski*, 77, 203-218.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 6 de 16 de janeiro de 2018. Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional. *Diário Oficial da União* de 17 de janeiro de 2018, Brasília-DF.

- Elschner, M., Klaus, C., Liebler-Tenorio, E., Schmoock, G., Wohlsein, P., Tinschmann, O., Lange, E., Kaden, V., Klopffleisch, R., Melzer, F., Rassback, A., Neubauer, H. (2009). *Burkholderia mallei* Infection in a Horse Imported from Brazil. *Eq. Vet. Edu*, 21, 147–150.
- Fonseca-Rodríguez, O., Júnior, J.W.P., Mota, R.A. (2019). Spatiotemporal Analysis of Glanders in Brazil. *J. Equine Vet. Sci*, 18, 14-19.
- Girault, G., Woudstra, C., Martin, B., Vorimore, F., Santana, V.L.A., Fach, P., Madani, N., Laroucau, K. (2017). First Draft Genome for a *Burkholderia mallei* Isolate Originating from a Glandorous Mule from Brazil. *Genome Announc.*, 5(28).
- Girault, G., Wattiau, P., Saqib, M., Martin, B., Vorimore, F., Singha, H., Engelsma, M., Roest, H.J., Spicic, S., Grunow, R., Vicari, N., De Keersmaecker, S.C.J., Roosens, N.H.C., Fabbi, M., Tripathi, B.N., Zientara, S., Madani, N., Laroucau, K. (2018). High-resolution melting PCR analysis for rapid genotyping of *Burkholderia mallei*. *Infec. Genet. Evol.*, 63, 1-4.
- Godoy, D., Randle, G., Simpson, A.J., Aanensen, D.M., Pitt, T.L., Kinoshita, R., Spratt, B.G. (2003). Multilocus sequence typing and evolutionary relationships amongs the causative agents of melioidosis and glanders, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 2068-2079.
- Huang, W., Li, L., Myers, J. R., & Marth, G. T. (2012). ART: a next-generation sequencing read simulator. *Bioinformatics*, 28(4), 593–594. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr708>
- Jubb, K.V.F.; Kennedy, P.C.; Plamer, N. (1993). *Pathology of Domestic Animals* (4th ed.) Academic Press.
- Laroucau K, Santana VLA, Girault G, Martin B, Silveira PPM, Brasil MM, Joseph M, Wernery R, Wernery U, Zientara S, Madani N. (2018). First molecular characterization of a Brazilian *Burkholderia mallei* strain isolated from a mule in 2016. *Inf. Gene. Evol.* v.57, p.117-120.
- Laroucau K, Aaziz R, Vorimore F, Varghese K, Deshayes T, Bertin C, Delannoy S, Sami AM, Al Batel M, El Shorbagy M, Almutawaa KAW, Alanezi SJ, Alazemi YSN, Guernier-Cambert V, Wernery U. (2020). A genetic variant of *Burkholderia mallei* detected in Kuwait: Consequences for the PCR diagnosis of glanders. *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.13777.
- Mota RA., Brito MF., Castro FJC., Massa M. (2000). Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesq. Vet. Bras*, 20(4), 155-159.
- Mota RA., Farias AFA., Silva LBG., Rabelo SSA., Soares PC., Cunha AP. (2004). Influência de bactérias isoladas das vias aéreas superiores no diagnóstico microbiológico do mormo em equídeos. *Vet. Not*, 10(1), 41-46.
- Mota RA. (2006). Aspectos etiopatológicos, epidemiológicos e Clínicos do Mormo. *Vet. e Zootec*, 13(2), 117-124.
- Neubauer H., Sprague LD., Zacharia R., Tomaso H., Al Dahouk S., Wernery R., Wernery U., Scholz HC. (2005). Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J. Vet. Med. [B] Infect. Dis. Vet. Public Health*, 52, 201–205.
- OIE (2018, November 14) World Animal Health. Terrestrial manual, chapter 2.5.11 – glanders and melioidoses. Retrieved from https://www.oie.int/fileadmin/Home/fr/Health_standards/tahm/3.05.11_GLANDERS.pdf
- Pimentel W. (1938). História e organização do serviço veterinário do exército. *Revta. Milit. Med. Vet*, 1(4), 283–322.

- Scholz HC., Joseph M., Tomaso H., al Dahouk S., Witte A., Kinne J., Hagen RM., Wernery R., Wernery U., Neubauer H. (2006). 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. *Diag. Infec. Dis*, 54(4), 241–247.
- Scholz HC., Pearson T., Hornstra H., Projahn M., Terzioglu R., Wernery R., Georgi E., Riehm JM., Wagner DM., Keim PS., Joseph M., Johnson B., Kinne J., Jose S., Hepp CM., Witte A., Wernery U. (2014). Genotyping of *Burkholderia mallei* from an Outbreak of Glanders in Bahrain Suggests Multiple Introduction Events. *PLoS Negl. Trop. Dis*, 8(9).
- Schmoock G., Ehricht R., Melzer F., Rassbach A., Scholz HC., Neubauer H., Sachse K., Mota RA., Saqib M., Elschner M. (2009). DNA microarray-based detection and identification of *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia* spp. *Mol. Cell. Probes*, 23, 178–187.
- Singha H, Vorimore F, Sheetal Saini, Deshayes T, Saqib M, Tripathi BN, Laroucau K. Molecular epidemiology of *Burkholderia mallei* isolates from India (2015-2016): New SNP markers for strain tracing. *Inf Genet Evol*. Submitted.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 1312-1313.
- Tomaso H., Scholz HC., Al Dahouk S., Eickhoff M., Treu TM., Wernery R., Wernery U., Neubauer H. (2006). Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting fliP for the rapid identification of *Burkholderia mallei* in clinical samples. *Clin. Chem*, 52, 307–310.
- U'Ren JM., Schupp JM., Pearson T., Hornstra H., Friedman CL., Smith KL. (2007). Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol*, 7(23).

Table 1: Information about strains investigated in this study.

Animal	Month/Year	Location (city/state)	Farm	Host	Clinical signs	Collection source	Strain identification	PCR <i>F/I/P</i>	PCR-HRM genotype	WGS
1	12/2014	Recife/PE	A	Horse	No	Liver	9902 RSC	+	L3B2	No
2	03/2016	Recife/PE	B	Horse	No	?	BM_campo 1	+	L3B2	No
3	03/2016	Recife/PE	C	Horse	No	?	BM_campo 2.1	+	L3B3sB3	Yes
4	03/2016	Recife/PE	C	Horse	No	?	BM_campo 2.2	+	L3B3sB3	No
5	03/2016	Recife/PE	D	Horse	No	?	BM_campo 3	+	L3B2	No
6	10/2017	Satuba/AL	E	Horse	Yes	Lungs	UFAL2	+	L3B2	Yes

Table 2: WGS data

Strain identification	Genome size (bp)	No of contigs (scaffolds)	% G+C	N50	No. of CDS	Accession No
BM_campo 2.1	5538977	283	67.4	32684	4640	ERS6071509
UFAL2	5648326	268	67.5	37385	4739	ERS6071510



Figure 1: Glanderous horse (No. 6), from Alagoas (A) and pictures of nodules observed during the necropsy on lungs (B) and of nodule and congestion in lung's parenchyma (C).

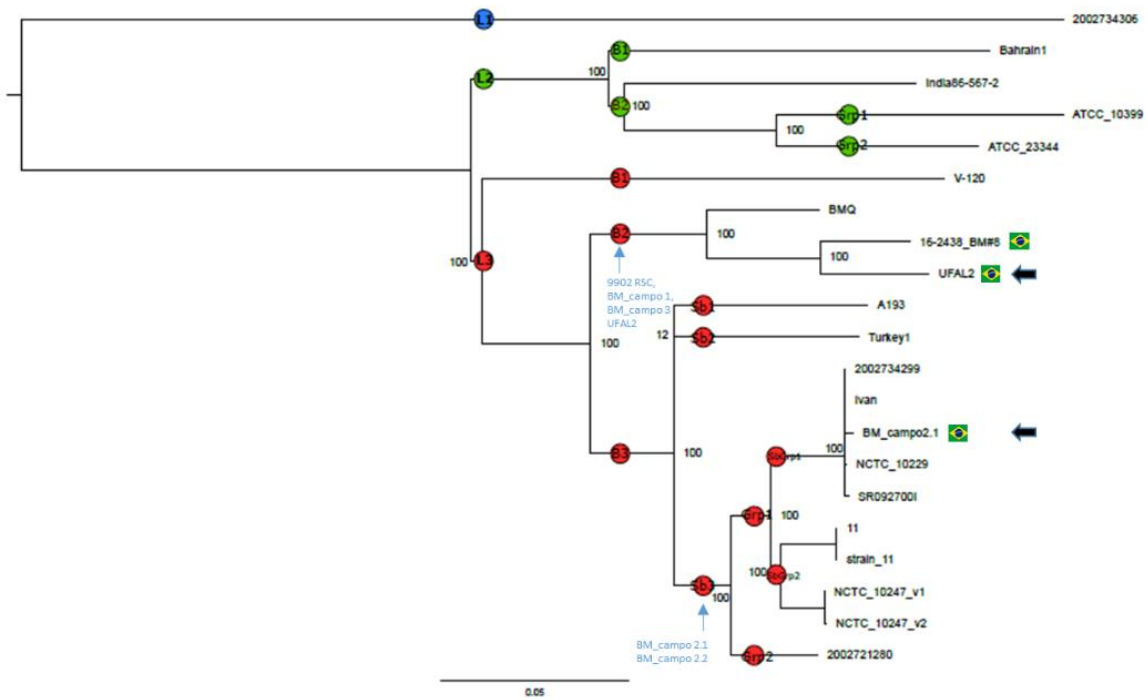


Figure 2. SNP-based of *B. mallei* incorporating two newly sequenced strains from Brazil (UFAL2 and BM_campo2.1). A representative strain of each lineage (L1 to L3), branches, sub-branches and groups were included, as well as all available genomes related to branches L3B2 and L3B3sB3 as previously determined (Girault *et al.*, 2018). New subgroups were introduced: L3B3Sb3Gp1, L3B3Sb3Gp1SbGpr1, 3B3Sb3Gp1SbGpr2, L3B3Sb3Gp2. PCR HRM clustering results for the six Brazilian *B. mallei* DNAs included in the study, without preliminary WGS information, are shown in blue.

6. Considerações finais

A caracterização genética dos isolados de *B. mallei* obtidos revelou uma alta similaridade entre as cepas brasileiras. A partir da análise molecular pelo sequenciamento completo do genoma e PCR High Resolution Melting foi possível identificar diferentes perfis genéticos e a correlação evolucionária entre os isolados.

A PCR High Resolution Melting se mostrou uma técnica de caracterização eficiente quando aplicada em amostras clínicas, com a vantagem de ser mais rápida e barata quando comparada com o sequenciamento completo do genoma, portanto mais eficiente no momento da análise inicial.

Evidenciou-se a circulação de duas cepas geneticamente distintas nos estados de Pernambuco e Alagoas. Baseado nestes achados, infere-se que a introdução da doença no país deriva de mais de um evento, diferentemente de um evento de introdução, como se acreditava.

O conhecimento destas cepas é fundamental para o aprimoramento de novas técnicas de diagnóstico imunológico e de marcadores moleculares mais eficientes e adequados para a situação epidemiológica da doença no país, além de favorecer as medidas de controle da enfermidade com a produção de vacinas.

7. Anexos

20/12/2017

:: SEI / MAPA - 3606708 - Ofício ::



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO
SERVIÇO DE INSPEÇÃO E SAÚDE ANIMAL
General San Martín, - Bairro Cordeiro, Recife/PE, CEP 50630060
Telefone: 81 32368300 e Fax: - <http://www.agricultura.gov.br>



21036.003504/2017-09

Ofício nº 260/2017/SISA-PE - MAPA

Recife, 22 de novembro de 2017.

À COORDENAÇÃO DO CURSO DE PÓS GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO - UFRPE

Assunto: AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL DE NECRÓPSIA.

Prezado Sr.,

Informamos que esta Superintendência Federal de Agricultura realiza o sacrifício e necrópsia de animais com diagnóstico do Mormo, juntamente com a Agência de Defesa e Fiscalização do Estado - ADAGRO/PE. Neste contexto, somos favoráveis ao acompanhamento do aluno de Pós-Graduação Marcus Vinicius Dias Falcão, com finalidade de coletar amostras de sangue e tecidos para "Caracterização Molecular e Estudo do Genoma *Burkholderia mallei* Isoladas de Equídeos com Mormo no Estado de Pernambuco, Brasil", durante tais necrópsias.

Atenciosamente,



Documento assinado eletronicamente por VANIA LUCIA DE ASSIS SANTANA, Auditor(a) Fiscal Federal Agropecuário, em 18/12/2017, às 09:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por CARLOS ANTONIO RIBEIRO RAMALHO JUNIOR, Superintendente Federal de Agricultura no Estado de Pernambuco, em 18/12/2017, às 13:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sistemas.agricultura.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3606708 e o código CRC 6F7F123C.

Referência: Caso responda este Ofício, indicar expressamente o Processo nº 21036.003504/2017-09

SEI nº 3606708



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n,
Dois Irmãos - CEP: 52171-900 - Recife/PE



CEUA - UFRPE
Aprovado em: 07/02/2018
Validade: 07/02/2020

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – G20
Licença condicional para o uso de animais em experimentação e/ou ensino

A Comissão de ética no uso de animais CEUA da Universidade Federal Rural de Pernambuco, no uso de suas atribuições, autoriza a execução do projeto discriminado abaixo. O presente projeto também se encontra de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11794/2008.

Número da licença	004/2018
Número do processo	23082.021434/2017-32
Data de emissão da licença	07 de fevereiro 2018.
Título do Projeto	Caracterização molecular e estudo do genoma de Burkholderia mallei isoladas de equídeos com mormo no estado de Pernambuco, Brasil
Finalidade (Ensino, Pesquisa, Extensão)	Pesquisa.
Responsável pela execução do projeto	Rinaldo Aparecido Mota
Colaboradores	Marcus Vinicius Dias Falcão; Vânia Lúcia de Assis Santana; Pedro Paulo Miranda Silveira.
Tipo de animal e quantidade total autorizada	Espécie: Equídeo: Quantidade: fêmeas 10 e 10 machos= 20. Total: 20. Idade 3 a 7 anos

Prof. Dra. Marleyne José Afonso Accioly Lins Amorim
(Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA /UFRPE)

Prof. Dr. Carlos F. R. Guaranié
Vice-Presidente CEUA/UFRPE
SIAPE 2116228



First record of *Burkholderia mallei* Turkey 10 strain originating from glanderous horses from Brazil

Marcus Vinícius D. Falcão¹ · Pedro P. M. Silveira² · Vania L. A. Santana² · Larissa O. da Rocha³ · Karla P. Chaves³ · Rinaldo A. Mota¹

Received: 23 February 2019 / Accepted: 25 June 2019
© Sociedade Brasileira de Microbiologia 2019

Abstract

Burkholderia (B.) mallei is the causative agent of glanders in Equidae. This study describes the first record of the Turkey 10 strain of *B. mallei* in glanderous horses in Northeastern of Brazil. This description should contribute to the future actions of diagnosis, control, and eradication of this disease in Brazil.

Keywords Sequencing · Diagnosis · Glanders · Brazil

Glanders is a zoonotic disease caused by *Burkholderia (B.) mallei* with compulsory notification to the World Organization for Animal Health (OIE). While glanders was eradicated in Europe and North America during the first half of the last century by restrictive measures to sacrifice infected animals, in Asia, the Middle East, and South America, the disease is still endemic. In recent years, outbreaks of the disease have been reported and continue to grow numbers of countries, including Brazil, Pakistan, Iran, the United Arab Emirates, Lebanon, and India [13]. In Brazil, glanders was described in 1811 by Pimentel [15], and in 1960, the disease was officially considered eradicated. In 2000, Mota et al. registered the emergence of new cases of glanders in the states of Pernambuco and Alagoas. Nowadays, the disease is registered

in all Brazilian regions, and little progress has been made in the epidemiological, molecular, and control aspects of this important disease.

The molecular methods have a potential for detecting *B. mallei* in animals with clinical signs of glanders, differing from *Burkholderia pseudomallei* infections, which determine similar clinical signs, whereas these *Burkholderia* species have similarity in their genomes greater than 90% [9, 11, 12, 16, 17, 19, 20]. Polymerase chain reaction (PCR) has been used in the clinical setting and in public health laboratories for the identification of *B. mallei* [8, 14] and when associated with genetic sequencing, it is possible to reduce time and to improve the efficiency of the reagents used [1, 3, 5].

Due to the high similarity between *B. mallei* and *B. pseudomallei* in phenotypic characteristics in microbiological culture, biochemical and molecular tests, and the impossibility of serological differentiation [11], it is necessary to correctly identify this bacterium and the strain involved in suspected cases of glanders. The objective of this study was to know the circulating strains of *B. mallei* isolated from clinical cases of glanders in horses from Brazil.

The entire experimental procedure is in accordance with the ethical principles adopted by the Ethics Committee for the Use of Animals from the Federal Rural University of Pernambuco, license number 004/2018.

In total, six samples were collected from equine positive in official serological tests for glanders according to the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) [2]. Five animals belonged to rural properties located in the Metropolitan Region of Recife (MRR), Pernambuco, and one animal came

Communicating editor: Miliane Moreira Soares de Souza

✉ Marcus Vinícius D. Falcão
mdfalcao@gmail.com

- ¹ Department of Veterinary Medicine, Laboratory of Infectious Diseases of Domestic Animals, Federal Rural University of Pernambuco, Manoel de Medeiros street, w/n, Dois Irmãos, Recife, PE CEP: 52171-900, Brazil
- ² Federal Superintendence of Agriculture, Livestock and Supply in the State of Pernambuco, Ministry of Agriculture, Livestock and Supply, General San Martin Avenue, 1000, Bongi, Recife, PE CEP: 50630-060, Brazil
- ³ Academic Unit of Viçosa, Laboratory of Infectious Diseases of Domestic Animals, Federal University of Alagoas, Manoel Severino Barbosa, w/n, Bom Sucesso, Viçosa, AL CEP: 57309-005, Brazil

from the Metropolitan Region of Maceió (MRM), Alagoas. After euthanasia, the animals were submitted to necropsy and fragments of the piogranulomatous lesions were collected in the lung and liver, which were stored in sterile polypropylene bottles at room temperature and transported to the laboratory.

The isolation was done from the purulent material obtained from the interior of the piogranulomatous lesions and processed in a biological safety cabin. The purulent material was cultured using blood sheep agar containing 3% (v/v) glycerol at 37 °C for 48 h [16]. The suspected colonies were selected according to the phenotypic description provided by the OIE [13] and submitted to conventional PCR for confirmation of *B. mallei*.

DNA extraction was performed in suspected colonies after culturing using the genomic DNA purification Promega® kit for DNA extraction from Gram-negative bacteria following the manufacturer's recommendation. Conventional PCR was performed on SimpliAmp Applied Biosystems® thermal cycler looking for differences in the *fliP* sequences of *B. mallei* strain ATCC 23344^T and *B. pseudomallei* strain K96243. The oligonucleotides used were Bma-IS407-*fliP*-f (5'-TCA-GGT-TTG-TAT-GTC-GCT-CGG-3') and Bma-IS407-*fliP*-r (5'-CTA-GGT-GAA-GCT-CTG-CGC-GAG-3') in a final reaction volume of 12.5 µL, using Go-Taq green mastermix Promega® and primers at 10 pmol concentration. The thermal profile conditions were an initial denaturation of 94 °C for 3 min, 34 cycles of denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 67 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min, ending with an extension final at 72 °C for 7 min and as positive control, using standard strain *B. mallei* ATCC 15310. From the PCR reaction product, 9 µL was subjected to agarose gel electrophoresis (1.5% w/v in TAE buffer) to verify the presence of the 989-bp band [17].

PCR amplified products were purified using the Quiacki purification® kit following the manufacturer's recommendations and forwarded to the Central Laboratory (LABCEN) of the Center of Biological Sciences (CCB) from Federal University of Pernambuco (UFPE).

It was then performed a bidirectionally sequenced by standard protocols using the BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems®) following the manufacturer's recommendations using a 96-well plate and cycled in a Veriti thermocycler (Applied Biosystems®) for 40 cycles of 15 s at 96 °C, 15 s at 56 °C, and 4 min at 60 °C in an automated ABI-PRISM 3130 sequencer (Applied Biosystems®). Subsequently, the sequences acquired were analyzed with aid of software BioEdit® [7] and MEGA 5 to compare with the database found in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).

All six samples were submitted to GenBank which provided the following accession numbers: MK947136, MK947137, MK947138, MK947139, MK947140, and MK947141. The

sequencing analysis results obtaining all six samples sequences were the same; the Turkey 10 strain of *B. mallei* then confirms the etiology of glanders (Fig. 1).

Glanders was described in Brazil in the nineteenth century, and since then, several measures have been suggested and implemented to control this disease [2, 10, 15]. Between 1960 and 1999 in Brazil, glanders was probably underreported and/or new sources of infection may have been introduced with the importation of animals from all over the world [10]. After confirmation of the disease in the country, there were some advances related to bacterial identification, including the use of a strain in the standardization of serological and intradermal diagnostic techniques. Silva et al. [18] studied animals from Pernambuco and Alagoas and observed four groups of genotypes with distinct biochemical characteristics, indicating differences of the circulating strains in the study area. Subsequently, Girault et al. [6] carried out the first draft of the genome of *B. mallei* strain 16-2438_BM#8 isolated from a mule in Pernambuco and concluded that a comparative genomic analysis of strains from different geographic regions and different hosts is necessary to improve the knowledge about this reemerging disease in the country.

The results obtained in our study indicate the circulation of the same strain of *B. mallei* in the studied animals. This finding is important from epidemiology aspect of glanders and was probably due to the strong trade in animals between the two states and also the participation of animals from fairs and agricultural events. This strain is also reported in Turkey [4], raising the alert level for the global distribution of this bacterium.

The identification of the same *B. mallei* strain circulating in different regions is an important finding to develop and to improve serological and molecular diagnostic techniques, with the development of specific molecular markers for strains

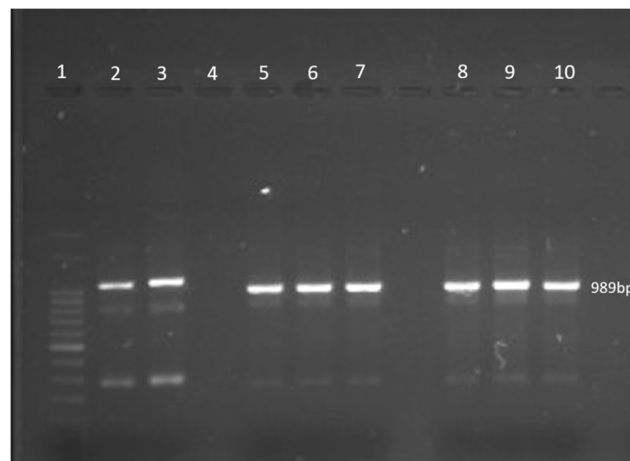


Fig. 1 Specific PCR for *B. mallei* agarose gel. Line 1, molecular marker; lines 2 and 3, positive controls; and line 4, negative control. Lines 5, 6, 7, 8, 9, and 10 are positive samples

detection, and also to contribute to vaccine production, since the treatment is not recommended by the OIE.

Acknowledgments We thank Silveira PPM, Santana VLA, Rocha LO, and Silva KPC for their technical assistance.

Funding This study was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Compliance with ethical standards

The entire experimental procedure is in accordance with the ethical principles adopted by the Ethics Committee for the Use of Animals from the Federal Rural University of Pernambuco, license number 004/2018.

References

- Bauernfeind A, Roller C, Meyer D, Jungwirth R, Schneider I (1998) Molecular procedure for rapid detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei*. J Clin Microbiol 36:2737–2741
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 6 de 16 de janeiro de 2018. *Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional*. Diário Oficial da União de 17 de janeiro de 2018
- Cárdenas NC, Galvis JOA, Farinati AA, Grisi-Filho JHH, Diehl GN, Machado G (2018) *Burkholderia mallei*: The dynamics of networks and disease transmission. Transbound Emerg Dis. <https://doi.org/10.1111/tbed.13071>
- Daligault HE, Johnson SL, Davenport KW, Minogue TD, Bishop-Lilly KA, Broomall SM, Bruce DC, Coyne SR, Frey KG, Gibbons HS, Jaissle J, Koroleva GI, Ladner JT, Lo C-C, Munk C, Wolcott MJ, Palacios GF, Redden CL, Rosenzweig CN, Scholz MB, Chain PS (2016) Draft genomes for eight *Burkholderia mallei* isolates from Turkey. Genome Announc 4(1)
- Diniz MC, Farias KM, Pacheco ACLP, Viana DA, Araújo-Filho R, Lima APS, Costa RB, Oliveira DM (2008) Análise Genômica de *Burkholderia mallei* e *Burkholderia pseudomallei*: dois Patógenos de Primeira Grandeza e de Genomas surpreendentemente complexos. Rev Bras Hig San Anim 2(1):1–34
- Girault G, Woudstra C, Martin B, Vorimore F, Santana VLA, Fach P, Madani N, Laroucau K (2017) First draft genome for a *Burkholderia mallei* isolate originating from a glanderous mule from Brazil. Genome Announc 5(28)
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symp Ser 41:95–98
- Laroucau K, Santana VLA, Girault G, Martin B, Silveira PPM, Machado MB, Joseph M, Wernery R, Wernery U, Zientara S, Madani N (2018) First molecular characterization of a Brazilian *Burkholderia mallei* strain isolated from a mule in 2016. Infect Genet Evol 57:117–120
- Lee MA, Wang D, Yap EH (2005) Detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei* and *Burkholderia thailandensis* by multiplex PCR. FEMS Immunol Med Microbiol 43:413–417
- Mota RA, Brito MF, Castro FJC, Massa M (2000) Mormo em equídeos nos estados de Pernambuco e Alagoas. Pesqui Vet Bras 20(4):155–159
- Neubauer H, Sprague LD, Zacharia R, Tomaso H, Al Dahouk S, Wernery R et al (2005) Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 52:201–205
- Nierman WC, DeShazer D, Kim HS, Tettelin H, Nelson KE, Feldblyum T, Ulrich RL, Ronning CM, Brinkac LM, Daugherty SC, Davidsen TD, Deboy RT, Dimitrov G, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn ML, Haft DH, Khouri H, Kolonay JF, Madupu R, Mohammoud Y, Nelson WC, Radune D, Romero CM, Sarria S, Selengut J, Shamblin C, Sullivan SA, White O, Yu Y, Zafar N, Zhou L, Fraser CM (2004) Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. Proc Natl Acad Sci U S A 101(39):14246–14251
- OIE (2018) Organização Mundial de Saúde Animal. Terrestrial manual, chapter 2.5.11 – glanders and melioidoses. Disponível em : <http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.05.11_GLANDERS.pdf> Acesso em: 20/12/2018
- Patel JB (2001) 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. Mol Diagn 6:313–321
- Pimentel W (1938) História e organização do serviço veterinário do exército. Revta Milit Med Vet 1(4):283–322
- Schmoock G, Ehrlich R, Melzer F, Rassbach A, Scholz HC, Neubauer H, Sachse K, Mota RA, Saqib M, Elschner M (2009) DNA microarray-based detection and identification of *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia* spp. Mol Cell Probes 23:178–187
- Scholz HC, Joseph M, Tomaso H, al Dahouk S, Witte A, Kinne J, Hagen RM, Wernery R, Wernery U, Neubauer H (2006) 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. Diag Infect Dis 54(4):241–247
- Silva KPC, Mota RA, Cunha AP, Silva LBG, Leal NC, Cavalcante YVN, Teles JAA, Pereira MCC, Freitas NS (2009) Caracterização fenotípica e molecular de amostras de *Burkholderia mallei* isoladas na Região Nordeste do Brasil. Pesqui Vet Bras 29(5):439–444
- Thibault FM, Valade E, Vidal DR (2004) Identification and discrimination of *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei* and *B. thailandensis* by real time PCR targeting type III secretion system genes. J Clin Microbiol 42:5871–5874
- U'ren JM, Van Ert MN, Schupp JM et al (2005) Use of real-time PCR TaqMan assay for rapid identification of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei*. J Clin Microbiol 43:5771–5774

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



MORMO

PERGUNTAS E RESPOSTAS



Marcus Vinícius Dias Falcão

José Givanildo da Silva

Rinaldo Aparecido Mota

MORMO

PERGUNTAS E RESPOSTAS

Recife

UFRPE

2019



Universidade Federal Rural de Pernambuco
Profa. Maria José de Sena – Reitora
Prof. Marcelo Brito Carneiro Leão – Vice-Reitor

Copyright© 2019

Diagramação e impressão:
Editora da Universidade Federal Rural de
Pernambuco

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

F185m Falcão, Marcus Vinícius Dias
Mormo: perguntas e respostas / Marcus Vinícius Dias Falcão,
José Givanildo da Silva, Rinaldo Aparecido Mota. – 1. ed. –
Recife: EDUFRPE, 2019.
33 p.: il.

Inclui referências e apêndice(s).

1. Saúde animal 2. Saúde pública veterinária 3. Educação
médica 4. Bactérias gram-negativas I. Silva, José Givanildo da
II. Mota, Rinaldo Aparecido III. Título

CDD 636.089444

ISBN: 978-85-7946-351-8

MORMO

PERGUNTAS E RESPOSTAS

Marcus Vinícius Dias Falcão
Doutorando do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

José Givanildo da Silva
Doutorando do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Animal
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)

Rinaldo Aparecido Mota
Docente da Disciplina de Doenças Infecciosas,
Departamento de Medicina Veterinária
Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE)



Editora da Universidade Federal Rural de
Pernambuco

Recife
2019

Endereço dos Autores

Marcus Vinícius Dias Falcão, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos (LDIC), Avenida Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife – PE, Brasil, 52171-900, Tel.: 0055 81 3320-6425, <mdfalcao@gmail.com>

José Givanildo da Silva, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos (LDIC), Avenida Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife – PE, Brasil, 52171-900, Tel.: 0055 81 3320-6425, <givanildojgs@gmail.com>

Rinaldo Aparecido Mota, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Departamento de Medicina Veterinária, Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos (LDIC), Avenida Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife – PE, Brasil, 52171-900, Tel.: 0055 81 3320-6427, <rinaldo.mota@hotmail.com>

Agradecimentos

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração desse trabalho. Aos criadores que cederam o espaço e seus animais para o estudo e pesquisa necessários para entendimento dessa enfermidade, um especial agradecimento.

Gostaríamos de registrar nossa estima e reconhecimento às equipes da Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária de Pernambuco (ADAGRO) e a Superintendência Federal de Agricultura de Pernambuco (SFA – PE) por ceder algumas imagens para a confecção dessa cartilha.

Um especial agradecimento ao Prof^o Dr. Rinaldo Aparecido Mota (UFRPE), meu orientador e amigo na graduação até o doutorado, responsável pela colaboração, contribuição intelectual e o apoio imprescindíveis, além dos subsídios essenciais para construção desse trabalho. A Dr^a Vania Lucia de Assis Santana (MAPA) pela parceria e amizade, contribuindo na minha formação laboratorial e de pesquisador desde a graduação até o doutorado e ao doutorando e amigo, José Givanildo da Silva (UFRPE) pela contribuição significativa neste trabalho.

Prefácio

É com grata satisfação que apresento a obra intitulada **MORMO - PERGUNTAS E RESPOSTAS**, escrita por *Marcus Vinícius Dias Falcão, José Givanildo da Silva e Rinaldo Aparecido Mota*.

Fui privilegiada pela oportunidade de apresentar esta obra, que de forma tão concisa e didática traz informações importantíssimas acerca do mormo.

A criação de equídeos é uma atividade importante no Brasil, sobretudo na esfera reprodutiva, do esporte e lazer e ultimamente até na medicina preventiva, curativa e de reabilitação, e ainda exercem tração em algumas regiões onde a mecanização é dificultada ou onerosa.

Nestes últimos anos o mormo ganhou relevância e as experiências que se ganhou por ocasião dos muitos surtos foram aprofundadas; nada mais justo que essas informações e conhecimento sejam difundidos para a comunidade interessada sobre o assunto.

Esta cartilha descreve, com uma redação simples, objetiva e atualizada, através de texto e fotografias, os principais aspectos desta enfermidade, inclusive aborda conceitos do mormo, aspectos históricos, importância e distribuição, aspectos econômicos e epidemiológicos, patogenia, sinais clínicos, diagnóstico e diagnóstico diferencial, tratamento e controle, com o objetivo central de auxiliar no diagnóstico da enfermidade.

O enfoque principal relativo ao tema é que se trata de um texto de consulta, muito valioso para estudantes e profissionais que constantemente lidam com equídeos e que, muitas vezes, estão distantes das informações contidas nas universidades e centros de pesquisa.

Aproveito a oportunidade para parabenizar os autores que se esmeraram a fim de preencher importante lacuna no que tange a esse material, que com certeza será de grande utilidade no meio acadêmico e rural.

Marilene de Farias Brito

Conteúdo

Introdução	9
1. Conceitos do mormo	10
2. Aspectos históricos	10
3. Aspectos econômicos	12
4. Aspectos epidemiológicos	12
5. Patogenia	15
6. Sinais clínicos	16
7. Diagnóstico e diagnóstico diferencial	16
8. Tratamento	21
9. Controle	21
10. Considerações finais	23
11. Referências	24
12. Imagens	27

Introdução

Mormo é uma doença infectocontagiosa responsável por grandes prejuízos econômicos e sanitários aos criadores de equinos, muares e asininos. O primeiro caso, no Brasil, foi relatado em 1811, no entanto entre 1968 e 1999 acreditava-se que a doença havia sido erradicada no país quando, então, surgiram novos casos da doença. Desde então, casos de mormo têm sido identificados no Brasil.

Apesar da possibilidade do ser humano contrair a doença, grande parte da população desconhece esta enfermidade, fato que põe em risco, principalmente, as pessoas que tem contato próximo e direto com os equídeos doentes.

Esse material foi elaborado com o intuito de suprir uma lacuna existente em informações atualizadas sobre o mormo e é destinado, principalmente, a estudantes de Medicina Veterinária, Médicos Veterinários, técnicos agrícolas, criadores de equídeos e profissionais envolvidos com o trato desses animais. Desta forma, esta cartilha traz uma abordagem simples e objetiva a respeito dos diversos aspectos da doença, desde o conceito até as medidas de controle recomendadas.

Espera-se contribuir para a construção e divulgação de conhecimentos a respeito desta importante doença para a saúde animal e humana.

1. Conceitos do mormo

O que é o mormo?

É uma doença infectocontagiosa piogranulomatosa e incurável que determina o aparecimento de lesões respiratórias, linfáticas e cutâneas. Em muitos casos, pode ocasionar corrimento nasal intenso, por isso, o mormo também é conhecido por catarro de burro, catarro de mormo, lamparão, garrotilho atípico ou cancro nasal.

Qual é o seu agente etiológico?

A doença é causada por uma bactéria denominada *Burkholderia mallei*.

2. Aspectos históricos, importância e distribuição

Desde quando a enfermidade é conhecida?

O mormo é uma das doenças mais antigas de equídeos que se tem conhecimento e foi relatada por Hipócrates entre 450 e 452 a.C. Entretanto, apenas em 1862 os pesquisadores Loeffler e Schutz isolaram a bactéria e conseguiram reproduzir a doença em animais.

Qual o histórico do mormo no Brasil?

Em 1811, a ilha de Marajó, Pará, era um importante local de importação de equinos vindos da cidade de Porto, Portugal e, desta forma, o mormo foi introduzido no país. Em 1896 foi registrado um grande surto nos animais utilizados para a tração de

bondes na Companhia Paulista de Viação, fato que resultou no primeiro isolamento da bactéria (*Burkholderia mallei*) no país. Entre os anos de 1908 e 1909 ocorreu uma epidemia que acometeu animais e homens do exército brasileiro que culminou com a criação da primeira escola de Medicina Veterinária em 1910 na cidade do Rio de Janeiro.

Na década de 1960, o mormo foi teoricamente erradicado no Brasil, com os últimos relatos registrados em 1967, no Instituto Vital Brasil, Rio de Janeiro e 1968, em São Lourenço da Mata, Pernambuco. Em 1999, o professor Rinaldo Mota do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco isolou novamente a bactéria causadora do mormo em muarees criados em engenhos de cana-de-açúcar em Pernambuco e Alagoas; esses animais apresentavam doença respiratória e linfática e a reemergência da doença no território nacional foi confirmada pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE). Posteriormente, outros casos da doença foram confirmados no país e atualmente a doença está presente em quase todos os estados da Federação.

Qual a distribuição geográfica do mormo?

No mundo, a doença já foi relatada em alguns países, como os Estados Unidos, França e Alemanha, porém, atualmente segundo dados da OIE, os casos da doença estão restritos a Índia, Irã e Brasil.

Em quais estados brasileiros esta doença já foi diagnosticada?

No Brasil, o mormo está presente em todas as regiões e quase todos os estados já diagnosticaram a doença com exceção para os estados do Acre e Amapá.

3. Aspectos econômicos

Qual o custo econômico para o produtor?

Identificado o foco da doença na propriedade é necessário realizar a sua interdição até a resolução do problema. Os animais serão testados sucessivamente até se obter resultados negativos e os animais positivos serão submetidos à eutanásia. Deste modo, o produtor fica impossibilitado de participar/realizar eventos equestres e comercializar animais, enquanto durar a interdição da propriedade, gerando prejuízos que podem ser elevados ao produtor.

4. Aspectos epidemiológicos

Quais as espécies animais acometidas?

Os animais mais suscetíveis são os equídeos (equinos, muares e asininos). Com menor frequência, os caprinos e ovinos que mantêm contato com animais doentes, além dos carnívoros como cães e gatos por meio da ingestão de carne de animais doentes.

A doença pode ser transmitida para humanos e de que forma?

Sim. Por meio do contato direto com os animais infectados, inalação de aerossóis em ambientes extremamente contaminados ou por feridas na pele, olhos, boca ou nariz que tenham contato com ferimentos contaminados ou secreções dos animais doentes. A transmissão também pode ocorrer por meio da manipulação da bactéria em laboratório que não tem o nível de segurança necessário para trabalhar com microrganismos dessa natureza.

Como o animal é infectado?

O animal se infecta principalmente pela via oral por meio do consumo de água e alimentos contaminados com a bactéria, porém a infecção também pode ocorrer pela via respiratória, por meio da inalação da bactéria presente no ambiente ou pela via cutânea, a partir de feridas na pele ocasionadas por objetos contaminados e/ou contato com outros equídeos que apresentam lesões cutâneas.

Todo animal infectado apresenta doença?

Não. Existe a chamada manifestação subclínica da doença, onde o animal infectado não apresenta sinais clínicos evidentes, porém pode disseminar a bactéria, contaminando o ambiente e contribuindo para a infecção de outros animais suscetíveis.

O sistema de criação (ambiente) interfere na disseminação da doença?

Sim. Os animais que compartilham cochos e bebedouros tem maior chance de se infectarem com a bactéria já que a principal via de infecção é a oral. O compartilhamento de materiais de manejo e de pastos com animais de outras propriedades ou a estabulação excessiva dos animais, propiciam um ambiente favorável para aumentar as chances de disseminação da bactéria na propriedade.

Qual a diferença da manifestação da doença entre os asininos, muares e equinos?

Não há diferença. Normalmente os equinos por serem submetidos a um sistema de criação mais adequado e alimentação de melhor qualidade, demoram mais tempo para manifestar os sinais clínicos (infecção crônica), dificultando o diagnóstico da doença. Muares e asininos por serem submetidos a condições de trabalho mais intensas e alimentação de baixa qualidade, tendem a apresentar os sinais clínicos mais rapidamente (infecção aguda).

Todos os animais doentes morrem?

A doença apresenta alta letalidade, ou seja, a maior parte dos animais infectados morre, mas a morte depende da forma de apresentação da doença (infecção hiperaguda, aguda ou crônica). O animal pode sobreviver por meses ou anos sem apresentar complicações que levem a morte, da mesma forma que pode morrer em poucos dias ou semanas após o início da apresentação clínica.

Quais os fatores de risco associados à doença?

Alguns fatores estão associados à ocorrência da doença como a idade (animais acima de 10 anos), alimentação de baixa qualidade (principalmente com baixo teor de proteínas), compartilhamento de equipamentos de manejo (selas, arreios, cordas, cabrestos), bebedouros e comedouros contaminados e falta de higiene nas instalações. Além disso, a alta carga de trabalho (transporte de cana-de açúcar e práticas esportivas) e participação em eventos com aglomeração de animais (vaquejadas, cavalgadas e feiras) aumentam a chance de o animal se infectar e adoecer.

5. Patogenia

Como ocorre a doença no animal?

A principal via de infecção é a oral. Após a ingestão de alimentos ou água contaminados, a bactéria atinge a corrente sanguínea e se dissemina por todo o corpo do animal. Nessa fase o animal apresenta sinais clínicos inespecíficos como febre, caquexia e apatia.

Os sinais respiratórios como pneumonia piogranulomatosa, dificuldade respiratória, presença de secreção mucopurulenta (catarro) com aparecimento de estrias de sangue surgem após a bactéria atingir os pulmões.

A forma cutâneo-linfática do mormo se dá a partir do aparecimento de nódulos endurecidos nos vasos linfáticos, conhecidos como colar de pérolas, com posterior fistulação e drenagem de conteúdo purulento. Essas lesões tendem a aparecer no

abdômen, costado, pescoço e nos membros pélvicos e torácicos.

Após a infecção, o organismo do animal tenta reagir enviando células de defesa para combater a bactéria no sítio da lesão, mas mesmo com essa reação, o sistema imune do animal não consegue eliminar a bactéria e debelar a infecção.

6. Sinais clínicos

Quais os sinais clínicos mais comuns?

O tempo para o surgimento dos primeiros sinais pode variar de semanas a meses. Os sinais clínicos mais frequentes do mormo são: abscessos (caroços) na pele; corrimento nasal amarelado (catarro) que pode estar associado a presença de estrias de sangue; emagrecimento, úlceras e cicatrizes em forma de estrela na mucosa nasal, tosse e edema (inchaço) nas articulações, prepúcio e abdômen.

7. Diagnóstico e diagnóstico diferencial

Como é feito o diagnóstico do mormo?

O diagnóstico da doença é realizado por meio do histórico animal, dados epidemiológicos da propriedade e da região, associados aos sinais clínicos e aos testes laboratoriais que são definitivos no diagnóstico.

Quais são os testes disponíveis para o diagnóstico do mormo?

Exame Microbiológico, Teste de Fixação do Complemento (TFC), *Western Blotting* (WB); ELISA, Maleinização e a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). No entanto, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são considerados testes oficiais: o TFC que está sendo substituído pelo ELISA até 2020, como teste de triagem. Já o WB é considerado o teste confirmatório para mormo, porém a maleinização e a PCR ainda podem ser utilizadas mediante autorização do MAPA em situações particulares.

O que é diagnóstico microbiológico do mormo?

O exame microbiológico consiste no isolamento e identificação de *Burkholderia mallei* em meios de cultura onde é possível visualizar o crescimento bacteriano com posterior confirmação por meio de provas bioquímicas ou moleculares. A escolha do material utilizado pode influenciar na interpretação dos resultados; amostra mal coletada e contaminada pode resultar em resultado falso negativo. O conteúdo das lesões obtido de órgãos como pulmão, fígado, baço e abscessos cutâneos é considerado o melhor material para realização do exame microbiológico.

O que é o teste de Fixação do Complemento?

É um teste sorológico para detecção de anticorpos, utilizado por muitos anos no diagnóstico do mormo e recomendado pela OIE para trânsito internacional de animais. Segundo a literatura, a confiança no

resultado pode variar de acordo com o antígeno utilizado e a situação epidemiológica da doença na região. É um teste demorado e trabalhoso, exigindo pessoal treinado e laboratório equipado para sua realização.

O que é o teste de *Western Blotting*?

Western Blotting (WB), também conhecido como *Imunoblotting* (IB), é uma técnica bem estabelecida e amplamente utilizada na detecção e análise das proteínas. O método é baseado na construção de um complexo anticorpo-proteína por meio da ligação de anticorpos específicos em proteínas imobilizadas sobre uma membrana e a detecção de anticorpo ligado a partir de vários métodos de detecção. A técnica de IB foi usada como padrão ouro no estudo realizado por Elschner e colaboradores (2011) no qual demonstraram que este teste detecta animais infectados que não apresentam sinais clínicos e aqueles na fase crônica da doença.

O que é o teste de ELISA?

Assim como a técnica de Fixação do Complemento, a técnica de ELISA, ou ensaio de imunoabsorção enzimática, é um teste sorológico, entretanto, sua execução é mais simples e rápida, podendo obter resultados em poucas horas. A leitura das amostras é feita em um leitor de densidade óptica, que assegura e diminui chances de erros na interpretação dos resultados. O ELISA é um teste bastante utilizado no diagnóstico de outras doenças e no caso do mormo foi incluído recentemente como diagnóstico oficial por

meio da portaria nº 22 de 16 de março de 2018 do MAPA.

O que é o teste de Maleinização?

O teste de maleinização foi o primeiro teste desenvolvido para o diagnóstico do mormo, em 1891, por Médicos Veterinários militares russos. Os animais com mormo apresentam reação de dor e inchaço no local da aplicação, assim como febre. A aplicação é feita por via intrapalpebral e a interpretação dos resultados é realizada às 72 horas, sendo a leitura de responsabilidade dos administradores do teste.

Qual a importância da PCR no diagnóstico do mormo?

A PCR é uma valiosa ferramenta de diagnóstico quando se tem o objetivo de confirmar um caso ou realizar pesquisas científicas. Resultados positivos na PCR são incontestáveis, pois o DNA *B. mallei* está presente na amostra analisada, comprovando a presença da bactéria. Entretanto, resultados negativos não são confirmatórios, pois nem sempre existe DNA em quantidade suficiente para detecção na amostra analisada.

Quais as amostras biológicas devem ser coletadas para o diagnóstico do mormo?

Conteúdo de nódulos (caroços) localizados na pele, lavados traqueais, fragmentos de órgãos dos animais que morreram com suspeita de mormo e que foram submetidos à necropsia.

Quem pode coletar amostras para diagnóstico do mormo?

Somente o Médico Veterinário do Serviço Oficial de Defesa Sanitária Animal ou cadastrado pode realizar a coleta de amostras para o diagnóstico do mormo.

Qual o destino dos animais doentes?

Os animais doentes devem ser submetidos à eutanásia na presença de um Médico Veterinário Oficial e de duas testemunhas.

Quais os achados de necropsia dos animais doentes?

Os achados de necropsia são basicamente encontrados no sistema respiratório e pele. São observadas úlceras e cicatrizes em forma de estrela em mucosas nasal, hemorragia e abscessos pulmonares.

No sistema linfático é frequente o aparecimento de nódulos firmes ou amolecidos e cicatrizes na pele, principalmente na região da cabeça, pescoço e membros. Também é comum aparecimento de abscessos em vísceras como fígado e baço.

Todos os animais positivos nos testes de diagnóstico apresentam lesões na necropsia?

Não. Vários estudos demonstram que há fatores que influenciam o aparecimento de lesões na necropsia, sendo um deles o fato de que a doença pode apresentar um curso crônico. Também se acredita que o estado nutricional dos animais pode influenciar o aparecimento das lesões.

Qual o diagnóstico diferencial do mormo?

Toda doença que acometa o sistema respiratório e/ou linfático deve ser considerada como diferencial para o mormo, como o garrotilho (adenite equina), rodococose (*Rodococcus equi*), gripe equina (influenza equina), anemia infecciosa equina (AIE), linfagite ulcerativa (*C. pseudotuberculosis*), melioidose (*B. pseudomallei*) e esporotricose (*Sporothrix schenckii*).

8. Tratamento

Existe tratamento para mormo?

Não. Mesmo que *B. mallei* apresente sensibilidade a diversos antibióticos, quanto testada em laboratório, o tratamento é contraindicado pelo MAPA, devido ao risco de transmissão para humanos, animais e a dificuldade da ação dos medicamentos. Em estudos laboratoriais, já foi comprovada a sensibilidade de *B. mallei* frente a diversos antibióticos. Mesmo assim, o tratamento é proibido, pois a bactéria pode sobreviver dentro dos fagócitos, dificultando a ação dos antibióticos, além do risco para a saúde pública de se manter um animal doente em tratamento.

9. Controle

Existe imunoprofilaxia (vacinação) para mormo?

Não. Apesar de estudos estarem sendo realizados, até o momento não existe vacina eficiente para imunizar os animais suscetíveis.

Por que o animal positivo deve ser sacrificado?

Como não existe tratamento e vacinas, o animal positivo deve ser sacrificado para evitar que outros animais sejam infectados.

Quais as medidas de controle recomendadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento?

Interdição da propriedade com animais positivos para o mormo e eutanásia imediata dos animais positivos. Após a eutanásia as carcaças devem ser incineradas ou enterradas e todas as instalações e utensílios devem ser descontaminados. São realizados exames sorológicos consecutivos para mormo nos outros animais da propriedade interditada com intervalos de 21 a 30 dias. A propriedade será desinterditada após obtenção de dois resultados sorológicos negativos consecutivos nos animais.

Outra medida de controle recomendada trata da participação de animais em eventos hípicas. De acordo com o MAPA só podem participar desses eventos, em estados onde tenham sido confirmados casos de mormo, os equídeos que apresentem comprovante de exame negativo e que não apresentem sinais clínicos da doença.

Equídeos naturais de estados onde foi confirmada a presença da bactéria causadora do mormo só podem transitar em estados livres após a apresentação de

comprovante de exame negativo para a doença e sem sinais clínicos de mormo, sendo que o resultado do exame tem validade de 60 dias a partir da data de colheita da amostra.

10.Considerações finais

O mormo, descrito no Brasil desde 1811 apresenta um grande desafio para os produtores, médicos veterinários e ao Serviço Veterinário Oficial, por ser uma doença de difícil diagnóstico clínico e laboratorial e está presente em todo território nacional, incluindo o distrito federal. Não existe vacinação como medida preventiva e animais diagnosticados como positivos, por se tratar de uma zoonose e não existir tratamento eficaz, devem ser submetidos a eutanásia. Conhecer a epidemiologia da doença, os fatores de riscos associados a presença do mormo na região, realizar o controle dos animais no transporte e na participação de feiras e eventos são medidas essenciais para o controle e erradicação dessa importante enfermidade que acomete os animais e o homem.

11.Referências

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 12 de 29 de janeiro de 2004. **Estabelece os requisitos de qualidade para credenciamento e monitoramento de laboratórios para diagnóstico sorológico do mormo.** Diário Oficial da União de 05 de fevereiro de 2004.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 6 de 16 de janeiro de 2018. **Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional.** Diário Oficial da União de 17 de janeiro de 2018.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 22 de 16 de março de 2018. **Definição dos testes laboratoriais para diagnóstico do mormo.** Diário Oficial da União de 20 de março de 2018.

Dittmann LR, Cardoso TO, Romão FG, Barros, LD. Aspectos clinicopatológicos do mormo em equinos - revisão de literatura. **Almanaque de Medicina Veterinária e Zootecnia.** n. 1, v.1, p.1-5, 2015.

Elschner, MC., Scholz, HC., Melzer, F. et al. Use of Western Blot Technique for the Serodiagnosis of Glanders. **BMC Veterinary Research,** n. 7, v. 4, 2011.

Gregory, BC., Waag, DM. Chapter 6 - Glanders. In: Zygmunt, F. Dembek. Medical Aspects of Biological

Warfare. **Borden Institute Walter Reed Army Medical Center** Washington, DC, p. 121-146, 2007.

Katz, JB., Chieves, LP., Hennager, SG. et al. Serodiagnosis of equine piroplasmiasis, dourine and glanders using an arrayed immunoblotting method. **Journal of Veterinary Diagnosis Investigation**, v.11, p.292 – 627, 1999.

Khan I., Wieler LH., Melzer F. et al. Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of Glanders. **Veterinary Records**, n.169, v.19, p.495, 2011.

Kovalev, GK. Glanders (Review). **ZhMikrobiology Epidemiology Immunobiology**. v.48, p.63–70, 1971.

Megid J, Ribeiro MG, Paes AC. Doenças Infecciosas em Animais de Produção de Companhia. 1ª edição, Editora Roca, p.423-435, 2016.

Mota, RA. Aspectos etiopatológicos, epidemiológicos e clínicos do mormo. **Veterinária e Zootecnia**. v. 13, n. 2, p. 117-124, 2006.

Mota, RA., Brito, MF., Castro, FJC., Massa, M. Mormo em equídeos no estado de Pernambuco e Alagoas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.20. n.4. p.155-159. 2000.

Neubauer H., Sprague LD., Zacharia R. et al. Serodiagnosis of *Burkholderia mallei* infections in horses: state-of-the-art and perspectives. **Journal of Veterinary Medicine [B] Infectious. Disease Veterinary Public Health**. v.52, p.201–205, 2005.

OIE, Organização Mundial de Saúde Animal. Manual terrestre, capítulo 2.5.11 – **Glanders and Milioidosis**, 2018.

12. Imagens



Figura 1: Sinais clínicos em equídeos; **A:** Emagrecimento progressivo, **B:** Lesões ulceradas em plano nasal, **C:** Linfangite em membros posteriores, **D:** Abscesso em vaso linfático. Fonte: Imagens cedidas por Vania L. de A. Santana (2018).

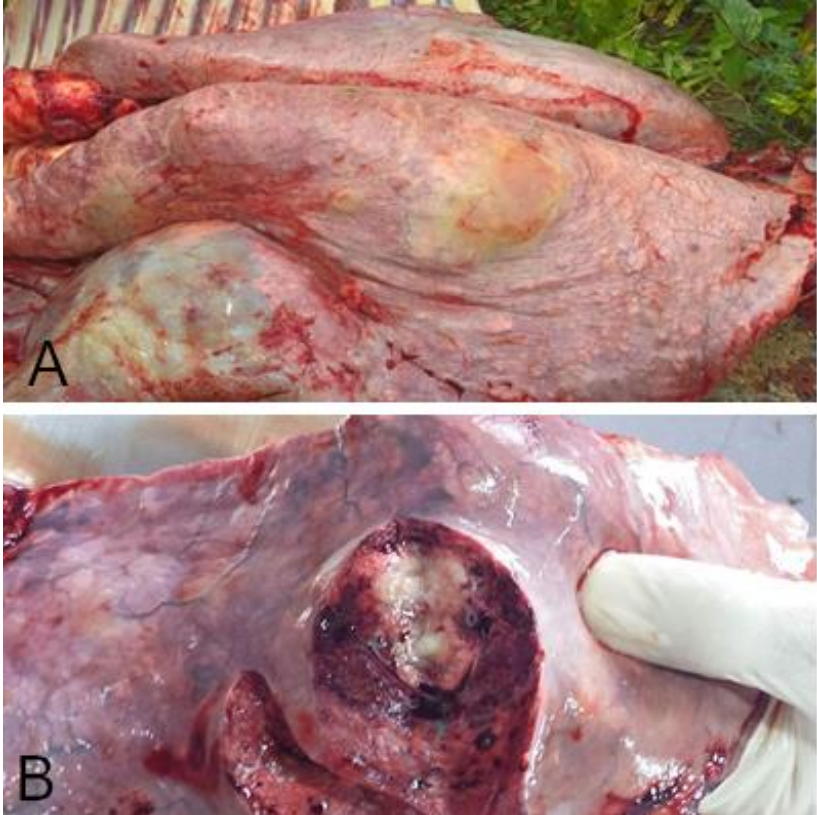


Figura 2: Equino, pulmão. Lesões piogranulomatosas de tamanhos variados e consistência fibrosa. **A:** Nódulos com múltiplos tamanhos e consistência fibrosa, difusamente distribuídos no parênquima pulmonar. **B:** Abertura de um nódulo evidenciando conteúdo purulento e parênquima pulmonar. Fonte: Imagens cedidas por Vania L. de A. Santana (2018).

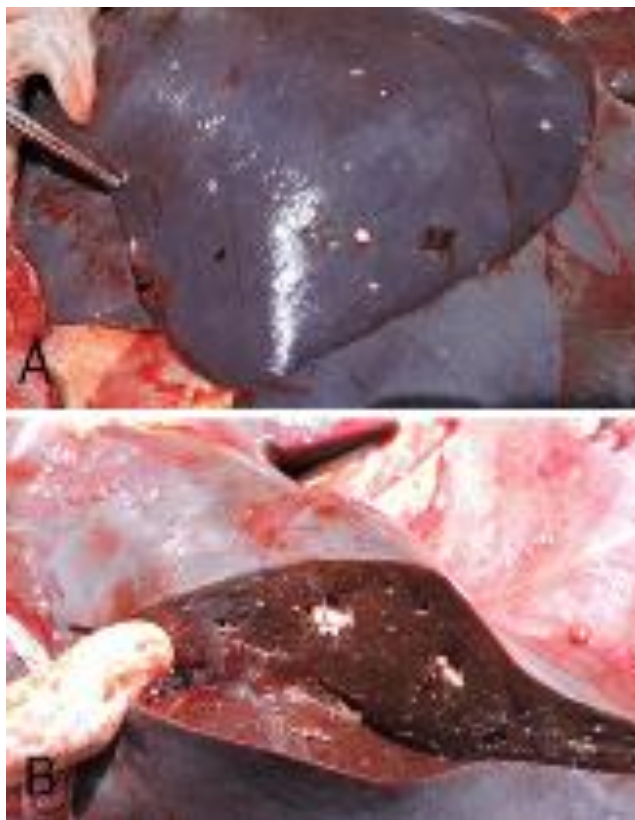


Figura 3: Equino, fígado. Lesões piogranulomatosas
A: Lesões multifocais, **B:** Abertura do piogranuloma evidenciando cápsula fibrosa. Fonte: Imagens cedidas por Vania L. de A. Santana (2018).



Figura 4: Equino positivo para mormo submetido ao teste de maleinização; leitura feita entre 48h – 72h mostrando edema em pálpebra inferior e secreção ocular. Fonte: Mota, RA (2000)

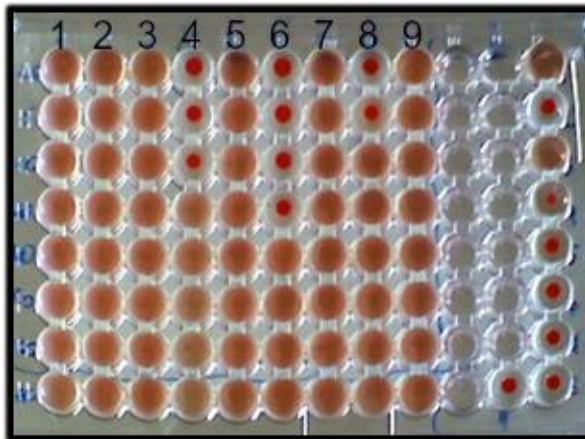


Figura 5: Teste de fixação do complemento (TFC); Soros positivos são vistos nas colunas 4, 6 e 8. Fonte: Arquivo pessoal (2018)

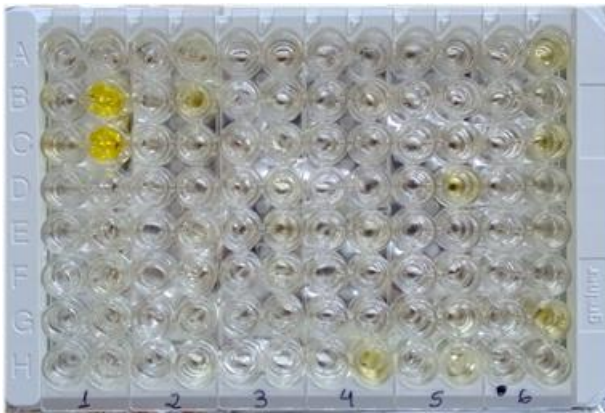


Figura 6: Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA); Soros positivos são vistos nos poços com coloração amarelada. Fonte: Arquivo pessoal (2014)

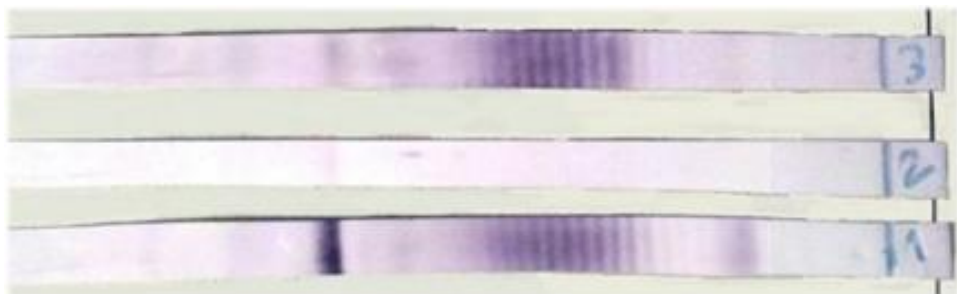


Figura 7: *Western Blot* (WB); A presença e o padrão de bandas evidenciam os soros positivos nas membranas 1 e 3. Fonte: Arquivo pessoal (2018)

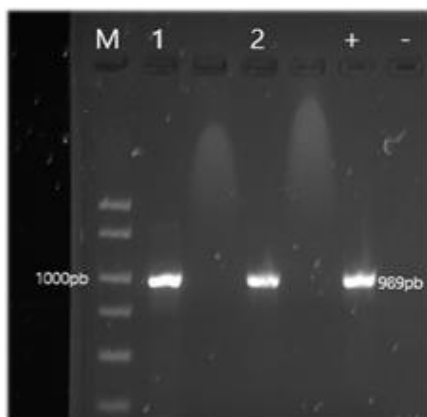


Figura 8: Reação em cadeia da polimerase (PCR); A banda de 989 pb indica presença de DNA de *Burkholderia mallei* na amostra analisada. Fonte: Arquivo pessoal (2018)

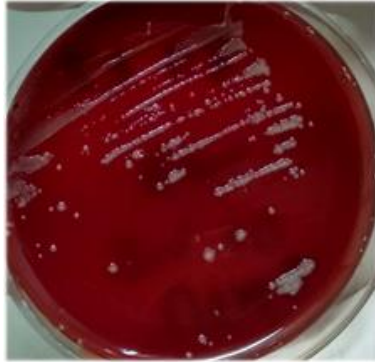


Figura 9: Cultivo microbiológico de *Burkholderia mallei* em Ágar base acrescido de sangue ovino 5 – 7%. Colônias pequenas, mucóides, acinzentadas e não hemolíticas. Fonte: Arquivo pessoal (2018).

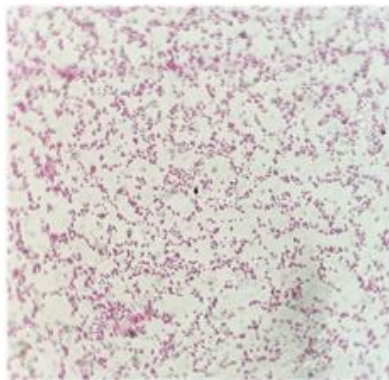


Figura 10: Coloração de Gram do cultivo de *Burkholderia mallei* evidenciando cocobacilos Gram negativos. Fonte: Arquivo pessoal (2018)



ISBN 978-85-7946-351-8



9 788579 463518