

## EXTRATO

### 1º TERMO ADITIVO AO TERMO DE EXECUÇÃO DESCENTRALIZADA 01/2022

Processo nº 21000.096801/2022-56

Espécie: 1º Termo Aditivo ao Termo de Execução Descentralizada MAPA/SDA-DSA nº 01/2022, que entre si celebram a União Federal, por intermédio do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, CNPJ nº 00.396.895/0001-25, através da Secretaria de Defesa Agropecuária -SDA e o Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte – EMBRAPA – Gado de Corte, CNP – CNPJ nº 00.348.003/0046-12.

Objeto: a) atualizar cláusulas de vigência, passando de **29/12/2025 para 29/12/2026** e adequação do cronograma físico de execução, do TED nº 01/2022, que tem como objeto o Estudo do mormo no Brasil - caracterização de cepas e antígenos.

Assinaturas: 29 de dezembro de 2025. Prazo de vigência: Início: 48 (trinta e seis) meses, contados a partir da data de sua assinatura, TED ([25897444](#)), podendo ser prorrogado de acordo com o disposto no art. 10 do Decreto nº 10.426, de 2020.

Signatários: pela Unidade Descentralizadora, Allan Rogério de Alvarenga, CPF/MF nº ....549....-90, Secretário Adjunto de Defesa Agropecuária, do Ministério da Agricultura e Pecuária e pela Unidade Descentralizada: Antonio do Nascimento Ferreira Rosa, Chefe Geral - Embrapa Gado de Corte , CPF: ....960....-49 e Luiz Orcirio Fialho de Oliveira - CPF/MF nº 424.613.836-34 - Chefe Geral da Embrapa Gado de Corte e Sandro Silvio Pinheiro, Chefe Adjunto de Administração - CPF/MF nº ....977.....-68.



MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA

**TERMO ADITIVO Nº 01/2025**

**1º TERMO ADITIVO AO TERMO  
DE EXECUÇÃO  
DESCENTRALIZADA Nº 01/2022, A  
SER CELEBRADO ENTRE O MAPA,  
POR MEIO DA SECRETARIA DE  
DEFESA AGROPECUÁRIA E  
O CENTRO NACIONAL DE PESQUISA  
DE GADO DE CORTE (EMBRAPA),  
TENDO COMO OBJETO O ESTUDO DO  
MORMO NO BRASIL -  
CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS E  
ANTÍGENOS**

O **MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA**, por intermédio da Secretaria de Defesa Agropecuária, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 00.396.895/0001-25, com sede na Esplanada dos Ministérios, Bloco “D”, Anexo B, 4º andar, sala 406, Brasília/DF, representado neste ato pelo Secretário Adjunto da Secretaria de Defesa Agropecuária, Sr. Allan Rogério de Alvarenga, com endereço na Esplanada dos Ministérios, Bloco “D”, Anexo B, 4º andar, sala 406, Brasília/DF, portador do CPF nº 097.549.427-90, nomeado pela Portaria nº 3.057, publicada no DOU de 01 de novembro de 2023, Edição 208, Seção 2, Página 1, mediante competência delegada pela Portaria MAPA nº 670, de 8 de abril de 2024, publicada no Diário Oficial da União de 26 de abril de 2024 e o Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte (Embrapa Gado de Corte), CNPJ:00348003004612, através do Chefe Geral, Antonio do Nascimento Ferreira Rosa, CPF: 166.960.266-49, com Ato de Delegação de Competência de Deliberação Portaria Embrapa Nº 2029, de 19 de dezembro de 2022, associada à portaria de designação do Chefe Geral nº 1046 de 26 de outubro de 2020, BCA 50/2020 e do Chefe Adjunto de Administração, Sandro Silvio Pinheiro, CPF nº 773.977.381-68, associada à portaria de designação do Chefe de Administração nº 1536, de 22 de agosto de 2022, BCA 45/2022, e fundamentado com o disposto no art. 10 do Decreto nº 10.426, de 2020, celebram este 1º Termo Aditivo ao Termo de Execução Descentralizada nº 01/2022, processo SEI 21000.096801/2022-56, com o objetivo de: a) atualizar cláusulas de vigência, passando de 29/12/2025 para 29/12/2026 e adequação do cronograma físico de execução, nos termos da atualização que segue:

**1º Termo Aditivo ao Termo de Execução Descentralizada nº 01/2022 (25897444)**

## **1. DADOS CADASTRAIS DA UNIDADE DESCENTRALIZADORA**

### **1.1. Unidade Descentralizadora e Responsável**

Nome do órgão ou entidade descentralizador(a): Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e Pecuária

Nome da autoridade competente: Allan Rogério de Alvarenga

Número do CPF: 097.549.427-90

Nome da Secretaria/Departamento/Unidade Responsável pelo acompanhamento da execução do objeto do TED: Secretaria de Defesa Agropecuária, por meio do seu Departamento de Saúde Animal.

Identificação do Ato que confere poderes para assinatura: Portaria Ministerial nº 3.057, de 31 de outubro de 2023, publicada no Diário Oficial da União seção 2 página 1 de 01 de novembro de 2023 e da delegação de competência conferida pela Portaria MAPA nº 670, de 8 de abril de 2024.

### **1.2. UG SIAFI**

Número e Nome da Unidade Gestora - UG que descentralizará o crédito: UG: 130007 – Gestão 0001 – Secretaria de Defesa Agropecuária-SDA/MAPA

Número e Nome da Unidade Gestora responsável pelo acompanhamento da execução do objeto do TED: UG: 130007 – Gestão 0001 – Secretaria de Defesa Agropecuária-SDA/MAPA.

## **2. DADOS CADASTRAIS DA UNIDADE DESCENTRALIZADA**

## **2.1. Unidade Descentralizada e Responsável**

Nome do órgão ou entidade descentralizada: Razão Social: Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte. Nome Fantasia: Embrapa Gado de Corte. CNPJ:00348003004612. Inscrição Estadual: 28210307-4.

Nome da autoridade competente (Chefe Geral): Antonio do Nascimento Ferreira Rosa

Número do CPF: 166.960.266-49.

Nome da autoridade competente (Chefe Adjunto de Administração): Sandro Silvio Pinheiro

Número do CPF: 773.977.381-68

Nome da Secretaria/Departamento/Unidade Responsável pela execução do objeto do TED:  
EMBRAPA/CNPGC 135017

Identificação do Ato que confere poderes para assinatura:

Ato de Delegação de Competência do Chefe Geral: Portaria Embrapa Nº 2029, de 19 de dezembro de 2022, associada a portaria de designação do Chefe Geral nº 1046 de 26 de outubro de 2020, BCA 50/2020.

Associada à portaria de designação do Chefe de Administração nº 1536, de 22 de agosto de 2022, BCA 45/2022.

## **2.2. UG SIAFI**

Número e Nome da Unidade Gestora - UG que receberá o crédito: EMBRAPA/CNPGC 135017

Número e Nome da Unidade Gestora - UG Responsável pela execução do objeto do TED:  
EMBRAPA/CNPGC 135017

## **3. OBJETO DO TERMO DE EXECUÇÃO DESCENTRALIZADA**

Estudo do mormo no Brasil - caracterização de cepas e antígenos

## **4. OBRIGAÇÕES E COMPETÊNCIAS DOS PARTÍCIPES**

### **4.1. Unidade Descentralizadora**

- I - analisar e aprovar a descentralização de créditos;
- II - analisar, aprovar e acompanhar a execução do Plano de Trabalho;
- III - descentralizar os créditos orçamentários;
- IV - repassar os recursos financeiros em conformidade com o cronograma de desembolso;
- V - aprovar a prorrogação da vigência do TED ou realizar sua prorrogação, de ofício, quando necessário;
- VI - aprovar as alterações no TED;
- VII - solicitar Relatórios parciais de Cumprimento do Objeto ou outros documentos necessários à comprovação da execução do objeto, quando necessário;
- VIII - analisar e manifestar-se sobre o Relatório de Cumprimento do Objeto apresentado pela Unidade Descentralizada;
- IX - solicitar à Unidade Descentralizada que instaure a tomada de contas especial, ou promover diretamente a instauração, quando cabível;
- X - emitir certificado de disponibilidade orçamentária;
- XI - registrar no SIAFI o TED e os aditivos, mantendo atualizada a execução até a conclusão;
- XII - prorrogar de ofício a vigência do TED quando ocorrer atraso na liberação de recursos, limitado ao prazo do atraso;
- XIII - publicar os extratos do TED e termos aditivos no sítio eletrônico oficial, bem como disponibilizar a íntegra do TED celebrado e do Plano de Trabalho atualizado, no prazo de vinte dias, contado da data da assinatura;
- XIV - designar os agentes públicos federais que atuarão como gestores titulares e suplentes do TED, no prazo de vinte dias, contado da data da celebração do TED, devendo o ato de designação ser publicado no sítio eletrônico oficial;
- XV - instaurar tomada de contas especial, quando cabível e a unidade descentralizada não o tenha feito no prazo para tanto, e;
- XVI - suspender as descentralizações, na hipótese de verificação de indícios de irregularidades durante a execução do TED, com a tomada das providências previstas no art. 19 do Decreto nº 10.426/2020.

#### **4.2. Unidade Descentralizada**

- I - elaborar e apresentar o Plano de Trabalho;
- II - apresentar a Declaração de Capacidade Técnica necessária à execução do objeto;
- III - apresentar a Declaração de Compatibilidade de Custos;
- IV - executar os créditos orçamentários descentralizados e os recursos financeiros recebidos;
- V - aprovar as alterações no TED;
- VI - encaminhar à Unidade Descentralizadora:
  - a) Relatórios parciais de Cumprimento do Objeto, quando solicitado; e
  - b) o Relatório final de Cumprimento do Objeto;
- VII - zelar pela aplicação regular dos recursos recebidos e assegurar a conformidade dos documentos, das informações e dos demonstrativos de natureza contábil, financeira, orçamentária e operacional;
- VIII - citar a Unidade Descentralizadora quando divulgar dados, resultados e publicações referentes ao objeto do TED, quando necessário;
- IX - instaurar tomada de contas especial, quando necessário, e dar conhecimento dos fatos à Unidade Descentralizadora;
- X- devolver à Unidade Descentralizadora os saldos dos créditos orçamentários descentralizados e não empenhados e os recursos financeiros não utilizados, conforme disposto no § 1º do art. 7º do Decreto nº 10.426, de 16 de julho de 2020;
- XI - devolver os créditos orçamentários e os recursos financeiros após o encerramento do TED ou da conclusão da execução do objeto, conforme disposto no § 2º do art. 7º do Decreto nº 10.426, de 2020;
- XII - disponibilizar no sítio eletrônico oficial a íntegra do TED celebrado e do Plano de Trabalho atualizado, no prazo de vinte dias, contado da data da assinatura;
- XIII - devolver para a Unidade Descentralizadora os rendimentos de aplicação financeira auferidos em parcerias celebradas com recursos do TED, nas hipóteses de restituição previstas na legislação específica;
- XIV - designar os agentes públicos federais que atuarão como gestores titulares e suplentes do TED, no prazo de vinte dias, contado da data da celebração do TED, devendo o ato de designação ser publicado no sítio eletrônico oficial, e;
- XV - disponibilizar, mediante solicitação, documentos comprobatórios da aplicação regular dos recursos aos órgãos de controle e à unidade descentralizadora.

## **5. VIGÊNCIA**

O prazo de vigência do Termo de Execução Descentralizada, ora aditado em 12 (doze) meses, passa a ser de 48 (quarenta e oito meses) meses, contados a partir da data de assinatura do TED (25897444), podendo ser prorrogado de acordo com o disposto no art. 10 do Decreto nº 10.426, de 2020.

**Início: 29/12/2022 Fim: 29/12/2026**

## **6. VALOR DO TED:**

R\$ 2.873.488,28

## **7. CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL PROGRAMÁTICA**

SUBFUNÇÃO 604 DEFESA SANITÁRIA ANIMAL

## **8. BENS REMANESCENTES**

O Objeto do Termo de Execução Descentralizada contempla a aquisição, produção ou construção de bens?

( ) Sim

( x ) Não

Se sim, informar a titularidade e a destinação dos bens quando da conclusão do TED.

## **9. DAS ALTERAÇÕES**

Ficam os partícipes facultados a alterar o presente Termo de Execução Descentralizada ou o respectivo Plano de Trabalho, mediante termo aditivo, vedada a alteração do objeto do objeto aprovado.

As alterações no plano de trabalho que não impliquem alterações do valor global e da vigência do TED poderão ser realizadas por meio de apostila ao termo original, sem necessidade de celebração de termo aditivo, vedada a alteração do objeto aprovado, desde que sejam previamente aprovados pelas unidades descentralizadora e descentralizada.

## **10. DA AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS**

A Unidade Descentralizada apresentará relatório de cumprimento do objeto conforme previsto no art. 23 do decreto nº 10.426, de 2020, cuja análise ocorrerá pela Unidade Descentralizadora nos termos do art. 24 do mesmo normativo.

Rejeitado total ou parcialmente o relatório de cumprimento do objeto pela Unidade Descentralizadora, deverá a unidade descentralizada instaurar tomada de contas especial para apurar eventuais danos ao erário e respectivos responsáveis para fins de recomposição do erário público.

### ***Observações:***

*Os partícipes do TED podem prever que, além da obrigatoriedade tomada de providências para recomposição ao erário, que eventual rejeição do relatório de cumprimento do objeto poderá (ou deverá) gerar ajustes no Plano de Trabalho, inclusive para fins de previsão de prestação alternativa, se houver interesse e viabilidade para tanto, desde que enquadrados nas hipóteses do art. 3º do Decreto nº 10.426/2020.*

## **11. DA DENÚNCIA OU RESCISÃO**

### **11.1. Denúncia**

O Termo de Execução Descentralizada poderá ser denunciado a qualquer tempo, hipótese em que os partícipes ficarão responsáveis somente pelas obrigações pactuadas e auferirão as vantagens do período em que participaram voluntariamente do TED.

### **11.2. Rescisão**

Constituem motivos para rescisão do presente TED:

- I - o inadimplemento de qualquer das cláusulas pactuadas;
- II - a constatação, a qualquer tempo, de irregularidades na execução do TED; e
- III - a verificação de circunstâncias que ensejem a instauração de tomada de contas especial; ou
- IV - a ocorrência de caso fortuito ou de força maior que, mediante comprovação, impeça a execução do objeto.

## **12. SOLUÇÃO DE CONFLITO**

Para dirimir quaisquer questões de natureza jurídica oriundas do presente Termo, os partícipes comprometem-se a solicitar o auxílio da Câmara de Conciliação e Arbitragem da Administração Federal da Advocacia-Geral da União - CCAF/AGU.

## **13. PUBLICAÇÃO**

O TED e seus eventuais termos aditivos, que impliquem em alteração de valor ou, ainda, ampliação ou redução de prazo para execução do objeto, serão assinados pelos partícipes e seus extratos serão publicados no sítio eletrônico oficial da Unidade Descentralizadora, no prazo de vinte dias, contado da data da assinatura, conforme disposto no art. 14 do Decreto nº 10.426, de 2020.

As Unidades Descentralizadora e Descentralizada disponibilizarão a íntegra do TED celebrado e do Plano de Trabalho atualizado em seus sítios eletrônicos oficiais no prazo a que se refere o caput.

## **14. ASSINATURAS**

(assinado eletronicamente)

### **ANTONIO DO NASCIMENTO FERREIRA ROSA**

Chefe Geral da Embrapa Gado de Corte

(assinado eletronicamente)

### **SANDRO SILVIO PINHEIRO**

Chefe Adjunto de Administração da Embrapa Gado de Corte

(assinado eletronicamente)

### **ALLAN ROGÉRIO DE ALVARENGA**

Secretário Adjunto da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e Pecuária

## **II - PLANO DE TRABALHO DO TERMO DE EXECUÇÃO DESCENTRALIZADA Nº 01/2022**

### **1. DADOS CADASTRAIS DA UNIDADE DESCENTRALIZADORA**

#### **1.1. Unidade Descentralizadora e Responsável**

Nome do órgão ou entidade descentralizador(a): Ministério da Agricultura e Pecuária

Nome da autoridade competente: Márcio Rezende Evaristo Carlos

Número do CPF: 717.155.096-68

Nome da Secretaria/Departamento/Unidade Responsável pelo acompanhamento da execução do objeto do TED: Secretaria de Defesa Agropecuária

Identificação do Ato que confere poderes para assinatura: Portaria 128, de 4 de janeiro de 2019. Publicada no Diário Oficial da União, Edição: 3-A | Seção: 2 - Extra | Página:1-2. Órgão: Presidência da República/Casa Civil"; Portaria MAPA nº 670, de 8 de abril de 2024

#### **1.2. UG SIAFI**

Número e Nome da Unidade Gestora - UG que descentralizará o crédito: UG: 130007 - SEC. DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO MINIST. DA AGRICULTURA E PECUÁRIA

Número e Nome da Unidade Gestora responsável pelo acompanhamento da execução do objeto do TED: UG: 130001 - MINIST. DA AGRIC., PEC.E ABASTECIMENTO-GM/MAPA

### **2. DADOS CADASTRAIS DA UNIDADE DESCENTRALIZADA**

## **2.1. Unidade Descentralizada e Responsável**

Nome do órgão ou entidade descentralizada: Razão Social: Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte. Nome Fantasia: Embrapa Gado de Corte. CNPJ:00348003004612. Inscrição Estadual:28210307-4.

Nome da autoridade competente: Antonio do Nascimento Ferreira Rosa.

Número do CPF: 166.960.266-49.

Nome da autoridade competente (Chefe Adjunto de Administração): Sandro Silvio Pinheiro

Número do CPF:773.977.381-68

Nome da Secretaria/Departamento/Unidade Responsável pela execução do objeto do TED: EMBRAPA/CNPGC 135017

Identificação do Ato que confere poderes para assinatura:

Ato de designação do Chefe Geral nº 1046 de 26 de outubro de 2020, BCA 50/2020.

Associada à portaria de designação do Chefe de Administração nº 1536, de 22 de agosto de 2022, BCA 45/2022..

## **2.2. UG SIAFI**

Número e Nome da Unidade Gestora - UG que receberá o crédito: EMBRAPA/CNPGC 135017

Número e Nome da Unidade Gestora - UG Responsável pela execução do objeto do TED: EMBRAPA/CNPGC 135017

## **3. OBJETO DO TERMO DE EXECUÇÃO DESCENTRALIZADA**

Estudo do mormo no Brasil - caracterização de cepas e antígenos

## **4. DESCRIÇÃO DAS AÇÕES E METAS A SEREM DESENVOLVIDAS NO ÂMBITO DO TED**

### Metodologia

Os experimentos para atingimento das metas deste TED serão coordenados pela Embrapa Gado Corte, sob Supervisão do Departamento de Saúde Animal/ Secretaria de Defesa Agropecuária, e terão colaboração do Instituto Biológico, Secretarias Federais de Agricultura e Órgãos Estaduais de Defesa Agropecuária – OESAs.

### **Plano de ação 1. Ampliação da caracterização genômica, proteômica e de virulência de isolados de *B. mallei* no Brasil**

#### **Metas:**

##### **1.1 Cultivo microbiológico e identificação de *Burkholderia mallei***

##### **1.2 Isolamento e caracterização proteômica de *B. mallei***

##### **1.3 Análise genômica de isolados de *B. mallei***

##### **1.4. Avaliação da virulência de isolados de *B. mallei***

##### **1.1 Cultivo microbiológico e identificação de *Burkholderia mallei***

Fragments de tecido de equinos, asininos e muares, de diferentes partes do país, coletados pelos Serviço Veterinário Oficial Brasileiro dos Estados, após realização de exame de triagem por ELISA, e confirmatório, por Western blot, serão encaminhados para o Laboratório BIOPEC da Embrapa Gado de Corte, onde serão manipulados em laboratório de nível de biossegurança 3.

Para processamento das amostras, os tecidos recebidos serão higienizados previamente com álcool

70% por cinco minutos e, em seguida, fragmentos serão excisados em condições estéreis, principalmente delimitando lesões, quando presentes. Os fragmentos de tecido serão acondicionados em microtubos contendo 500 µL de meio líquido BHI, sendo macerados em equipamento TissueLyser (Qiagen), com auxílio de uma esfera de metal estéril. Os macerados serão plaqueados nos meios de cultivo ágar sangue (5% sangue de carneiro em base para ágar sangue) glicerinado 1% e ágar sangue glicerinado com adição de 500U/mL de penicilina.

Os mesmos macerados serão cultivados em meio BHI líquido com e sem penicilina. Todos os cultivos serão realizados a 37°C. Os crescimentos bacterianos serão acompanhados em 24h, 48h e 72h. Quando detectada a presença de crescimento no meio BHI líquido, será realizado o plaqueamento em meio ágar sangue glicerinado com e sem penicilina. Para as placas que apresentaram crescimento, as colônias serão repicadas, e esse novo cultivo será acompanhado no mesmo intervalo de tempo, citado anteriormente. Os repiques que apresentarem crescimento de colônias sugestivas de *B. mallei* serão utilizados em processo de triagem, com o objetivo de caracterizar a morfologia e o metabolismo desses microrganismos em testes bioquímicos. Os meios utilizados para triagem serão o ágar batata glicerinado 1%, o ágar MacConkey e o ágar sangue glicerinado 1%. Adicionalmente, à avaliação morfológica dos crescimentos bacterianos nos meios de cultura, serão realizados testes bioquímicos preliminares com TSI(triple sugar iron), oxidase, catalase, SIM (indol, sulfeto, motilidade), OF (oxidação ou fermentação da glicose), além de coloração de Gram.

O DNA será extraído de colônias isoladas e caracterizadas com perfil morfológico e bioquímico compatível com *B. mallei*, seguindo um protocolo adaptado (VAN EMBDEN et al., 1993). Também será realizada a extração de DNA de tecidos, empregando o kit DNEasy blood & tissue (Qiagen). Em seguida, será realizada reação da polimerase em cadeia (PCR), tendo como alvo o pseudogene da flagelina (fliP), conforme recomendação da OIE (2018), utilizando iniciadores descritos por Abreu et al. (2020), com tamanho de fragmento resultante de PCR de 528 pares de bases.

Os produtos de PCR serão purificados de acordo com Werle et al. (1994), utilizando as enzimas exonuclease I(exol) e fosfatase alcalina de camarão (sAP). As reações de sequenciamento serão realizadas, em duplicata, pelo método de terminação de cadeia utilizando dideoxinucleotídeos marcados com fluorocromos (SANGER, 1988). Será utilizado o kit BigDye Terminator v3.1 da Applied Biosystem, seguindo as condições especificadas pelo fabricante. As reações serão purificadas novamente antes de serem sequenciadas, utilizando-se EDTA e etanol. A eletroforese das sequências foi realizada em equipamento ABI 3130XL (Applied Biosystem, EUA). As sequências geradas por eletroforese capilar serão exportadas no formato FASTA e analisadas por meio do programa SeqScape Software v2.1 (Applied Biosystems), em que os eletroferogramas serão alinhados a uma sequência-referência do GenBank (CP010348.1) e editados. Os consensos das sequências serão submetidos à busca de homologia, utilizando-se o programa BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

De cada equídeo necropsiado no projeto, serão obtidos, pelo menos, cinco mL de soro para confecção de soroteca, com a finalidade de avaliação de kits de diagnóstico para mormo, no âmbito do PNSE.

## **1.2 Isolamento e caracterização proteômica de *B. mallei***

Após a confirmação da detecção genotípica de *B. mallei*, as culturas serão analisadas por MALDI-TOF para verificar a pureza das mesmas. As colônias serão fixadas em etanol 70% e remetidas ao BIOPEC, Embrapa Gado de Corte. As proteínas serão extraídas com ácido fórmico 70% e acetonitrila 100%. A ionização por MALDI-TOF será feita com a matriz alfa-ciano-4-hidróxicinâmico e os espectros de massas serão adquiridos em um equipamento Biotyper (Bruker Daltonics), disponível no Instituto Biológico- SP.

Caso seja constatada co-seleção de bactérias contaminantes, e a depender das características culturais e de resistência antimicrobiana de cada contaminante, serão empregadas estratégias de purificação, como repiques em diferentes meios de cultura, como BHI com penicilina, meio MacConkey, meio BM (contendo cristal violeta, ciclohexamida, polimixina B, ticarcilina e fosfomicina); bem como cultivo em presença de 5% CO<sub>2</sub> e a 42°C. Estas estratégias serão

acompanhadas por coloração de Gram e os testes bioquímicos mencionados anteriormente. Colônias com características morfotintoriais compatíveis com *B. mallei* serão novamente submetidas à PCR/sequenciamento de fragmento e, para confirmação de pureza, MALDI-TOF.

### **1.3 Análise genômica de isolados de *B. mallei***

Quando confirmado o isolamento de *B. mallei*, será realizada extração de DNA, conforme descrito anteriormente. As bibliotecas de DNA serão preparadas usando kit Nextera XT (Illumina) e as reações de sequenciamento serão realizadas de acordo com as instruções do fabricante. A corrida MiSeq foi realizada na preparação de DNA, com leituras de 250 pb usando reagentes MiSeq V2. As leituras brutas foram trimadas usando Trimmomatic-0.36 e montadas de novo usando SPAdes 3.13 com os parâmetros padrão. MeDuSa será usado para realizar a ancoragem contra a cepa *B. mallei* 23.334. As sequências do genoma serão depositadas no NCBI.

Sequências genômicas publicamente disponíveis de cepas de *B. mallei* serão usadas para comparação. O pipeline de SNPs de genoma completo (wgSNP) do software BioNumerics v7.6.1 (Applied Maths, Bélgica) será usado para detectar SNPs nas sequências genômicas completas e serão realizadas análises de cluster na matriz wgSNP resultante. A entrada para o módulo wgSNP, serão usados os dados brutos, exceto a referência. Cada arquivo de genoma será processado com a ferramenta de simulação ART-MountRainier-2016-06-05, que gera leituras sintéticas emparelhadas com cobertura 50 (HUANG et al., 2012). Essas leituras serão alinhadas e mapeadas contra a sequência de referência *B. mallei* ATCC 23344, usando o algoritmo BWA implementado em BioNumerics com um mínimo de 90% de identidade de sequência.

Uma árvore filogenética será construída usando RAxML versão 8.2.9 com o modelo GTRGAMMA e 1.000 réplicas bootstrap com base na matriz SNP filtrada da BioNumerics (STAMATAKIS, 2014). SNPs específicos de cepas serão identificados usando o módulo BioNumerics wgSNP e então filtrados usando as seguintes condições: cobertura mínima de 5x para considerar um SNP, remoção de posições com pelo menos uma base ambígua, uma base não confiável ou SNP não informativo e inter-distância mínima de SNP de 25 pb.

### **1.4. Avaliação da virulência de isolados de *B. mallei***

Serão utilizados camundongos (BALB/c) para testar a virulência das cepas brasileiras visando identificar cepas com virulência intermediária para, posteriormente, realizar estudo em equinos. Estes testes serão conduzidos na Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Laboratório de nível de Biossegurança 3. Para cada unidade da Federação, será testada uma cepa isolada. Para cada cepa, serão formados grupos de cinco animais que serão inoculados com diferentes doses infectantes, para observarmos a mortalidade e a carga bacteriana no sangue, pulmão e baço. Os animais serão alocados em grupos de cinco animais por gaiola. Durante todo o experimento receberão água e comida *ad libidum*. No dia zero serão anestesiados e inoculados intratraquealmente por nebulização. Animais com sinais de desconforto moderado a severo serão eutanasiados (Zimmerman et al. 2017).

Os camundongos serão monitorados diariamente para se avaliar a taxa de mortalidade. A partir destes resultados serão calculadas as DL50 para cada cepa, usando o software Prism 6 (GraphPad Software Inc.) pelo método Reed e Muench (Reed e Muench 1938). Após 15 ou 60 dias os animais serão eutanasiados e necropsiados para coleta de baço e pulmões. Estes órgãos serão macerados em PBS, será realizada a diluição seriada e amostras serão plaqueadas em ágar sangue para a contagem de unidades formadoras de colônias por grama de tecido.

## **Plano de ação 2. Banco de抗ígenos de *B. mallei* e avaliação em modelo murino.**

### **Metas**

#### **2.1. Produção e purificação de proteínas recombinantes e LPS de *B. mallei***

#### **2.2. Síntese e acoplamento de nanopartículas de ouro**

#### **2.3. Caracterização da resposta imune**

## **Meta 2.1. Produção e purificação de proteínas recombinantes e LPS de *Burkholderia* sp.**

Serão confeccionados os genes sintéticos codificantes para as seguintes proteínas (inteiras/frações ricas em epítopos e uma quimera rica em epitopos): hcp1 (BMAA0742), ompW (BMA2010), opcP (BMAA1353), opcP1 (BMAA1122), fglL (BMA3336) e proteína da família da hemaglutinina (HA; BMAA1324) clonados no vetor de expressão pET47b, os quais serão utilizados para transformar *Escherichia coli* BL21 (DE3) competente (New England BioLabs).

Para induzir a expressão dos genes recombinantes, as culturas incubadas durante 18h serão diluídas 1:20 em 1 L de caldo Luria Bertani (LB) contendo 50 µg/mL de canamicina, cultivadas até uma densidade óptica a 600 nm (OD600) entre 0,6 e 0,8, e induzidas com 1 mM (concentração final) de isopropil-D-1-tiogalactopiranósideo (IPTG). As culturas serão centrifugadas (4000 g por 15 min) após 4 h de indução, e cada sedimento bacteriano resultante será congelado a -20 ° C. Os pellets bacterianos serão então ressuspensos em 40 mL de solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco 1 × (DPBS) contendo 10% de glicerol e 25 mM de sacarose com uma concentração final de 1 mg / mL de lisozima e 0,2% de desoxicólico de sódio e um comprimido de coquetel de inibidor de protease livre de EDTA (Roche cComplete™, Alemanha). Este lisado será então sonicado, centrifugado e o sedimento será usado para lavagens subsequentes para maximizar a extração de proteína solúvel. Depois de centrifugação a 20.000 g por 40 min, o sobrenadante será submetido à esterilização usando um filtro de tamanho de poro de 0,2 µm (Millipore).

Os extratos de proteína solúveis serão então ligados a colunas de agarose-níquel (ThermoFisher Scientific, EUA) e lavados com tampão PBS - imidazol 50 mM. As proteínas serão eluídas das colunas de afinidade aplicando um tampão PBS 1 × com glicerol a 10%, sacarose 25 mM e imidazol 250 mM. As frações contendo proteína solúvel serão coletadas e combinadas antes da diálise em PBS contendo 10% de glicerol e 25 mM de sacarose durante a noite a 4 ° C. Os níveis de endotoxina serão testados usando um kit de quantificação de endotoxina Pierce LAL (ThermoFisher Scientific, EUA) seguindo as especificações do fabricante. As proteínas purificadas serão dosadas em kit QuBit (ThermoFisher Scientific, EUA) e serão armazenadas a -80 ° C até o uso. Para visualização da integridade, 0,25 µg de cada proteína serão analisados em gel SDS-PAGE por eletroforese. Os géis serão transferidos para uma membrana de nitrocelulose para análise de Western blot. Um anticorpo anti-histidina de camundongo (Catálogo Invitrogen ™ No. R930-25) será usado (1: 5.000) e a mistura de reação incubada durante a noite a 4 ° C, seguido por incubação de anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (Sigma, EUA). As bandas de proteína serão visualizadas adicionando substrato DAB (Sigma, EUA).

O LPS de *Burkholderia thailandensis* (cepa do banco referência da FIOCRUZ) será isolado pelo método de extração com fenol quente. Resumidamente, um pellet de 4 L de *B. Thailandensis* cultivado com LB para a fase estacionária (24 h a 37 ° C e 200 RPM) será coletado (6000 g por 15 min) e lisado na presença de uma mistura de 1: 1 fenol em água (ThermoFisher Scientific, USA). Após a lise a 80 ° C, o fenol será removido por diálise 4 × em água ultra pura e o material será centrifugado (15 min a 6000 g) para clarificar a solução, e o sobrenadante será liofilizado. A solução liofilizada será ressuspensa em uma solução aquosa contendo Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM e digerida com RNase, DNase I e Proteinase K (50 µg / mL cada). Após clarificação (100.000 g por 3 h), o sobrenadante resultante contendo LPS será liofilizado. A amostra contendo o LPS será lavada 5x com etanol 90% e liofilizada. Após a liofilização, o pellet será pesado, ressuspenso em PBS e armazenado a -80 ° C até o uso. A pureza do LPS será avaliada por eletroforese SDS-PAGE, seguida por coloração com prata seguindo o protocolo do fabricante (PierceTM Color Silver Stain Kit).

## **Meta 2.2 Síntese e acoplamento de nanopartículas de ouro**

Nanopartículas esféricas de ouro de 15 nm (AuNPs) serão sintetizadas pelo método de Turkevich (1951). Resumidamente, 1 mM de cloreto de ouro (II) tri-hidratado será submetido a uma reação de redução com 90 mM de citrato de sódio di-hidratado. O tamanho e a forma das partículas serão analisados por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Para estabilizar a conjugação de抗ígenos solúveis na superfície da AuNP, 0,1 mM de ácido 16-mercaptophexadecanoico (16-MHDA)

e 0,1% de Triton X[1]100 serão adicionados às AuNPs. Após 2 h de incubação, esta solução será filtrada por centrifugação (EMB Millipore AmiconTM Ultra-15, peso molecular de corte de 30 kDa [MWCO]), e o procedimento será repetido por 2h para garantir cobertura completa.

A conjugação de proteína covalente por síntese de carbodiimida (Muruato et al., 2017) será realizada pela adição de 20 µg de proteína por mL para revestimento máximo de nanopartículas (previamente definido em Muruato et al. 2017, por análise de densitometria SDS-PAGE) na presença de DMTMM 1 mM [4- (4,6- cloreto de dimetoxi-1,3,5- triazin-2-il) - 4-metil-morfolínio]. As reações de conjugação AuNP-proteína serão realizadas em tampão borato 100 mM por 12 h. A ligação de 16-MHDA e proteína será confirmada medindo a ressonância de plasmon via espectroscopia UV-Vis, TEM, bem como por SDS-PAGE. Para conjugar o LPS nos conjugados AuNP-proteína, será empregado o mecanismo de síntese tiol-maleimida. Para conseguir isso, o LPS será ativado pela adição de reticulador 80 mM EMCH (N- ( $\epsilon$ -maleimidocaproico ácido hidrazida) na presença de 40 mM EDC (N- (3-Dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida cloridrato) e NHS 10 mM (N- hidroxissuccinimida) em tampão MES 50 mM (pH 7,0). Após 1 h em temperatura ambiente, o LPS será concentrado usando AmiconTM Ultra-15, 30 kDa MWCO. Após dessalinização do LPS em EDTA 5 mM, 20 µg de LPS ativado serão adicionados por mL de AuNPs acoplados à proteína previamente ativados na presença de 250 µM SATA (ácido S-acetiltioglicólico N-hidroxissuccinimida éster) por 1 h em temperatura ambiente. Após 4 h de incubação, a reação será extinta com 5 mM de N-etilmaleimida. Os conjugados AuNP-proteína-LPS serão lavados 2 x com PBS contendo 10% de glicerol e 25 mM de sacarose e concentrados para o volume desejado contendo uma concentração de ~ 0,23 µg / µL de proteína e LPS usando célula agitada Amicon contendo um filtro MWCO de 100 kDa.

## **Meta 2.2. Caracterização da resposta imune e desafio**

Camundongos BALB/c fêmeas com 6 a 8 semanas de idade serão cedidos pelo LFDA/MAPA Campinas. Os animais serão alojados em microisoladores em laboratório com nível de biossegurança animal 3, com comida e água disponíveis ad libitum e mantidos em um ciclo de luz de 12 horas. Para permitir uma aclimatação adequada, os camundongos serão alojados nas instalações dos animais durante uma semana antes da experimentação.

Os animais (n = 12 por grupo) serão inoculados por via intranasal (i.n.) três vezes em intervalos de 2 semanas com formulações de 50 µL. Os animais receberão cada um dos conjugados AuNP-proteína- LPS. Duas combinações de formulações de AuNP serão sintetizadas: AuNP-Combo1-LPS (contendo Hcp1, OmpW, OpcP, OpcP1, FlgL e HA) ou AuNP-Combo2-LPS (contendo HA, OmpW e OpcP). Cada formulação de vacina conterá um total de aproximadamente 10 µg de proteína, 10 µg LPS, juntamente com 20 µg de CpG ODN 2395 (InvivoGen, EUA). Os grupos de controle receberão 20 µg de adjuvante sozinho. Três semanas após a administração da última imunização, os animais serão desafiados via intranasal com um desafio de dose baixa ou alta de *B. mallei* 86/19 (Instituto Biológico) em formulações de 50 µL. Os animais de desafio de baixa dose receberão 2 xLD50 (2,8 x 104 UFC por camundongo), enquanto o desafio de alta dose receberá 50 LD50 (7 x 105 UFC por camundongo).

Para avaliar os títulos de anticorpos, o sangue será coletado retro-orbitalmente duas semanas após o último reforço (n = 5). Para isolar o soro, o sangue será incubado por 30 min em temperatura ambiente para permitir a coagulação e centrifugado (10.000 g por 10 min). O soro será removido e armazenado a -80 ° C até o uso. Para os ensaios que requerem soro, as amostras de animais imunizados (n = 5) serão reunidas e armazenadas. Os soros basais e pós-vacinação serão coletados de animais administrados apenas com adjuvante, conjugados individuais de AuNP-proteína-LPS e da formulação de AuNP-Combo- LPS duas semanas após o segundo reforço. O sangue total será coletado via retro-orbital e armazenado em tubos sem anticoagulante. Os soros serão separados por centrifugação e armazenados a -80 ° C. Os títulos de IgG, IgG1 e IgG2c total específicos para proteínas serão determinados por ELISA. Resumidamente, uma microplaca (Costar 3590, Cambridge, MA) será revestida com cada proteína ou antígeno LPS (1 µg / poço) em uma mistura com 1 x PBS (Corning, EUA) e mantida durante a noite a 4 ° C.

Os poços serão lavados duas vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween 20-DPBS) e, em seguida, tampão de bloqueio (0,05% Tween 20, 2% albumina de soro bovino [BSA], 1 x DPBS) será

adicionado em temperatura ambiente por 2 h. Os poços bloqueados serão lavados duas vezes antes da adição do diluente de amostra (1% BSA — 0,05% Tween 20—1 x DPBS). Os soros serão adicionados a cada poço de diluição superior em triplicata, e diluições de 2 vezes serão realizadas após a incubação em temperatura ambiente por 2 h. IgG-HRP de cabra anti-camundongo diluído (Sigma, EUA), IgG1-HRP (Sigma, EUA) ou IgG2c-HRP (Sigma, EUA) (1: 5.000) serão adicionados a cada poço e, em seguida, incubado por 3 h após a lavagem. As placas serão lavadas quatro vezes antes da adição da solução de substrato de tetrametilbenzidina (Invitrogen, EUA). A solução de parada (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) será adicionada, e as amostras serão lidas imediatamente a 450 e 570 nm usando um leitor de microplacas (BioTek, EUA). Os resultados serão relatados como a recíproca do título mais alto, dando uma leitura de densidade óptica (DO) de pelo menos a média  $\geq 2$  desvios padrão em comparação com o soro da linha de base. Todos os ensaios serão realizados em triplicata e os resultados serão relatados como títulos médios de ponto final recíprocos.

Para avaliar o perfil de resposta imune celular induzido, metade dos animais serão eutanasiados 21 dias após a última dose de imunização. Esplenócitos serão isolados e cultivados a  $5 \times 10^6$  células/poço em placas de 24 poços. As células serão re-estimuladas com BSA (controle negativo),  $1 \times 10^7$  UFC/poço de *B. mallei* inativada pelo calor ou lisado total de *B. mallei* (10 ug/mL). As placas serão incubadas a 37°C in 5% CO<sub>2</sub> por 72h e o sobrenadante da cultura será coletado e armazenado a -80 oC para dosagem de IFN-gama, IL-10 e IL-17a por ELISA (Invitrogen). Os dados serão analisados por one-way ANOVA não paramétrico seguido por test de Dunn's para comparação dos grupos.

Os animais serão pesados e monitorados quanto à sobrevivência por 21 dias. Uma curva de sobrevivência será gerada e analisada utilizando o método Kaplan-Meier (Graph Pad Prism versão 6.0c). O percentual de sobrevivência será comparado ao grupo controle. Nos animais sobreviventes, para enumerar a colonização bacteriana, o pulmão/baço (desafio de baixa dose) ou pulmão, fígado e baço (desafio de alta dose) serão coletados. Os órgãos serão homogeneizados em 1 mL de 1 x PBS, diluídos em série e semeados em ágar LBG e incubados a 37 ° C por 48 h. O limite de detecção bacteriano será determinado como sendo 1 UFC / órgão. Parte de cada órgão coletado será também preparado para histopatologia/imunohistopatologia, para compreensão da extensão da proteção em âmbito tecidual.

## Referências

Abreu DC, Gomes AS, Tessler DK, Chiebao DP, Fava CD, Romaldini AHCN, Araujo MC, Pompei J, Marques GF, Harakava R, Pituco EM, Nassar AFC. Systematic monitoring of glanders-infected horses by complement fixation test, bacterial isolation, and PCR. Vet Anim Sci. 2020 Oct 6;10:100147. doi: 10.1016/j.vas.2020.100147. PMID: 33089006; PMCID: PMC7566944.

BRASIL. MAPA 1934. DECRETO Nº 24.548 DE 3 DE JULHO DE 1934. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1930-1949/d24548.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1930-1949/d24548.htm)

Huang W, Li L, Myers JR, Marth GT. ART: a next-generation sequencing read simulator. Bioinformatics. 2012 Feb 15;28(4):593-4. doi: 10.1093/bioinformatics/btr708. Epub 2011 Dec 23. PMID: 22199392; PMCID: PMC3278762.

Khan I, Wieler LH, Melzer F, Elschner MC, Muhammad G, Ali S, Sprague LD, Neubauer H, Saqib M. Glanders in animals: a review on epidemiology, clinical presentation, diagnosis and countermeasures. Transbound Emerg Dis. 2013 Jun;60(3):204-21. doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01342.x. Epub 2012 May 27. PMID: 22630609.

Muruato LA, Tapia D, Hatcher CL, Kalita M, Brett PJ, Gregory AE, Samuel JE, Titball RW, Torres AG. Use of Reverse Vaccinology in the Design and Construction of Nanoglycoconjugate Vaccines against *Burkholderia pseudomallei*. Clin Vaccine Immunol. 2017 Nov 6;24(11):e00206-17. doi: 10.1128/CVI.00206-17. PMID: 28903988; PMCID: PMC5674190.

Office International des Epizooties (OIE). Glanders , Capítulo 3. 5. 11. OIE Terrestrial Manual. OIE, Paris, França (2018)

Saini S, Singha H, Shanmugasundaram K, Tripathi B. Characterization of immunoglobulin and cytokine responses in *Burkholderia mallei* infected equids. Microb Pathog. 2021 Nov 24:105310.

doi: 10.1016/j.micpath.2021.105310. Epub ahead print. PMID: 34838612.

Sanger F. Sequences, sequences, and sequences. Annu Rev Biochem. 1988;57:1-28. doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.000245. PMID: 2460023.

Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics. 2014 May 1;30(9):1312-3. doi: 10.1093/bioinformatics/btu033. Epub 2014 Jan 21. PMID: 24451623; PMCID: PMC3998144.

Tapia D, Sanchez-Villamil JI, Torres AG. Multicomponent gold nano-glycoconjugate as a highly immunogenic and protective platform against *Burkholderia mallei*. NPJ Vaccines. 2020 Sep 10;5(1):82. doi: 10.1038/s41541-020-00229-9. PMID: 34504107.

Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J, A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, Discussions of the Faraday Society, 11 (1951) 55-75. DOI: 10.1039/df9511100055

van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, et al. Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol. 1993 Feb;31(2):406-9. doi: 10.1128/jcm.31.2.406-409.1993. PMID: 8381814; PMCID: PMC262774.

Werle E, Schneider C, Renner M, Völker M, Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. Nucleic Acids Res. 1994 Oct 11;22(20):4354-5. doi: 10.1093/nar/22.20.4354. PMID: 7937169; PMCID: PMC331970.

OIE Terrestrial Manual. 2018. Chapter 3.5.11 Glanders and Melioidosis. Disponível em: [https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.05.11\\_GLANDERS.pdf](https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.05.11_GLANDERS.pdf) Wang, G., Zarodkiewicz, P., & Valvano, M. A. (2020). Current advances in *Burkholderia* vaccines development. Cells, 9(12), 2671.

## 5. JUSTIFICATIVA E MOTIVAÇÃO PARA CELEBRAÇÃO DO TED

*Burkholderia mallei* causa uma doença infecciosa importante em equídeos, conhecida como mormo. É uma das doenças de notificação obrigatória listadas pela OIE, o que implica em medidas rígidas de política de controle, uma vez que a infecção por *B. mallei* é confirmada nos hospedeiros suscetíveis. Humanos, especialmente manipuladores de equídeos, profissionais veterinários e trabalhadores de laboratório correm maior risco de adquirir *B. mallei* diretamente por meio do contato prolongado com equídeos infectados e indiretamente por meio do manuseio desprotegido de materiais contaminados por *B. mallei* (SAINI et al., 2021).

Em cavalos, o mormo geralmente tem um curso mais crônico e os cavalos podem sobreviver por vários anos. Casos “ocultos” crônicos e subclínicos são fontes potenciais de infecção devido ao derramamento permanente ou intermitente de bactérias (OIE, 2018). Equinos infectados com *B. mallei* geralmente exibem uma variedade de sinais clínicos, como secreção nasal com ou sem ulceração do septo nasal; alargamento, endurecimento e formação de abscessos nos linfáticos e gânglios linfáticos dos membros posteriores, regiões submandibulares e extremidades; dificuldade respiratória com envolvimento pulmonar e formação de abscessos nodulares disseminados no pulmão, fígado e baço (KHAN et al., 2013).

Os burros são altamente suscetíveis à infecção por *B. mallei* e exibem a forma aguda de mormo associada à septicemia e morte súbita. Uma forma crônica de infecção por *B. mallei* é geralmente observada em cavalos e mulas (OIE, 2018).

No Brasil, o controle do mormo é regulamentado pelo Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE), coordenado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Os equídeos infectados são obrigatoriamente eutanasiados pelo sistema de vigilância oficial (BRASIL, 1934). De 1999 a 2019, foram notificados 2.670 casos de mormo no Brasil, a maioria deles na região Nordeste.

Em 06/09/2019, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA formalizou uma Rede de Colaboração (RC) técnico científica para organizar e fomentar a sinergia entre as diversas instituições e atores, na busca do contínuo aperfeiçoamento de protocolos de diagnóstico, controle,

prevenção e erradicação do Morteiro no Brasil, no âmbito do PNSE, conforme Instrução Normativa nº 6, de 16 de Janeiro de 2018. Em 2020, a Embrapa foi demandada a executar um projeto visando o aprimoramento no diagnóstico do mormo, envolvendo ações de caracterização molecular e proteômica de cepas de *B. mallei* isoladas no Brasil, a análise de sua virulência em modelo murino e equino, formação de banco de soros para avaliação de métodos sorológicos.

Em 06/09/2019, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA formalizou uma Rede de Colaboração (RC) técnico científica para organizar e fomentar a sinergia entre as diversas instituições e atores, na busca do contínuo aperfeiçoamento de protocolos de diagnóstico, controle, prevenção e erradicação do Morteiro no Brasil, no âmbito do PNSE, conforme Instrução Normativa nº 6, de 16 de Janeiro de 2018. Em 2020, a Embrapa foi demandada a executar um projeto visando o aprimoramento no diagnóstico do mormo, envolvendo ações de caracterização molecular e proteômica de cepas de *B. mallei* isoladas no Brasil, a análise de sua virulência em modelo murino e equino, formação de banco de soros para avaliação de métodos sorológicos.

A resistência natural de *B. mallei* a múltiplos antibióticos e tratamentos, bem como sua transmissão por aerossol tornam este organismo um potencial agente de guerra biológica (Saini et al. 2021). Deve-se considerar também que não há vacina comercialmente disponível até o momento. Entre as alternativas para controle do mormo, a imunização traz a possibilidade de redução significativa da viabilidade do microrganismo (TAPIA et al., 2020), diminuindo a transmissão entre animais, e com impacto potencial na redução dos riscos à saúde pública. Desta forma, a oferta de vacinas eficazes contra o mormo podem facilitar as estratégias de controle e erradicação da doença, sendo, dessa forma, altamente necessárias.

Os resultados da infecção experimental por *B. mallei* em camundongos e primatas não humanos e imunização com a cepa viva atenuada de *B. mallei* demonstraram que a ativação da resposta imune inata e adaptativa precoce desempenha um papel crítico no controle da infecção por *B. mallei* (SAINI et al., 2021). Um conjunto de outras cepas de *Burkholderia* sp. têm sido avaliadas como candidatas a componente de uma vacina, quer sejam mortas e/ou inativadas por diferentes métodos, entre eles, atenuação genética (WANG et al., 2020). Entretanto, ainda que esta seja uma das formas mais robustas de indução de imunidade, questões de segurança, praticidade, custo e reproduzibilidade devem ser consideradas. As formulações de proteínas imunógenas recombinantes, ligadas a nanopartículas, oferecem recursos atraentes que ditam e direcionam a resposta imune, incluindo proteção do antígeno da degradação, facilitando o movimento do antígeno através do epitélio, captação e processamento por células apresentadoras de antígeno (APCs), formação de depósito e co-entrega de antígenos. Dado que os processos que governam a captação e apresentação do antígeno por APCs são dependentes das características das partículas, as nanovacinas oferecem um meio de aumentar a imunogenicidade de subunidades candidatas que podem resultar em maior proteção. Nanopartículas de ouro (AuNPs) representam uma plataforma com evidência documentada de segurança em uma série de modelos, incluindo doenças infecciosas e câncer, bem como seu uso como sistemas de nano-entrega eficazes que utilizam uma série de mecanismos, incluindo aumento da captação e processamento de antígenos, resultando em respostas imunes protetoras robustas (TAPIA et al., 2020).

O objetivo do presente projeto é ampliar a análise genotípica de *B. mallei*, desenvolver estratégias de isolamento da bactéria, e incrementar a caracterização genômica, proteômica e de virulência desses isolados; bem como avaliar proteínas recombinantes de *B. mallei* em diferentes sistemas nanoestruturados quanto a capacidade imunogênica e modelo experimental murino de mormo.

#### **Equipe e atribuições:**

Nome	Instituição	Cargo	Especialidade	Função
------	-------------	-------	---------------	--------

			Coordenação do projeto
Lenita Ramires dos Santos	Embrapa Gado de Corte	Pesquisadora. Doutora em Imunologia. <a href="http://lattes.cnpq.br/4423803055290816">http://lattes.cnpq.br/4423803055290816</a>	Análises microbiológicas
			Análises moleculares
			Avaliação de virulência
			Produção de proteínas recombinantes
			Ensaios de imunização e desafio
			Colaborador
			Análises microbiológicas
			Análises moleculares
Flábio Ribeiro de Araújo	Embrapa Gado de Corte	Pesquisador. Doutor em Imunologia. <a href="http://lattes.cnpq.br/7428513224190354">http://lattes.cnpq.br/7428513224190354</a>	Análises genômicas
			Avaliação de virulência
			Produção de proteínas recombinantes
			Ensaios de imunização e desafio
Paulo Henrique Duarte Cançado	Embrapa Gado de Corte	Pesquisador. Doutor em Biologia Molecular. <a href="http://lattes.cnpq.br/3093786867437463">http://lattes.cnpq.br/3093786867437463</a>	Colaborador
			Análises moleculares
Andréa Alves do Egito	Embrapa Gado de Corte	Pesquisador. Doutora em Biologia Molecular. <a href="http://lattes.cnpq.br/3093786867437463">http://lattes.cnpq.br/3093786867437463</a>	Colaborador
			Análises moleculares
			Análises genômicas
Newton Valério Verbisck	Embrapa Gado de Corte	Pesquisador. Doutor em Ciências. <a href="http://lattes.cnpq.br/5597478956749506">http://lattes.cnpq.br/5597478956749506</a>	Colaborador
			Análises proteômicas
Paula Adas Pereira Suniga	Embrapa Gado de Corte	Bolsista. Mestre em Ciência Animal. <a href="http://lattes.cnpq.br/8444797408906954">http://lattes.cnpq.br/8444797408906954</a>	Colaborador
			Análises microbiológicas
			Análises moleculares
Guilherme Augusto Abrantes Sousa	Embrapa Gado de Corte	Bolsista. Mestre em Biotecnologia. <a href="http://lattes.cnpq.br/0461212592406598">http://lattes.cnpq.br/0461212592406598</a>	Colaborador
			Análises microbiológicas
			Análises moleculares
Ingrid Batista Pinto	Embrapa Gado de Corte	Bolsista. Doutora em Biotecnologia e Biodiversidade. <a href="http://lattes.cnpq.br/9641671301041258">http://lattes.cnpq.br/9641671301041258</a>	Colaborador
			Análises microbiológicas
			Análises moleculares

Juliana da Silva Gomes	Embrapa Gado de Corte	Bolsista. Mestre em Ciência Animal. <a href="http://lattes.cnpq.br/9396050994762818">http://lattes.cnpq.br/9396050994762818</a>	Colaborador Análises microbiológicas Análises moleculares Sorologia Avaliação de virulência Produção de proteínas recombinantes Ensaios de imunização e desafio
Maria Goretti dos Santos	Embrapa Gado de Corte	Técnica. Bacharel em Farmácia e Bioquímica. <a href="http://lattes.cnpq.br/9396050994762818">http://lattes.cnpq.br/9396050994762818</a>	Colaborador Análises microbiológicas
Cynthia Mantovani	Embrapa Corte	Bolsista. Doutora em Biotecnologia. <a href="http://lattes.cnpq.br/3898516533396445">http://lattes.cnpq.br/3898516533396445</a>	Colaborador Análises microbiológicas Análises moleculares Sorologia Avaliação de virulência

## 6. SUBDESCENTRALIZAÇÃO

A Unidade Descentralizadora autoriza a subdescentralização para outro órgão ou entidade da administração pública federal?

(X) Sim

( ) Não

Marlene de Barros Coelho Cavalcioni

**7. FORMAS POSSÍVEIS DE EXECUÇÃO DOS CRÉDITOS ORÇAMENTÁRIOS**

Embrapa Gado de Metalúrgica e de Minas

Pesquisadora. Doutora em Engenharia

Conjulação de proteínas recombinantes com nanopartículas

http://lattes.cnpq.br/9488710831147895

execução dos créditos orçamentários descentralizados poderá ser:

( ) Direta, por meio da utilização capacidade organizacional da Unidade Descentralizada.

( ) Contratação de particulares, observadas as normas para contratos da administração pública.

( X ) Descentralizada, por meio da celebração de convênios, acordos, ajustes ou outros instrumentos congêneres, com entes federativos, entidades privadas sem fins lucrativos, organismos internacionais ou fundações de apoio regidas pela Lei nº 8.958, de 20 de dezembro de 1994.

## 8. CUSTOS INDIRETOS (ART. 8, §2º)

A Unidade Descentralizadora autoriza a realização de despesas com custos operacionais necessários à consecução do objeto do TED?

( X ) Sim

( ) Não

O pagamento será destinado aos seguintes custos indiretos, até o limite de 20% do valor global pactuado: DOA da Fundação de Apoio no valor de R\$ 162.650,28, resultando em 6% do valor do plano de aplicação do TED (R\$ 2.710.838,00)

## 9. CRONOGRAMA FÍSICO-FINANCEIRO

METAS	Descrição	Un. medida	Quant.	Valor unitário	Valor Total	Início	Fim
-------	-----------	---------------	--------	-------------------	-------------	--------	-----

META 1.1	Cultivo microbiológico e identificação de <i>Burkholderia mallei</i>	PER	100	R\$ 6.456,61	R\$ 645.661,00	12/2022	12/2026
PRODUTO	Coleção de culturas com detecção genotípica de <i>B. mallei</i>						
META 1.2	Isolamento e caracterização proteômica de <i>B. mallei</i>	PER	100	R\$ 4.799,97	R\$ 479.997,00	12/2022	11/2024
PRODUTO	Coleção de isolados brasileiros de <i>B. mallei</i> com proteoma caracterizado						
META 1.3	Análise genômica de isolados de <i>B. mallei</i>	PER	100	R\$ 3.941,63	R\$ 394.163,00	06/2023	12/2026
PRODUTO	Coleção de genomas de isolados brasileiros de <i>B. mallei</i>						
META 1.4	Avaliação da virulência de isolados de <i>B. mallei</i>	PER	100	R\$ 2.855,72	R\$ 285.572,00	12/2023	12/2026
PRODUTO	Informações sobre virulência disponíveis sobre coleção de isolados brasileiros de <i>B. mallei</i>						
META 2.1	Produção e purificação de proteínas recombinantes e LPS de <i>B. mallei</i>	PER	100	R\$ 1.764,27	R\$ 176.427,00	12/2023	06/2025
PRODUTO	Banco de proteínas caracterizado e quantificado						
META 2.2	Síntese e acoplamento de nanopartículas de ouro	PER	100	R\$ 5.581,18	R\$ 558.118,00	12/2023	06/2025
PRODUTO	Formulação vacinal preparada						
META 2.3	Caracterização da resposta imune e grau de proteção	PER	100	R\$ 1.709,00	R\$ 170.900,00	06/2024	12/2026
PRODUTO	Perfil de resposta caracterizado e percentual de sobrevivência definido						

## 10. CRONOGRAMA DE DESEMBOLSO

MÊS/ANO	VALOR
12/2022	R\$ 1.611.010,26
12/2023	R\$ 1.081.324,02
12/2024	R\$ 181.154,00

## 11. PLANO DE APLICAÇÃO CONSOLIDADO - PAD

CÓDIGO DA NATUREZA DA DESPESA	CUSTO INDIRETO	VALOR PREVISTO
335039	Não	R\$ 2.710.838,00
335041	Sim	R\$ 162.650,28
Total		R\$ 2.873.488,28

Obs.: Recursos identificados para os exercícios de 2023 e 2024 somente serão transferidos mediante Termo Aditivo, considerando a disponibilidade, após aprovação da Lei Orçamentária Anual.

## **12. PROPOSIÇÃO**

Local e data

(assinado eletronicamente)

**ANTONIO DO NASCIMENTO FERREIRA ROSA**

Chefe Geral da Embrapa Gado de Corte

(assinado eletronicamente)

**SANDRO SILVIO PINHEIRO**

Chefe Adjunto de Administração da Embrapa Gado de Corte

## **13. APROVAÇÃO**

Local e data

(assinado eletronicamente)

**ALLAN ROGÉRIO DE ALVARENGA**

Secretário Adjunto da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura e Pecuária

### ***Observações:***

1. Em atenção ao disposto no § 2º do art. 15 do Decreto nº 10.426, de 2020, as alterações no Plano de Trabalho que não impliquem alterações do valor global e da vigência do TED poderão ser realizados por meio de apostila ao termo original, sem necessidade de celebração de termo aditivo, vedada a alteração do objeto aprovado, desde que sejam previamente aprovadas pelas Unidades Descentralizadora e Descentralizada.
2. A elaboração do Plano de Trabalho poderá ser realizada pela Unidade Descentralizada ou pela Unidade Descentralizadora.

ALLAN ROGÉRIO DE ALVARENGA  
Secretário Adjunto da Secretaria de Defesa  
Agropecuária do MAPA

Antonio do Nascimento Ferreira Rosa  
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte  
(Embrapa Gado de Corte)

Sandro Silvio Pinheiro  
Chefe de Administração Embrapa Gado de Corte



Documento assinado eletronicamente por **ANTONIO DO NASCIMENTO FERREIRA ROSA, Usuário Externo**, em 29/12/2025, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º,§ 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandro Silvio Pinheiro, Usuário Externo**, em 29/12/2025, às 15:32, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º,§ 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **ALLAN ROGERIO DE ALVARENGA, Secretário(a) de Defesa Agropecuária - Substituto(a)**, em 29/12/2025, às 16:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º,§ 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site:  
[https://sei.agro.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.agro.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **49371979** e o código CRC **C59930A4**.

---

**Referência:** Processo nº 21000.096801/2022-56

SEI nº 49371979