

COMUNICADO
TÉCNICO

165

Brasília, DF
Dezembro, 2022

Embrapa

Espectro de massas de referência para identificação de *Burkholderia mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF

Newton Valério Verbisk
Paula Adas Suniga
Cynthia Mantovani
Isadora Inácio Souza
Maria Goretti dos Santos
Flávio Ribeiro de Araújo
Lenita Ramires dos Santos

OBJETIVOS DE DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL



Espectro de massas de referência para identificação de *Burkholderia mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF¹

¹ Newton Valério Verbisck, pesquisador da Embrapa Gado de Corte. Paula Adas Suniga, bolsista Programa MAI/DAI, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Cynthia Mantovani, bolsista Funarbe/Embrapa/ MAPA, Embrapa Gado de Corte. Isadora Inácio Souza, bolsista CNPq, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Maria Goretti dos Santos, técnica da Embrapa Gado de Corte. Flávio Ribeiro de Araújo, pesquisador da Embrapa Gado de Corte. Lenita Ramires dos Santos, pesquisadora da Embrapa Gado de Corte.

Resumo

Burkholderia mallei é uma bactéria Gram-negativa e imóvel, causadora de mormo, doença infecciosa que afeta principalmente cavalos, burros e mulas. No Brasil, o mormo é reconhecido como doença notificável devido ao impacto econômico e zoonótico, uma vez que pode eventualmente ser transmitida a outros animais e humanos. A espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador por tempo-de-vôo (MALDI-TOF) é atualmente a tecnologia mais moderna e eficaz para identificação rápida e confiável de isolados bacterianos. A metodologia MALDI-TOF para identificação segura de *B. mallei* e sua distinção de outras espécies do gênero *Burkholderia*, tais como *B. pseudomallei*, foi estabelecida, com a obtenção de um perfil de espectro principal (MSP, do inglês *Main Spectra Profiles*) de referência para *B. mallei*, no caso a cepa 86/19, previamente isolada

no Instituto Biológico de São Paulo. O MSP foi validado frente a outros espectros de massas de referência e permitiu a identificação confiável de *Burkholderia mallei* por MALDI-TOF.

Palavras-chave: *Burkholderia mallei*, MALDI-TOF, MSP, Mormo, Equino.

Abstract

Burkholderia mallei is a Gram-negative, non-motile bacterium, causative agent of glanders, an infectious disease mainly affecting horses, donkeys and mules. Because its economic and zoonotic impact, glanders is recognized as a notifiable disease in Brazil, since may also be transmitted to other animals and humans. Matrix-assisted laser desorption ionization and time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) is nowadays the most modern and effective technology for fast and

reliable identification of bacterial isolates. MALDI-TOF methodology to achieve reliable identification of B. mallei and its differentiation from other Burkholderia species, as B. pseudomallei, was established by generating a main spectra profile (MSP) as reference for B. mallei strain 86/19, previously isolated at Biological Institute from Sao Paulo, Brazil. Such MSP was validated against other reference mass spectra and allowed reliable MALDI-TOF identification for Burkholderia mallei.

Key-words: Burkholderia mallei, MALDI-TOF, MSP, glanders, equine.

Introdução

Mormo

O mormo é uma doença zoonótica causada por *Burkholderia mallei*, bactéria Gram-negativa, imóvel e intracelular facultativa. Esta enfermidade é de grande importância para a equideocultura, afetando principalmente cavalos, burros e mulas (KETTLE, WERNERY, 2016; PAL et al., 2018).

Ainda que o mormo seja uma doença particularmente de equídeos, os seres humanos e outros animais como camelos, cabras, cães e gatos, entre outros, podem ocasionalmente ser infectados com *B. mallei*, por meio do contato direto com tecidos ou secreções de animais infectados (CDC, 2012).

O mormo em seres humanos é primariamente uma doença ocupacional. Casos esporádicos têm sido observados em veterinários, tratadores de animais e técnicos de laboratório (CDC, 2012). Devido à natureza grave da doença e à falta de opções de tratamento, combinado com o potencial para formação de aerossóis do microrganismo, *B. mallei* é considerada um membro da lista de prioridades de agentes de categoria B do Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (ROTZ et al., 2002), que dá origem à aplicação de medidas sanitárias exclusivas, como o abate de todos os animais positivos. Vale a pena mencionar ainda que o mormo foi utilizado como arma biológica contra a cavalaria na Guerra Civil Americana, na Primeira e Segunda Guerra Mundial (SHARRER, 1995) e que nenhuma vacina está disponível.

Atualmente a prevalência de mormo em todo o mundo é consideravelmente reduzida, mas a doença ainda é endêmica na África, Ásia, Oriente Médio e América Latina, incluindo o Brasil. É preocupante, no entanto, que mormo tenha recuperado o *status* de uma doença reemergente na década passada, com o ressurgimento de focos em um número crescente de países, tais como Brasil, Paquistão, Índia, Mongólia, EAU, Bahrain, Kuwait, Líbano, Síria, Myanmar, Filipinas, Rússia e Afeganistão (ODONTSETSEG et al., 2005; SCHOLZ et al., 2006; NAUREEN et al., 2007; ELSCHNER et al., 2009; HORNSTRA et al., 2009; MALIK et al., 2009; MOTA et al., 2010; WAHID; 2010; WERNERY et al., 2011).

Desde a descrição da reemergência do mormo no Brasil em 1999 (MOTA et al., 2000), a doença vem sendo notificada de forma progressiva nas diversas unidades federativas. A partir disto, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento instituiu Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, na forma de Instrução Normativa (BRASIL, 2018). O programa possui estratégias para educação sanitária, estudos epidemiológicos, fiscalização e controle do trânsito de equídeos, cadastramento, fiscalização e certificação sanitária de estabelecimentos e intervenção imediata quando há suspeita ou ocorrência de doença de notificação obrigatória (IAGRO, 2020). Entretanto, a busca por alternativas rápidas e eficazes para o diagnóstico constitui uma possibilidade a ser considerada no âmbito de pesquisa e desenvolvimento.

MALDI-TOF e identificação de microrganismos

A espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador de massas do tipo tempo-de-voo (MALDI-TOF) é uma metodologia analítica largamente utilizada atualmente em microbiologia para a detecção e identificação de isolados bacterianos de forma rápida, eficiente e confiável (CLARK et al., 2013; TORRES-SANGIAO et al., 2021). Os

espectros de massas gerados refletem o perfil de proteínas majoritárias de um determinado microrganismo, permitindo identificar picos específicos para gêneros e espécies (ANGELETTI, 2016).

A técnica permite a comparação entre espectros de massas de um microrganismo isolado com aqueles disponíveis em um banco de dados referência, composta por espectros de massas de cepas identificadas previamente, possibilitando a classificação taxonômica e identificação de patógenos com mais rapidez do que os métodos convencionais (PATEL, 2015). A velocidade, a robustez e os custos de preparação e medição de amostras tornam esta técnica excepcionalmente adequada para uso rotineiro e de alto rendimento em diagnóstico laboratorial (CROXATTO et al., 2012).

MSP é a sigla do inglês para *Main Spectra Profiles*, ou seja, perfil de espectro principal, e nada mais é do que o padrão ou controle do método para identificação de um microrganismo em nível de espécie. Quanto maior o número de MSPs presentes em um banco de referências, maior o alcance e robustez de identificação do mesmo. Quando os espectros de massas de um microrganismo não são identificados após confronto com os perfis existentes em um banco, seja porque se trata de nova espécie ou porque conhecidamente o banco não possui MSPs para aquele microrganismo, podem-se gerar espectros de referência - MSPs - e incluí-los ao banco. Essa estratégia já foi realizada na Embrapa Gado de Corte para a identificação em nível de

espécie de isolados de *Mycobacterium bovis* (BACANELLI et al., 2019).

Postulou-se, então, que a análise por espectrometria de massas MALDI-TOF poderia permitir a identificação correta de isolados de *B. mallei*, bactéria causadora de mormo, pela distinção de possíveis contaminações com outras bactérias não patogênicas pertencentes ao mesmo gênero. Entretanto, no caso das espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei*, seus espectros de referência não estão disponíveis nos bancos de sistemas MALDI-TOF comerciais, como os do fabricante Bruker Daltonics, atualmente disponíveis na Embrapa, por questões de biossegurança, uma vez que aqueles microrganismos são considerados armas biológicas (LASCH et al., 2015; RUDRIK et al., 2017; BRUKER DALTONICS, 2018).

Neste relato descreve-se a obtenção do espectro de massas de referência para *B. mallei*, a partir da cepa 86/19, isolada no Brasil e previamente caracterizada por sequenciamento genômico, para identificação do agente causador de mormo por espectrometria de massas MALDI-TOF.

Metodologia

Amostras

Foram analisadas amostras da cepa 86/19 de *B. mallei*, proveniente de caso clínico de mormo em um cavalo, ocorrido no estado de São Paulo. O isolamento da cepa 86/19 foi realizado em 2019, a partir de linfonodo daquele animal, pela Dra.

Alessandra Nassar, do Instituto Biológico de São Paulo, o qual cedeu o isolado para este estudo. O genoma da cepa 86/19 foi sequenciado por um grupo de pesquisadores, liderado pelo Dr. Flávio Araújo, da Embrapa Gado de Corte, e depositado no Genbank com o acesso JANCTE000000000 em Agosto de 2022.

Cultivo microbiológico

A cepa 86/19 foi mantida sob cultivo com o meio ágar sangue, contendo 5% de sangue de carneiro disfibrinado e glicerina 1%, sem antibióticos, em estufa a 37°C. Também foi utilizado para subcultivo o meio específico para *B. mallei*, denominado ágar BM, contendo os antibióticos cicloheximida 50 µg/mL, ticarcilina dissódica 16,7 µg/mL, fosfomicina de sódio 197,6 µg/mL, polimixina B 40 U/mL e cristal violeta 3 µg/mL, para eliminação de eventuais contaminantes, conforme descrito por Kinoshita e cols. (2019). Para as análises por espectrometria de massas MALDI-TOF, colônia isolada era semeada em 3 mL de meio líquido BHI e crescida por 24 horas a 37°C com agitação a 150 rotações por minuto.

Espectrometria de massas MALDI-TOF

As amostras bacterianas foram inativadas com etanol conforme descrito por Sauer e cols. (2008). A partir da cultura em meio BHI, 500 µL foram coletados e submetidos a duas lavagens com água tipo I (Milli-Q) estéril por centrifugação a 16.000 g durante 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado celular foi

cuidadosamente misturado em 300 μL de água para ressuspensão completa das bactérias, que em seguida foram inativadas com a adição de 900 μL de etanol absoluto. Esta etapa foi realizada no Laboratório Multiusuário de Biossegurança para a Pecuária - BIOPEC, Embrapa Gado de Corte, em ambiente biocontido com nível de segurança biológica 3.

A extração de proteínas foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Freiwald e Sauer (2009). A solução etanólica contendo as bactérias inativadas foi centrifugada a 16.000 g durante 2 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o conteúdo celular foi extraído a partir do sedimento utilizando-se quantidades iguais de ácido fórmico a 70% (v/v) e acetonitrila pura. Após nova centrifugação a 16.000 g durante 2 minutos, aplicou-se 1 μL do sobrenadante em cada poço de uma placa de aço para MALDI-TOF, deixando-se secar ao ar ambiente. Os poços foram cobertos com 1 μL de ácido α -ciano-4-hidroxi-cinâmico (5 mg/mL) em solução contendo 50% de acetonitrila (v/v) e 2,5% de ácido trifluoracético (v/v). Após secar, a mistura cristalizada foi analisada utilizando-se um espectrômetro de massas Autoflex III Smartbeam (Bruker Daltonics).

A aquisição e análise dos espectros de massas das amostras foram realizadas conforme descrito por Bier e cols. (2017), no laboratório de Proteômica e Espectrometria de Massas em Saúde Animal – PEMS, Embrapa Gado de Corte. Os espectros de massas MALDI-TOF foram adquiridos em modo linear

positivo e razão de massa/carga (m/z) entre 2.000 e 20.000 Daltons. Os parâmetros de aquisição foram tensão da fonte IS1 20 kV, tensão da fonte IS2 de 18,55 kV, tensão de lentes 8,80 kV e tempo de retardo de extração de íons de 240 ns. Espectros de massas de posições diferentes no poço contendo a amostra foram obtidos e somados, até atingir o valor de $0,5-1,0 \times 10^6$ espectros somados. O sistema foi calibrado com a mistura de calibrantes padrão para bactérias BTS, conforme recomendado pelo fabricante (Bruker Daltonics).

Obtenção do MSP para a cepa 86/19 com MALDI Biotyper™

Os espectros de massas obtidos para a cepa 86/19 foram processados utilizando-se o programa computacional MALDI Biotyper™ v.3.1 (Bruker Daltonics), com as configurações padrão. Para identificação baseada nos espectros de massas, os sinais de m/z e respectivas intensidades obtidos para a cepa 86/19 foram confrontados com o banco de MSPs denominado MBT Compass Library DB-7311 (banco de dados v.7.0.0.0), de Fevereiro de 2017 (BRUKER DALTONICS, 2018), com 7311 MSPs para 434 gêneros e 2509 espécies de bactérias, leveduras e fungos, incluindo-se as de 30 espécies diferentes do gênero *Burkholderia*. Dado que o banco DB-7311 não tem MSPs de *B. mallei* e *B. pseudomallei*, todas as análises de identificação com MALDI Biotyper™ foram realizadas após a

inclusão dos seguintes espectros de referência de *B. mallei* e *B. pseudomallei*:

- ***B. mallei* ATCC 23344 RKI** e ***B. pseudomallei* RKI** - MSPs gerados conforme descrito anteriormente (VERBISCK et al., 2020), utilizando-se espectros de massas obtidos por LASCH e cols. (2016) do Robert Koch Institute (RKI), de Berlim, Alemanha, de acesso livre até esta data e disponíveis na plataforma Zenodo (https://zenodo.org/record/163517#.Y1cFr_3MKCh);
- ***B. mallei* 010, *B. mallei* 017, *B. mallei* 176, *B. mallei* Ore, *B. mallei* Flash e *B. pseudomallei* 835 e 2356** - espectros de massas e MSPs gerados por VERBISCK e cols. (2020), sendo todas essas cepas isoladas de casos clínicos suspeitos de mormo anteriormente caracterizados por amplificação gênica quantitativa específica no Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (LFDA-MG).

Na identificação de microrganismos pelo algoritmo do MALDI Biotyper™ foram utilizados os seguintes valores de escore: de 2,300 a 3,000, para identificação confiável de espécie; de 2,000 a 2,299, para identificação confiável de gênero e provável identificação de espécie; de 1,700 a 1,999, para provável identificação de gênero; menor do que 1,700, em que não há identificação confiável de gênero ou espécie.

Para o MSP da cepa 86/19 foram processados 30 espectros de massas, obtidos de amostras de cultivos realizados

em dias diferentes, cujos critérios de seleção foram: i) primeiro resultado de identificação (escore mais alto) sendo MSP de *B. mallei* e ii) valor de escore maior do que 2,000. A lista de 70 sinais m/z com frequência maior do que 50% foi utilizada para a geração do MSP da cepa 86/19, de modo a representar o espectro consenso a ser assumido como referência.

A análise em dendrograma foi produzida utilizando-se os parâmetros padrão do programa com modificações, com a medida de distância determinada por correlação, ligação por peso, orientada por escore e valor limite de escore para microrganismo = 1200. Para controle no dendrograma foi utilizado o MSP de *Lautropia mirabilis*, disponível no banco de referências da Bruker, como grupo externo representando outro gênero da família *Burkholderiaceae*.

Resultados e discussão

A cepa 86/19 foi analisada por MALDI-TOF e o resultado da identificação após MALDI Biotyper™ está apresentado na Tabela 1. Observa-se que somente após a inclusão do MSP da cepa 86/19 ao banco é que os valores de escore resultam acima de 2,300 (colunas sombreadas em verde), ou seja, consistente com identificação confiável em nível de espécie. Esse resultado foi observado para todos os espectros de massas da cepa 86/19 analisados (n=30), conforme esperado, indicando que a inserção do MSP da cepa *B. mallei* 86/19 possibilita a identificação confiável para *B. mallei*.

Convém ressaltar que *B. pseudomallei* foi frequentemente observado como segundo MSP listado, ou seja, antes da inserção do MSP de 86/19 ao banco e com escore geralmente abaixo de 2,300 (Tabela 1). Esse resultado não é inesperado, pois *B. mallei* e *B. pseudomallei* possuem muitas proteínas idênticas e são espécies bastante semelhantes quanto ao perfil de proteínas em MALDI-TOF (KARGER et al., 2012).

Essa observação reforça a importância do controle necessário durante a identificação e cultivo dessas espécies bacterianas. É importante salientar também que não estão disponíveis dados de sequenciamento genômico, por exemplo, para as amostras originais de *B. mallei* e *B. pseudomallei* do RKI e LFDA-MG, ao contrário da cepa *B. mallei* 86/19 aqui analisada.

Tabela 1. Identificação de *B. mallei* por MALDI Biotyper™, antes e após inserção do MSP da cepa 86/19 ao banco de referências.

Amostra da cepa 86/19	1º MSP listado, de maior similaridade	Escore > 2,300	2º MSP listado, segunda maior similaridade	Escore ≤ 2,3
07/07	<i>B. mallei</i> 86/19	2,501	<i>B. pseudomallei</i> 2356	2,039
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,527	<i>B. mallei</i> 010	2,101
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,502	<i>B. pseudomallei</i> 2356	2,062
P2BM	<i>B. mallei</i> 86/19	2,395	<i>B. pseudomallei</i> 2356	2,058
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,327	<i>B. pseudomallei</i> 2356	2,001
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,602	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,083
AS	<i>B. mallei</i> 86/19	2,524	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,143
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,502	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,105
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,492	<i>B. pseudomallei</i> 2356	2,069
B2F	<i>B. mallei</i> 86/19	2,568	<i>B. mallei</i> Ore	2,067
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,566	<i>B. mallei</i> Ore	2,114
B2M	<i>B. mallei</i> 86/19	2,342	<i>B. mallei</i> Ore	2,051
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,565	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,246
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,614	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,245
B4F	<i>B. mallei</i> 86/19	2,536	<i>B. mallei</i> Flash	2,108
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,558	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,252
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,581	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,337
B4M	<i>B. mallei</i> 86/19	2,577	<i>B. mallei</i> Ore	2,089
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,619	<i>B. mallei</i> Ore	2,197
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,514	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,229
M15	<i>B. mallei</i> 86/19	2,508	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,113
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,584	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,246
M16	<i>B. mallei</i> 86/19	2,338	<i>B. mallei</i> 176	2,056
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,518	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,273
M2-11	<i>B. mallei</i> 86/19	2,56	<i>B. mallei</i> Ore	2,101
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,55	<i>B. pseudomallei</i> RKI	2,163
M4-14	<i>B. mallei</i> 86/19	2,343	<i>B. mallei</i> ATCC 23344 RKI	2,066
M7-18	<i>B. mallei</i> 86/19	2,547	<i>B. mallei</i> Flash	2,18
	<i>B. mallei</i> 86/19	2,588	<i>B. mallei</i> Ore	2,216
M8-19	<i>B. mallei</i> 86/19	2,509	<i>B. mallei</i> Flash	2,26

B. mallei 86/19 - MSP gerado neste estudo, descrito na seção de Materiais e Métodos;

B. mallei ATCC 23344 RKI e *B. pseudomallei* RKI - MSPs gerados como descrito por VERBISCK e cols. (2020) utilizando-se espectros de massas de acesso aberto do RKI - Robert Koch Institute, Berlim, Alemanha (LASCH et al., 2016);

B. mallei 010, 176, Ore e Flash e *B. pseudomallei* 2356 – espectros de massas e MSPs gerados conforme descrito (VERBISCK et al., 2020), a partir de cepas de casos clínicos de mormo, isoladas no LFDA-MG – Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais, Brasil.

Com o objetivo de caracterizar o MSP da cepa 86/19 de *B. mallei* foi realizada análise comparativa por dendrograma com os MSPs disponíveis no banco para *B. mallei* e *B. pseudomallei* (Figura 1). Conforme esperado, todos os MSPs para as espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei* são observados no mesmo cluster, separados do grupo externo *L. mirabilis*. Pode-se verificar na Figura 1 que o MSP da cepa 86/19 de *B. mallei* situou-se em um grupo próprio, com alguma distância das clades formadas pelos MSPs de *B. mallei* e *B. pseudomallei* do RKI (azul) e do LFDA-MG (vermelho). Esse resultado indica que o MSP da cepa 86/19 apresenta relativa distância ou variabilidade no perfil de

proteínas quando comparado com os MSPs do RKI e LFDA-MG. Sabe-se que amostras originadas em diferentes locais podem apresentar variabilidade no perfil de proteínas (DHIEB et al., 2015; ROTHEN et al., 2019; BRIDEL et al., 2020; GIRAUD-GATINEAU et al., 2021), que pode não ter sido ainda observada ou relatada por MALDI-TOF quando o número de MSPs do banco, disponíveis para a espécie, é pequeno, como é este o caso para *B. mallei*. Por outro lado, os resultados sugerem também que *B. mallei* pode apresentar variação fenotípica em nível de cepas, a exemplo de outras espécies bacterianas para as quais isso já foi observado por MALDI-TOF, conforme revisto por SANDRIN e cols. (2013).

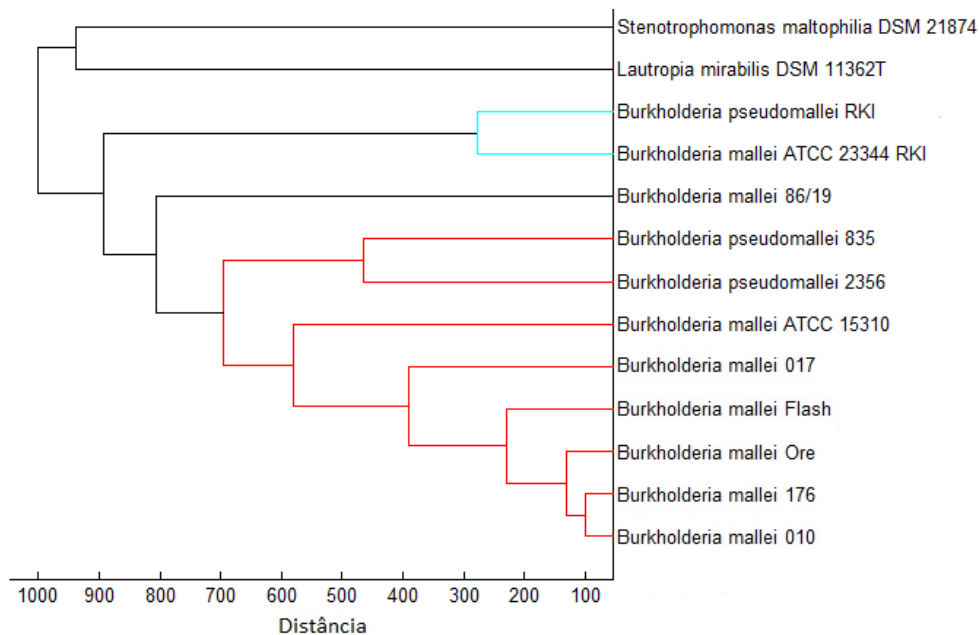


Figura 1. Dendrograma de similaridade do MSP da cepa *B. mallei* 86/19 frente aos demais MSPs de *B. mallei* e *B. pseudomallei* disponíveis no banco de MSPs da Embrapa Gado de Corte. Em azul a clade com os MSPs obtidos a partir de espectros de massas do RKI, Berlim, Alemanha (LASCH et al., 2016). Em vermelho as clades dos MSPs dos isolados clínicos *B. pseudomallei* e *B. mallei* do LFDA-MG (VERBISCK et al., 2020). O MSP de *Lautropia mirabilis*, representando outro gênero da família *Burkholderiaceae*, foi utilizado como grupo externo.

Na análise de dendrograma foi incluído ainda o MSP para a espécie *Stenotrophomonas maltophilia*, Gram negativa, assim como *B. mallei*, porém pertencente a outra classe de bactérias (Gammaproteobacteria, família Xanthomonadaceae), relativamente distante taxonomicamente. O motivo dessa inclusão foi o achado de que isolados dessa espécie foram frequentemente detectados como contaminantes durante isolamento de *B. mallei* a partir de casos clínicos suspeitos de mormo (dados não mostrados). A partir da Figura 1 é possível notar que os perfis de proteínas de *B. mallei* e *S. maltophilia* são bastante distintos, conforme esperado, indicando que MALDI-TOF pode ser utilizado para monitorar o processo de isolamento de *B. mallei* por cultivo microbiológico.

Em conjunto estes resultados indicam que o MSP da cepa *B. mallei* 86/19 pode ser utilizado para a identificação de *B. mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF, conforme já descrito na literatura (DREVINEK et al., 2012; KARGER et al., 2012; LASCH et al., 2015; SUTTISUNHAKUL et al., 2017; RUDRIK et al., 2017).

Paralelamente, os dados obtidos neste estudo para identificação de *B. mallei* refletem a importância de utilizar amostras de microrganismos com os genomas sequenciados e, de preferência, cultivados localmente, para que não haja dúvida de identificação no MALDI Biotyper™. Por outro lado, a análise de mais amostras, de outras cepas de *B. mallei* e *B. pseudomallei*, é

interessante e necessária para aumentar cada vez mais a robustez das análises e a confiabilidade dos resultados de identificação com espectrometria de massas MALDI-TOF.

Conclusões

A obtenção do espectro de referência - MSP - para a cepa 86/19 de *Burkholderia mallei* possibilitou avanço na identificação da espécie bacteriana causadora de mormo, por meio de espectrometria de massas MALDI-TOF, uma vez que: i) a cepa está disponível para cultivo localmente; ii) teve o seu genoma sequenciado para afastar qualquer dúvida de identidade genotípica e taxonômica; iii) o perfil de proteínas foi validado frente a outros MSPs das espécies *B. mallei* e *B. pseudomallei*. Entretanto, a certificação desta metodologia dependerá da análise e caracterização de mais amostras de isolados clínicos de *B. mallei* e *B. pseudomallei*.

Referências

- ANGELETTI, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. **J Microbiol Methods**, v. 138, p. 20-29, 2016.
- BACANELLI, G.; OLARTE, L.; SILVA, M.; et al. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight mass spectrometry identification of Mycobacterium bovis in Bovinae. **J Vet Med Sci**, v. 81, p. 1400-1408, 2019.
- BIER, D.; TUTIJA, J.F.; PASQUATTI, T.N.; et al. Identificação por espectrometria de massa MALDI-TOF de Salmonella spp. e Escherichia coli isoladas de carcaças bovinas. **Pesq Vet Brasileira**, v. 37, p. 1373-1379, 2017.

BRASIL. Instrução Normativa N°6, de 16 de janeiro de 2018. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, 2018.

BRIDEL, S.; BOURGEON, F.; MARIE, A.; SAULNIER, D.; PASEK, S.; et al. Genetic diversity and population structure of *Tenacibaculum maritimum*, a serious bacterial pathogen of marine fish: from genome comparisons to high throughput MALDI-TOF typing. **Vet Res**, v. 51, p. 60-76, 2020.

BRUKER DALTONICS. Release Notes, Abril de 2018. Disponível em: [https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=ftp://ftp.bdal.de/data/Support/TOF/MaldiBiotyper/Version 8.0.0.0/MaldiBiotyperDBUpdate_V8.0.0.0_7311-7854\(RUO\)_Release-Notes.pdf&ved=2ahUKEwj6kZTNm_zsAhXoH7kGHe7pDCUQFjABegQIAhAB&usq=AOvVaw1NMu9xEGAUPI92f1CM6bDV](https://www.google.com/url?sa=t&source=web&rct=j&url=ftp://ftp.bdal.de/data/Support/TOF/MaldiBiotyper/Version%208.0.0.0/MaldiBiotyperDBUpdate_V8.0.0.0_7311-7854(RUO)_Release-Notes.pdf&ved=2ahUKEwj6kZTNm_zsAhXoH7kGHe7pDCUQFjABegQIAhAB&usq=AOvVaw1NMu9xEGAUPI92f1CM6bDV).

CDC-CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Glanders, Transmission. 2012. Disponível em: <<<https://www.cdc.gov/glanders/transmission/index.html>>> Acesso em 28 de Fev. 2018.

CLARK, A.; KALETA, E.; ARORA, A.; et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology. **Clin Microbiol Rev**, v. 26, p. 547-603, 2013.

CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol Rev**, v. 36, p. 380-407, 2012.

DHIEB, C.; NORMAND, A.C.; AL-YASIRI, M.; CHAKER, E.; et al. MALDI-TOF typing highlights geographical and fluconazole resistance clusters in *Candida glabrata*. **Med Mycol**, v. 53, p. 462-469, 2015.

DREVINEK, M.; DRESLER, J.; KLIMENTOVA, J.; et al. Evaluation of sample preparation methods for MALDI-TOF MS identification of highly dangerous bacteria. **Lett Appl Microbiol**, v. 55, p. 40-46, 2012.

ELSCHNER, M.; KLAUS, C.; LIEBLERTENORIO, E.; et al. *Burkholderia mallei* infection in a horse imported from Brazil. **Equine Vet Education**, v. 21, p. 147-150, 2009.

FREIWALD, A. & SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by

mass spectrometry. **Nat Protocols**, v. 4, p. 732-742, 2009.

GIRAUD-GATINEAU, A.; TEXIER, G.; FOURNIER, P.E.; et al. Using MALDI-TOF spectra in epidemiological surveillance for the detection of bacterial subgroups with a possible epidemic potential. **BMC Infect Dis**, v. 21, p. 1109-1118, 2021.

HORNSTRA, H.; PEARSON, T.; GEORGIA, S.; et al. Molecular epidemiology of glanders, Pakistan. **Emerg Inf Diseases**, v. 15, p. 2036-2039, 2009.

IAGRO – Mormo. Disponível em: www.iagro.ms.gov.br/mormo. Consultado em 09/11/2020.

KARGER, A.; STOCK, R.; ZILLER, M. et al. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 229, 2012.

KETTLE, A. N. B.; WERNERY, U. Glanders and the risk for its introduction through the international movement of horses. **Equine Vet J**, v. 48, p. 654-658, 2016.

KINOSHITA, Y.; CLOUTIER, A.K.; ROZAK, D.A.; KHAN, M. S. R.; et al. A novel selective medium for the isolation of *Burkholderia mallei* from equine specimens. **BMC Vet Res**, v. 7, 133-139, 2019.

LASCH, P.; WAHAB, T.; WEIL, S.; et al. Identification of Highly Pathogenic Microorganisms by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Results of an Interlaboratory Ring Trial. **J Clin Microbiol**, v. 53, p. 2632-2640, 2015.

LASCH, P.; STÄMMLER, M. & SCHNEIDER, A. A MALDI-TOF Mass Spectrometry Database for Identification and Classification of Highly Pathogenic Microorganisms from the Robert Koch-Institute (RKI) [Data set]. **Zenodo**, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/zenodo.163517>

MALIK, P.; KHURANA, S.; SINGH, B.; et al. Recent outbreak of glanders in India. **Indian J Animal Sciences**, v. 79, p. 1015-1017, 2009.

MOTA, R. A.; BRITO, M. F.; CASTRO, F. J. C.; et al. Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. **Pesq Vet Brasileira**, v. 20, p.155-159, 2000.

- MOTA, R. A.; DA FONSECA OLIVEIRA, A. A.; DA SILVA, A. M.; et al. Glanders in donkeys (*Equus asinus*) in the state of Pernambuco, Brazil: A case report. **Braz J Microbiology**, v. 41, p.146-149, 2010.
- NAUREEN, A.; SAQIB, M.; MUHAMMAD, G.; et al. Comparative evaluation of Rose Bengal plate agglutination test, mallein test, and some conventional serological tests for diagnosis of equine glanders. **J Vet Diag Investigation**, v. 19, p. 362-367, 2007.
- ODONTSETSEG, N.; MWEENE, A. S.; KIDA, H. Viral and bacterial diseases in livestock in Mongolia. **Jap J Vet Research**, v. 52, p. 151-162, 2005.
- PAL, V.; SAXENA, A.; SINGH, S.; et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Burkholderia mallei*. **Transb Emerg Disease**, v. 65, n. 1, 2018.
- PATEL, R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. **Clin Chemistry**, v. 61, p. 100-111, 2015.
- ROTHEN, J.; POTHIER, J.F.; FOUCAULT, F.; BLOM, J.; NANAYAKKARA, D.; et al. Subspecies Typing of *Streptococcus agalactiae* Based on Ribosomal Subunit Protein Mass Variation by MALDI-TOF MS. **Front Microbiol**, v. 10, a. 471, 2019.
- ROTZ, L. D.; KHAN, A. S.; LILLIBRIDGE, S. R.; et al. Public health assessment of potential biological terrorism agents. **Emerg Infec Diseases**, v. 8, p. 225-230, 2002.
- RUDRIK, J. T.; SOEHNLEN, M. K.; PERRY, M. J.; et al. Safety and Accuracy of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Highly Pathogenic Organisms. **J Clin Microbiol**, v. 55, p. 3513-3529, 2017.
- SANDRIN, T.R.; GOLDSTEIN, J.E.; SCHUMAKER, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. **Mass Spectrom Rev**. v. 32, p. 188-217, 2013.
- SAUER, S.; FREIWALD, A.; MAIER, T.; et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. **PLoS One**; v. 30, p. e2843, 2008.
- SCHOLZ, H. C.; JOSEPH, M.; TOMASO, H.; et al. Detection of the reemerging agent *Burkholderia mallei* in a recent outbreak of glanders in the United Arab Emirates by a newly developed fliPbased polymerase chain reaction assay. **Diag Microbiol Infec Disease**, v. 54, p. 241-247, 2006.
- SHARRER, G.T. The great glanders epizootic, 1861-1866: a Civil War legacy. **Agric Hist.**, v. 69, p. 79-97, 1995.
- SUTTISUNHAKUL, V.; PUMPUANG, A.; EKCHARIYAWAT, P.; et al. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry for the identification of *Burkholderia pseudomallei* from Asia and Australia and differentiation between *Burkholderia* species. **PLoS One**. v. 12, p. e0175294, 2017.
- TORRES-SANGIAO, E.; LEAL RODRIGUEZ, C.; GARCÍA-RIESTRA, C. Application and Perspectives of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. **Microorganisms**, v. 20, p. 1539-1557, 2021.
- VERBISCK, N.; ARAUJO, F.; GASPARE, E.; FONSECA JÚNIOR, A.; et al. Caracterização e identificação de *Burkholderia mallei* por espectrometria de massas MALDI-TOF: resultados de um estudo piloto. Campo Grande, MS: Embrapa Gado de Corte, **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, v. 47, 26 p., 2020. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/218586/1/Caracterizacao-identificacao-Burkholderia.pdf>
- WAHID, World Animal Health Information Database Interface. 2010.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Corte
Av. Rádio Maia, 830
79106-550, Campo Grande, MS
Fone: (67) 3368-2000
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
1ª edição (2022): eletrônica



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

Comitê Local de Publicações da Embrapa Gado de Corte

Presidente

Rodrigo Amorim Barbosa

Secretário-Executivo

Rodrigo Carvalho Alva

Membros

Alexandre Romeiro de Araújo, Davi José
Bungenstab, Fabiane Siqueira, Gilberto
Romeiro de Oliveira Menezes, Luiz Orcício
Fialho de Oliveira, Marcelo Castro Pereira,
Mariane de Mendonça Vilela, Marta Pereira
da Silva, Mateus Figueiredo Santos, Vanessa
Felipe de Souza

Supervisão editorial

Rodrigo Carvalho Alva

Revisão de texto

Rodrigo Carvalho Alva

Tratamento das ilustrações

Rodrigo Carvalho Alva

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbêiro

Editoração eletrônica

Rodrigo Carvalho Alva

Foto da capa

Newton Valério Verbisck