

## **II. Fichas técnicas contendo justificativas para inclusão na lista e metodologias de identificação, preferencialmente moleculares**

### **II.1 *Acidovorax citrulli***

#### **Classificação taxonômica:**

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Betaproteobacteria  
Ordem: Burkholderiales  
Família: Comamonadaceae  
Gênero: *Acidovorax*  
Espécie: *Acidovorax citrulli*

#### **Motivo da inclusão na lista:**

A espécie *Acidovorax citrulli* é responsável pela doença da mancha da fruta, causando uma mancha verde-oliva escura na superfície superior da fruta infectada, principalmente em melões e melancias. A mancha começa como uma pequena área encharcada de água, que rapidamente aumenta para uma lesão de vários centímetros de diâmetro com margens irregulares (Somodi et al., 1991). Em poucos dias, as lesões podem se expandir e cobrir toda a superfície superior do fruto chegando em estágios avançados de desenvolvimento da lesão, podendo se tornar necrótico. (Lee et al., 2017). No Brasil, Assunção e colaboradores (2019) destacam que apesar da frequência de infecções ser maior em meloeiro e melancieira, outras cucurbitáceas, como o pepino e a aboboreira são suscetíveis apresentando os sintomas da bacteriose apenas em suas folhas. Nascimento e colaboradores (2004) relatam a presença de infecção pelo patógeno em berinjela, tomate, fumo, milho, mamão e leguminosas em ambiente de casa de vegetação, o que demonstra seu potencial de acometer também representantes de várias outras famílias, tais como Solanaceae, Poaceae, Caricaceae e Fabaceae. Não foram encontrados trabalhos que demonstrem casos de infecção em plantas nativas brasileiras, todavia destaca-se a variedade de famílias que este fitopatógeno é capaz de infectar, o que aumenta a possibilidade de hospedeiros nativos da mesma família serem afetados. São relatados casos de ocorrência na Ásia, Europa, América do Norte e do Sul e Oceania. No Brasil, há relatos de ocorrência da infecção nos estados da Bahia, Ceará, Minas Gerais, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Roraima e São Paulo (CABI/EPPO, 2011, Assunção et al., 2019). Além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu potencial de propagação, microrganismos desta espécie são descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Dada a capacidade de invasibilidade da espécie *Acidovorax citrulli* e seu potencial de afetar famílias para as quais possuímos espécies nativas, recomenda-se a sua não utilização sob quaisquer condições.

#### **Método de identificação:**

Por *A. citrulli* se tratar apenas de uma espécie do gênero *Acidovorax* é preciso garantir que quando um solicitante tenha a intenção de registrar qualquer outra espécie do gênero fique garantido que ela não se trata de *A. citrulli*. Dessa forma é necessária uma identificação precisa do isolado em nível de espécie. Com base na literatura disponível não se encontraram abordagens que demonstraram alta especificidade de identificação, ou seja, que excluem a possibilidade de um isolado do gênero *Acidovorax* ser da espécie *A. citrulli* utilizando apenas o gene que codifica o rRNA 16S. Por isso sugere-se a abordagem descrita no trabalho de Feng e colaboradores (2009), que se baseia na utilização de *primers* responsáveis pela amplificação de genes *housekeeping* em uma abordagem de PCR multilocus, alinhando as sequências

obtidas após o sequenciamento, para realizar a identificação e garantir que não se trata da espécie em questão. Inicialmente os autores selecionaram quatorze loci utilizando não só a espécie *A. citrulli*, mas também *Acidovorax sp.*, entretanto apenas os sete loci descritos se mostraram resolutivos. Os genes a serem utilizados são *gmc* (glicose-metanol-colina oxidoredutase), *lepA* (proteína de ligação à GTP), *gltA* (citato sintase tipo II), *pilT* (proteína de motilidade de contração), *trpB* (subunidade beta de triptofano sintase), *phaC* (sintase de ácido poli (R) hidroxialcanoico, classe 1), *ugpB* (proteína extracelular de ligação a soluto família 1) e as sequências dos *primers* desenhados para amplificação dos mesmos estão listadas na tabela abaixo. Com a utilização dos mesmos garante-se a identificação precisa do isolado em nível de espécie e, portanto, a exclusão de que se trate de *A. citrulli*.

Gene	Sequências dos <i>primers</i> (foward/reverse)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>gmc</i>	5'-TGGTTGACCTCGAAATAGCC-3' 5'-TTTCGACTTCATCGTCATCG-3'	543
<i>lepA</i>	5'-GATCGACACGCCGGACAC-3' 5'-TGATGTAGCCCACCTCGCC-3'	489
<i>gltA</i>	5'-GAAGTCCACGTTGGGTAGA-3' 5'-TACATGTACCCGCAGAACCA-3'	489
<i>pilT</i>	5'-GAGTACATCTGCGCCACCTT-3' 5'-GAATACGGGCACATCCTGAC-3'	404
<i>trpB</i>	5'-GCCACTTCGGCCGCTATG-3' 5'-CCTCGTTGAGCGCATCCTT-3'	439
<i>phaC</i>	5'-ATCGCCAACCTGCTGCAC-3' 5'-AACGTGGTGAGGAAGGTGG-3'	431
<i>ugpB</i>	5'-TGAAGGAAATCTCGGTCGTC-3' 5'-CTTGACGTCGTTGCTGAAGA-3'	452

## Referências Bibliográficas

Assunção, E.F. de; Conceição, C.S. da; Mariano, R.L.R.; Souza, E.B. de. (2019). Situação atual da Mancha Aquosa, importante bacteriose em meloeiro e melancieira. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica*, v.16, n.1, p.51-73.

CABI Dataset: *Acidovorax citrulli* (fruit blotch). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/2676>. Acesso em: 05 de janeiro de 2021.

Feng, J., Schuenzel, E. L., Li, J., & Schaad, N. W. (2009). Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Phytopathology*, 99(8), 913-920.

Lee, H.; Kim, M.S.; Qin, J.; Park, E.; Song, Y-R.; Oh, C-S.; Cho, B-K. (2017). Raman Hyperspectral Imaging for Detection Watermelon seeds Infected with *Acidovorax citrulli*. *Sensors*, 17, 2188.

Nascimento, A.R.P.; Mariano, R.L.R.; Silva, E.I. (2004). Hospedeiros alternativos de *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*. *Horticultura Brasileira*, Brasília, v.22, n.3, p.345-349.

Somodi, G.C.; Jones, J.B.; Hopkins, D.L.; Stall, R.E.; Kucharek, T.A.; Hodge, N.C; Watterson, J.C. (2016). Occurrence of a Bacterial Watermelon Fruit Blotch in Florida. *Plant Dis.*, 75:1053-1056.

## II.2 *Anaplasma* sp.

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Alphaproteobacteria  
Ordem: Rickettsiales  
Família: Anaplasmataceae  
Gênero: *Anaplasma*

### Motivo da inclusão na lista:

O gênero *Anaplasma* foi descrito pela primeira vez em 1910 e é formado por espécies parasitas intraeritrocíticos obrigatórios, como *ovis*, *marginale* e *centrale*, dentre outras, que causam uma doença denominada anaplasmosse (Kocan et al., 2010; CABI, 2020). É transmitido por um grupo diverso de vetores biológicos, sendo o principal deles os carrapatos e os sintomas, geralmente, consistem de anemia, fraqueza, febre, constipação, icterícia, depressão, desidratação, aborto e muitas vezes a morte dos animais (Martins & Correia, 2005). A anaplasmosse ocorre em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo, sendo uma doença endêmica de regiões da Ásia, África e Europa e, predominante na América do Norte e América Latina, com exceção de áreas desertas e certas montanhas. A doença é uma das principais restrições à produção de gado em muitos países (Kocan et al., 2010, CABI, 2020). A anaplasmosse afeta principalmente ruminantes, inclusive os selvagens, principalmente bovinos, além de ovelhas, cabras, antílopes, veados, búfalos, girafas, caninos, felinos e equinos (Kocan et al., 2020). Dentre as espécies nativas brasileiras comprovadamente afetadas se encontram o veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), cervo do pantanal (*Blastocerus dichotomus*) e veado virá (*Mazama gouazoubira*) e a doença, de modo geral tem tomado grandes proporções no cenário brasileiro, pois nosso país oferece condições climáticas favoráveis ao seu desenvolvimento e procriação, tornando difícil o combate a este vetor (Silveira et al., 2012; Silveira et al., 2013). A anaplasmosse está atualmente classificada na lista B da Organização Internacional de Epizootias (OIE), no Código Sanitário dos Animais Terrestres, devido à sua importância socioeconômica e significância em termos de restrições no comércio internacional de animais e produtos de origem animal (Kocan et al., 2010; CABI, 2020). Dessa maneira, reforça-se a importância de restringir o uso de bactérias desse gênero, devido aos potenciais prejuízos econômicos causados e, principalmente, ao fato de afetar espécies nativas.

### Método de identificação:

Pelo fato da restrição de uso se estender a todas as espécies do gênero *Anaplasma*, é necessário que qualquer solicitante que pretenda registrar isolados que pertençam a família Anaplasmataceae, garanta que o mesmo não pertença ao gênero em questão. Para a identificação de microrganismos do gênero *Anaplasma*, o uso de testes moleculares após a obtenção do DNA do organismo ou a partir de amostras de interesse tem se mostrado eficaz tanto em termos de robustez quanto especificidade. De acordo com a literatura levantada, para uma identificação dos patógenos em nível de gênero, apenas a realização da PCR a partir do gene que codifica o rRNA 16S possui capacidade resolutiva suficiente e foram encontradas várias opções de primers possíveis de serem utilizados para essa identificação. Sugere-se a utilização dos primers 16SANA-F e 16SANA-R, que são os mais comumente usados na maioria dos trabalhos levantados (de la Fuente et al., 2006; Almazán et al., 2015), seguido de sequenciamento e análise das sequências obtidas por meio de bancos de dados (Almazán et al., 2015). A sequências dos primers se encontra na tabela abaixo:

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
16SANA-F	5'-CAGAGTTGATCCTGGCTCAGAACG-3'
16SANA-R	5'-GAGTTGCCGGGACTTCTTGTA-3'

### **Referências Bibliográficas:**

Almazán, C., Gonzalez-Alvarez, V. H., de Mera, I. G. F., Cabezas-Cruz, A., Rodríguez-Martínez, R., & de la Fuente, J. (2016). Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 7(2), 276-283.

Belkahia, H., Said, M. B., El Hamdi, S., Yahiaoui, M., Gharbi, M., Daaloul-Jedidi, M., ... & Messadi, L. (2014). First molecular identification and genetic characterization of *Anaplasma ovis* in sheep from Tunisia. *Small Ruminant Research*, 121(2-3), 404-410.

CABI Dataset: anaplasmosis. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/94682> Acesso em: 02 de janeiro de 2021.

de Echaide, S. T., Knowles, D. P., McGuire, T. C., Palmer, G. H., Suarez, C. E., & McElwain, T. F. (1998). Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 777-782.

De la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Nicosia, S., Alongi, A., La Mantia, F., & Kocan, K. M. (2006). Molecular characterization of *Anaplasma platysstrains* from dogs in Sicily, Italy. *BMC veterinary research*, 2(1), 24.

Kocan, K. M., de la Fuente, J., Blouin, E. F., Coetzee, J. F., & Ewing, S. A. (2010). The natural history of *Anaplasma marginale*. *Veterinary parasitology*, 167(2-4), 95-107.

Martins, J. R., & Corrêa, B. L. (1995). Babesiose e anaplasmosse bovina: aspectos destas enfermidades. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 1(1), 51-58.

Silveira, J. A. G., Rabelo, E. M. L., & Ribeiro, M. F. B. (2012). Molecular detection of tick-borne pathogens of the family Anaplasmataceae in Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer, 1814) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*, Illiger, 1815). *Transboundary and emerging diseases*, 59(4), 353-360.

Silveira, J. A., Rabelo, É. M., Lacerda, A. C., Borges, P. A., Tomás, W. M., Pellegrin, A. O., ... & Ribeiro, M. F. (2013). Molecular detection and identification of hemoparasites in pampasdeer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 4(4), 341-345.

## **II.3 *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* *Brucella suis* (Brucelose)**

### **Classificação taxonômica:**

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Alphaproteobacteria  
Ordem: Rhizobiales  
Família: Brucellaceae  
Gênero: *Brucella*  
Espécies: *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis*

### **Motivo da inclusão na lista:**

Brucelose é o nome genérico dado às infecções que acometem animais e homens e são causadas por várias espécies do gênero *Brucella*, principalmente *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* e *Brucella suis*. A infecção por *Brucella* em bovinos é geralmente causada por *B. abortus*, menos frequentemente por *B. melitensis* e ocasionalmente por *B. suis*. *B. melitensis* é o principal agente causador da brucelose em ovelhas e cabras e a brucelose em porcos é causada por *B. suis* (OIE, 2018). Clinicamente a infecção por esses isolados nos animais é caracterizada por um ou mais dos seguintes sinais: aborto, retenção de placenta, diminuição de fertilidade no hospedeiro e, raramente artrite (Aparício, 2013, CABI, 2021a). A brucelose causada por *B. abortus* afeta animais em todos os continentes, inclusive no Brasil, onde foram relatados casos em Rondônia, São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais e vários estados do Nordeste (Aguiar et al., 2005; dos reis et al., 2008; Varges et al., 2008; Salaberry et al., 2011; Azevedo et al., 2010). Além dos animais mencionados, a doença afeta também cães, camelos, búfalos e animais selvagens como veados, raposas, lebres e roedores (Aparício, 2013). A brucelose causada por *B. melitensis* é predominante em países mediterrâneos que possuem um grande número de rebanhos de ovelhas, sendo também prevalente em países em desenvolvimento do sudoeste da Ásia, Oriente médio e partes da América Latina e da África, entretanto ainda não há relatos de sua ocorrência no Brasil (CABI, 2021b; Mathias, 2008). Além dos animais mencionados, a doença afeta também cães, camelos, dromedários, lhamas, alpacas e pequenos ruminantes (Aparício, 2013; CABI, 2021b). Quanto à brucelose causada por *Brucella suis*, o porco é o hospedeiro mais comum, porém apenas para os biovares 1 e 3, sendo os javalis, cães e cavalos hospedeiros secundários (CABI, 2021c). Eles possuem distribuição mundial, com relatos de sua ocorrência, inclusive, no estado do Mato Grosso do Sul (Paes et al., 2009). Quanto aos demais biovares, além dos suínos eles também afetam outros animais, porém sua ocorrência é limitada a poucas regiões específicas da Europa (CABI, 2021c). Os microrganismos geralmente entram no corpo do hospedeiro via oral e alojam-se nas mucosas, onde as bactérias são ingeridas por fagócitos e se multiplicam no retículo endoplasmático dessas células, resultando em hiperplasia do tecido linfóide e reticuloendotelial e infiltração de células inflamatórias. Após algumas semanas os ossos, articulações, olhos e cérebro podem ser infectados, mas as bactérias são mais frequentemente isoladas de linfonodos supramamários, linfonodos mamários, leite, linfonodos ilíacos, baço e útero. Elas se multiplicam de forma abundante na placenta onde causam lesões na parede do órgão, induzindo endometriose ulcerosa nos espaços intercotiledonares e destruição das vilosidades, levando à morte e expulsão do feto (Aparício, 2013). Humanos também podem ser afetados pela doença, o que geralmente ocorre pelo consumo de leite cru ou produtos lácteos contaminados ou pela exposição de indivíduos que trabalham em contato com animais de fazendas infectados ou com tecidos derivados de animais, sendo os sintomas geralmente semelhantes aos da gripe e altamente inespecíficos, mas podendo causar também endocardite, artrite e osteomielite (Fiori et al., 2000; Golding et al., 2001). A brucelose é uma zoonose que causa substancial prejuízo econômico e também representa um perigo para a saúde pública e acredita-se que a sobrevivência dos organismos no meio ambiente possa ter um papel importante na epidemiologia da doença, pois ele é capaz de sobreviver várias condições ambientais de temperatura, umidade e pH. Por todas serem consideradas bactérias invasivas a doença consta da lista de doenças de notificação à Organização Mundial da Saúde

Animal (OIE) (Aparício, 2013; CABI, 2021a, b,c; OIE, 2018), o que reforça a importância também de evitar a entrada, utilização e disseminação desses microrganismos em território brasileiro, os quais devido à ampla gama de hospedeiros que possuem, apresentam o risco de afetar espécies nativas brasileiras.

### **Método de identificação:**

A diferenciação entre as espécies do gênero *Brucella* por métodos moleculares é muito dificultada porque há uma grande similaridade, inclusive genômica, entre elas (Halling et al., 2005; OIE, 2018). Apesar disso, muitos trabalhos vêm estudando ao longo dos anos a realização de ensaios de PCR para otimizar essa identificação e há ensaios atualmente capazes não só de identificar isolados do gênero *Brucella*, mas também de diferenciar, de forma satisfatória, a maioria das espécies do gênero. Caso o solicitante tenha o interesse de registrar um isolado de outro gênero da família Brucellaceae há a possibilidade de utilização apenas do gene que codifica o rRNA 16S, como descrito no trabalho de Herman & Ridder, 1992. No ensaio são utilizados os primers Ba148-167F e Ba928-948R, listados na tabela abaixo, os quais são capazes de gerar um fragmento que diferencia bem isolados do gênero *Brucella* dos demais microrganismos dessa família. Entretanto, não distingue bem especificamente as espécies *B. suis*, *B. melitensis* e *B. abortus* das demais espécies do gênero. Assim, como a restrição de uso é apenas para essas espécies, caso o solicitante tenha a intenção de registrar qualquer outra espécie do gênero *Brucella* é preciso garantir que não se trata especificamente delas. Não foram encontrados nos trabalhos levantados um único par de primers capaz de distinguir essas três espécies das demais. Assim, sugere-se a utilização da metodologia do ensaio de Kumar & colaboradores (2011), que desenvolveram um ensaio PCR multiplex que permite a identificação e até mesmo diferenciação das três espécies causadoras da brucelose a partir do polimorfismo do elemento genético IS711 a partir de primers específicos para cada espécie, listados abaixo.

Grupo/Gene	Sequências dos primers (foward/reverse)	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
gênero <i>Brucella</i> (rDNA 16S)	Ba148-167F:5'-TGCTAATACCGTATGTGCTT Ba928-948R:5'-TTGACATCCCGGTCGCGGGTTA	800	Herman & Ridder, 1992
<i>Brucella abortus</i> (elemento genético IS711)	F:GACGAACGGAATTTCCAATCCC R:TGCCGATCAACTTAAGGGCCTTCA	498	Kumar et al., 2011
<i>Brucella melitensis</i> (elemento genético IS711)	F:AAATCGCGTCCTGCTGGTCTGA R:TGCCGATCAACTTAAGGGCCTTCA	738	Kumar et al., 2011
<i>Brucella suis</i> (elemento genético IS711)	F:GCGCGGTTTCTGAAGGTTCAAG R:TGCCGATCAACTTAAGGGCCTTCA	285	Kumar et al., 2011

### **Referências:**

Aguiar, D. M. D., Cavalcante, G. T., Vasconcellos, S. A., Megid, J., Salgado, V. R., Cruz, T. F., ... & Gennari, S. M. (2005). Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella canis* em cães rurais e urbanos do Município de Monte Negro, Rondônia, Brasil. *Ciência Rural*, 35(5), 1216-1219.

Aparicio, E. D. (2013). Epidemiology of brucellosis in domestic animals caused by *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Brucella abortus*. *Rev. Sci. Tech*, 32(1), 53-60.

Azevedo, S. S. D., Silva, M. L. C. R., Batista, C. D. S. A., Gomes, A. A. D. B., Vasconcellos, S. A., & Alves, C. J. (2010). Anticorpos anti *Brucella abortus*, anti *Brucella canis* e anti *Leptospira spp.* em raposas (*Pseudalopex vetulus*) do semiárido paraibano, Nordeste do Brasil. *Ciência Rural*, 40(1), 190-192.

CABI Dataset (a): brucellosis (*Brucella abortus*). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/90735>. Acesso em: 08 de janeiro de 2021.

CABI Dataset (b): brucellosis (*Brucella melitensis*). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/90734>. Acesso em: 08 de janeiro de 2021.

CABI Dataset (c): brucellosis (*Brucella suis*). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/68584>. Acesso em: 08 de janeiro de 2021.

dos Reis, C. B. M., Hoffmann, R. C., da Silva Santos, R., Turri, R. D. J. G., & de Godoy Oriani, M. R. (2008). Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella canis* e anti-*Brucella abortus* em cães errantes da cidade de São João da Boa Vista, Estado de São Paulo, Brasil (2002-2003). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 45(1), 32-34.

Fiori, P. L., Mastrandrea, S., Rappelli, P., & Cappuccinelli, P. (2000). *Brucella abortus* infection acquired in microbiology laboratories. *Journal of clinical microbiology*, 38(5), 2005-2006.

Golding, B., Scott, D. E., Scharf, O., Huang, L. Y., Zaitseva, M., Lapham, C., ... & Golding, H. (2001). Immunity and protection against *Brucella abortus*. *Microbes and infection*, 3(1), 43-48.

Halling, S. M., Peterson-Burch, B. D., Bricker, B. J., Zuerner, R. L., Qing, Z., Li, L. L., ... & Olsen, S. C. (2005). Completion of the genome sequence of *Brucella abortus* and comparison to the highly similar genomes of *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. *Journal of Bacteriology*, 187(8), 2715-2726.

Herman, L. I. E. V. E., & De Ridder, H. (1992). Identification of *Brucella* spp. by using the polymerase chain reaction. *Applied and environmental microbiology*, 58(6), 2099-2101.

Kumar, S., Tuteja, U., Sarika, K., Singh, D. K., Kumar, A., & Kumar, O. (2011). Rapid multiplex PCR assay for the simultaneous detection of the *Brucella* Genus, *B. abortus*, *B. melitensis*, and *B. suis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21(1), 89-92.

Mathias, L. A. (2008). Brucelose animal e suas implicações em saúde pública. *Biológico, São Paulo*, 70(2), 47-48.

OIE (2018) Brucellosis (*Brucella abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*). Infection with *B. abortus*, *B. melitensis* e *B. suis*.

Salaberry, S. R. S., Paulin, L. M., Santana, R. L., Castro, J. R., & Lima-Ribeiro, A. M. C. (2011). Pesquisa de anticorpos anti-*Brucella abortus* e anti-*Brucella ovis* em ovinos no município de Uberlândia, MG. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 63(4), 1022-1024.

Varges, R., Medeiros, L., & Lilienbaum, W. (2008). Sororreatividade para *Brucella abortus* em rebanho caprinono estado do Rio de Janeiro, Brasil: relato de caso. *Rev. Bras. Ciênc. Vet*, 103-104.

## II.4 *Brucella ovis*

### Classificação Taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Alphaproteobacteria  
Ordem: Rhizobiales  
Família: Brucellaceae  
Gênero: Brucella  
Espécie: *Brucella ovis*

### Motivo da inclusão na lista:

*Brucella ovis* é o agente causador da brucelose ovina ou epididimite contagiosa ovina, doença crônica que acomete o trato reprodutivo de carneiros, causando lesões genitais que levam ao aumento do volume e da consistência do epidídimo (epididimite), o que provoca a atrofia dos testículos e comprometimento da qualidade do sêmen (CABI, 2021). Por conta dessas alterações a fertilidade do rebanho fica reduzida e esse é o principal sintoma dessa doença, assim, embora *Brucella ovis* também seja associado a abortos e aumento da mortalidade perinatal, seu efeito primário é nos machos. A transmissão dessa bactéria ocorre principalmente por ingestão ou contato sexual com secreções genitais contaminadas e muitas vezes é uma doença que pode passar despercebida por algum tempo por não causar sinais clínicos óbvios (Ridler & West, 2011). Para seu controle recomenda-se a identificação e isolamento de animais positivos, seguido da eliminação dos mesmos, o que faz com que os prejuízos econômicos em decorrência da sua ocorrência no rebanho sejam elevados (Embrapa, 2021). Pelo fato da bactéria ser considerada invasiva pelos órgãos de controle, torna-se imprescindível a notificação da ocorrência dessa doença para fins de combate à sua disseminação. Atualmente, há registros da presença dessa doença nos seguintes países: Costa do Marfim, Kênia, Namíbia, África do Sul, Índia, Iraque, Casaquistão, Arábia Saudita, Andorra, Áustria, Bulgária, Croácia, Czechia, França, Rússia, Espanha, Canadá, Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia, Chile, Peru, Uruguai (CABI, 2021). No Brasil, houve registros da ocorrência de epididimite contagiosa ovina em anos anteriores (Rizzo et al., 2014), mas atualmente ele é considerado como um país ausente dessa doença. Não foram evidenciados casos na literatura em que a infecção fosse reconhecida em fauna nativa brasileira. Todavia, deve-se levar em consideração animais nativos que habitam em simpatia com ovinos, em áreas de criação e podem, eventualmente, ser infectados. Sendo assim, a vigilância para impedir a entrada, utilização e disseminação de *B. ovis* precisa ser eficiente para que o Brasil não seja afetado por esse patógeno invasivo.

### Método de identificação:

A identificação molecular de *B. ovis* é dificultada principalmente devido à sua similaridade com outras bactérias do gênero *Brucella*, mas vários ensaios moleculares têm sido propostos com esse fim (Bricker & Halling, 1994). Assim, caso haja interesse de se registrar qualquer isolado do gênero *Brucella* é preciso realizar ensaios que permitam a sua identificação precisa no nível de espécie e garantam que não se trate também da espécie *Brucella ovis*. Essa diferenciação não é possível, de acordo com a literatura, utilizando-se apenas o gene que codifica o rRNA 16S. Dessa maneira, dentre as metodologias levantadas sugere-se a abordagem molecular descrita no trabalho de Xavier (2009), na qual foram pesquisadas várias regiões do genoma de *B. ovis* com intuito de construir *primers* específicos para a espécie, sendo elaborado um total de 12 conjuntos a partir de um segmento do cromossomo II, contendo 28 janelas abertas de leitura (ORFs) presente na espécie *B. ovis*, mas ausente nas demais espécies do gênero. Todos se mostraram *primers* extremamente sensíveis e específicos para a espécie e, portanto, poderiam ser utilizados. Os mesmos se encontram descritos na tabela abaixo.

<b>Primers (Janela aberta de leitura - ORF)</b>	<b>Sequências dos primers (forward/reverse)</b>	<b>Tamanho do amplicon (pb)</b>
A0492	F: 5'- TTGAGACCGCTATCGTGAGGG-3' R: 5'- GTCCTTGTGGTAGATGGCAGTAG-3'	278
A0495	F: 5'- CAGGATTATGTGCTAACGATGC-3' R: 5'- CAGGTGCTCCAGAAACGATACC-3'	135
A0496	F: 5'- TGGCTATTACGACGACACTGGAAG-3' R: 5'- AAGCATCACAAAGCAGGGTCGG-3'	278
A0497	F: 5'- TCATTACCAAGAACGGTCGCC-3' R: 5'- CGCAAGATCGTCTCTGTCAGC-3'	119
A0500	F: 5'- TGGTATCTTCAGCCGTTCCAAG-3' R: 5'- ATCTTGCCCCGTTCCAGTCG-3'	225
A0502	F: 5'- TGATAAATGCTGAAC TGCCGC-3' R: 5'- CGCCGAAATACCAAAACAGAGG-3'	167
A0503	F: 5'- GCCTACGCTGAAACTTGCTTTG-3' R: 5'- ATCCCCCCCACCACTACCCATAACCGAAG-3'	228
A0504	F: 5'- TGATTGGGACGCAGACCAGAAC-3' R: 5'- CGGGTGTAACTCCAGATTATGTCG-3'	159
A0505	F: 5'- ACCAAACCAAACCTGATGTCGG-3' R: 5'- GCATTTCGGCAACCATTCC-3'	220
A0506	F: 5'- GCACCAAATATGCGGAAGATCC-3' R: 5'- TTCGATCATCGTCTGGCTCG-3'	140
A0511	F: 5'- ATGCGGCGACCAATGAAC TG-3' R: 5'- TGATGCGTTGAGGGCAATCC-3'	197
A0512	F: 5'- TTCAGGCGACTGCTAATGGCAC-3' R: 5'- AAACCGATACCTCATCCCCGAG-3'	135

### Referências bibliográficas:

Bricker, B. J., & Halling, S. M. (1994). Differentiation of *Brucella abortus* bv. 1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *Journal of clinical microbiology*, 32(11), 2660-2666.

CABI Dataset: *Brucella ovis*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/90737>. Acesso em: 08 de janeiro de 2021.

Embrapa (2021). Brucelose Ovina. Disponível em: <https://www.embrapa.br/en/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/zoossanitario-brucelose>. Acesso em: 08 de janeiro de 2021.

OIE (2018) Ovine Epididymitis: *Brucella ovis*.

Ridler, A. L., & West, D. M. (2011). Control of *Brucella ovis* infection in sheep. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 27(1), 61-66.

Rizzo, H. (2014). Ocorrência de anticorpos anti-*Brucella ovis* em ovinos com histórico de distúrbios reprodutivos no estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol.*, 99-106.

Xavier, M. N. (2009). Desenvolvimento de PCR espécie-específico para o diagnóstico da infecção por *Brucella ovis* e avaliação comparativa de métodos sorológicos.

## **II.5 *Burkholderia caryophylli***

### **Classificação taxonômica:**

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Betaproteobacteria  
Ordem: Burkholderiales  
Família: Burkholderiaceae  
Gênero: *Burkholderia*  
Espécie: *Burkholderia caryophylli*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Burkholderia caryophylli* causa a murcha bacteriana do cravo (CBW), infectando espécies vegetais das famílias da Caryophyllaceae, Gentianaceae e Asteraceae (Furuya et al., 2000). Os sintomas incluem mudança de coloração da folhagem para verde-acinzentada, amarelando e murchando; devido à rápida multiplicação de células ocorre a tensão ao redor dos vasos e fendas longitudinais internodais do caule, que posteriormente evoluem para cânceres profundos. As raízes das plantas infectadas, após murcharem, ficam podres, sendo as plantas facilmente arrancadas do solo e, ao corte, as raízes apresentam manchas castanhas descontínuas (CABI, 2020). Kawanishi e colaboradores (2009) ressaltam que a CBW é uma doença de difícil controle por agroquímicos, e, por isso, é importante que o patógeno seja identificado previamente no ambiente onde se pretende instalar o plantio, por se tratar de uma doença transmitida pelo solo. São relatados casos de ocorrência na Ásia, Europa, América do Norte e América do Sul. No Brasil, há relato da espécie com ocorrência em cultivares de São Paulo (EPPO, 2020). Não foram encontrados trabalhos demonstrando a infecção direta em espécies nativas brasileiras. Todavia, ressalta-se que nas famílias relatadas como hospedeiras, há vários vegetais representantes da flora brasileira que possuem um potencial risco de contaminação por este patógeno. Com isto, além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu potencial de propagação, microrganismos desta espécie são descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Dada a gravidade da doença causada pela espécie, a difícil compreensão de sua ecologia, o potencial risco de infecção em representantes silvestres das famílias infectadas, acrescida de sua conhecida capacidade de invasibilidade, recomenda-se a não utilização de *Burkholderia caryophylli* sob quaisquer condições.

### **Método de identificação:**

O gênero *Burkholderia* foi proposto por Yabuuchi e colaboradores em 1992 a partir de uma divisão do gênero *Pseudomonas*. Como a restrição de uso é apenas para a espécie *B. caryophylli*, é importante que em qualquer pedido de registro de demais espécies do gênero *Burkholderia* fique comprovado que não se trate de *B. caryophylli*. Entretanto, essa identificação precisa é extremamente difícil devido à alta diversidade de espécies presentes no gênero e ao fato de serem muito semelhantes entre si. Ao longo dos anos diversos pesquisadores avaliaram a utilização do gene que codifica o rRNA 16S e outros alvos moleculares como genes *recA* (proteína RecA), *hisA* (1- (5fosforibosil)-5-[(fosforibosilamino)metilidenoamino]imidazol-4-carboximida isomerase), *rpsU* (proteína ribossomal S21 30S) *egroEl* (chaperona molecular GroEl), visando a diferenciação entre as espécies de *Burkholderia* (Suppiah et al., 2010; Ragupathi e Veeraraghavan, 2019). A partir desses trabalhos foi possível organizar as espécies do gênero em diferentes *clusters*, estando a espécie *B. caryophylli* contida no terceiro *cluster*, o qual é formado também pelas espécies *B. multivorans*, *Pandorea norimbergensis*, *B. ubonensis*, *B. stabilis*, *B. cenocepacia*, *B. cepacia*, *B. pyrrociniae*, *B. ambifaria*, *B. anthina*, *B. vietnamensis* e *B. dolosa*. Foram encontradas metodologias, utilizando genes *housekeeping*, que permitem a identificação do *cluster* no qual a espécie se encontra, entretanto, não foram identificados *primers* exclusivos e nem outros métodos moleculares capazes de identificar especificamente *B. caryophylli*. Dessa maneira, sugere-se a

utilização de abordagem molecular a partir de PCR convencional com os *primers* descritos no trabalho de Frickmann e colaboradores (2014), o quais foram desenhados a partir do gene *rpsU*, que codifica um homólogo da proteína ribossomal S21, e permitem a identificação do *cluster* no qual se encontra *B. caryophylli*. Caso haja amplificação positiva, apesar de não se ter certeza de que se trata da espécie em questão, sugere-se vetar seu uso.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
fup1	5'-GTG-GAG-CTT-CTTCGG-CAG-CAT-3'
fup2	5'-ATG-ACG-ACG-ACG-ATTCTT-TTG-AA-3'

### Referências Bibliográficas

CABI Dataset: *Burkholderia caryophylli* (bacterial wilt of carnation). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44938#REF-DDB-183911>. Acesso em: 06 de janeiro de 2021.

EPPO (2020). EPPO Global database. In: EPPO Global database, Paris, France: EPPO. In: CABI Dataset: *Burkholderia caryophylli* (bacterial wilt of carnation). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44938#REF-DDB-183911>. Acesso em: 06 de janeiro de 2021.

Frickmann, H.; Neubauer, H.; Loderstaedt, U.; Derschum, H.; Hagen, R.M. (2014). *rpsU*-Based discrimination within genus *Burkholderia*. *European Journal of Microbiology and Immunology* 4, 2, pp.106-116.

Furuya, N.; Masunaga, T.; Khan, A.A.; Iiyama, K.; Matsumoto, M.; Matsuyama, N. (2000). Bacterial Wilt of Russell Prairie Gentian Caused by *Burkholderia caryophylli*. *J. Gen. Plant Pathol.* 66: 316-322.

Ragupathi, N.K.D.; e Veeraraghavan, B. (2019). Accurate identification and epidemiological characterization of *Burkholderia cepacia* complex: an update. *Ann. Clin. Microbiol Antimicrob*, 18:7.

Suppiah, J.; Thimma, J.S.; Cheah, S.H.; Vadivelu, J. (2010). Development and evaluation of polymerase chain reaction assay to detect *Burkholderia* genus and to differentiate the species in clinical specimens. *FEMS Microbiol. Lett.*, 306, 9–14.

Yabuuchi, E., Kosako, Y., Oyaizu, H., Yano, I., Hotta, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Arakawa, M. (1992). 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.*; 36 (12):1251-75. Erratum in: *Microbiol Immunol* 1993;37(4):335.

## **II.6 *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis***

### **Classificação taxonômica:**

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Epsilonproteobacteria  
Ordem: Campylobacterales  
Família: Campylobacteraceae  
Gênero: *Campylobacter*  
Espécie: *Campylobacter fetus*  
Subespécie: *Venerealis*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* é o agente causador da doença Campilobacteriose genital bovina também chamada de Campilobacteriose venérea bovina. Essa é uma doença sexualmente transmitida e causa infertilidade, morte embrionária precoce e aborto. Essa bactéria coloniza os sistemas genitais de machos e fêmeas e a transmissão ocorre durante o acasalamento, podendo ainda ocorrer através da inseminação artificial com sêmen de machos infectados (OIE, 2018). Essa doença tem distribuição em vários países e, dessa forma, está presente em todos os continentes. Como esta bactéria está na lista de bactérias invasivas, a notificação dessa doença se torna obrigatória. Os principais países que a notificaram são: Kênia, Namíbia, África do Sul, Japão, França, Alemanha, Irlanda, Reino Unido, Canadá, Estados Unidos, Austrália, Nova Zelândia, Vanuatu, Argentina, Paraguai, Venezuela e o Brasil (CABI/EPPO, 2021). No Brasil mais recentemente foram registrados casos dessa doença nos estados de Pernambuco, Paraíba, Alagoas e Minas Gerais (Botelho et al., 2018; Borges et al., 2018; de Oliveira Filho et al., 2018; Nascimento et al., 2018). Segundo dados do Ministério da Saúde (2011), algumas espécies, dentre elas, *C. fetus* têm sido consideradas importantes zoonoses de distribuição mundial. São descritos casos de recuperação de microrganismos deste gênero para além de animais de criação (bovinos, suínos, ovinos e aves), como também em felinos, canídeos e roedores silvestres e domésticos, bem como em pássaros silvestres. O microrganismo é adquirido pela ingestão de alimentos contaminados ou por contato com fezes de animais infectados, tornando-o de fácil disseminação em ambientes de comum habitação. Dada a sua importância epidemiológica, as características de invasibilidade dessa bactéria e a ampla gama de hospedeiros que possuem, apresentando o risco de afetar espécies nativas brasileiras e causar desequilíbrios ao ambiente, recomenda-se a não utilização de *Campylobacter fetus* sob quaisquer condições.

### **Método de identificação:**

A identificação de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* é dificultada pela sua semelhança genotípica e fenotípica com *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Dessa maneira, muitos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de métodos moleculares, usando tanto PCR quanto qPCR, visando a identificação dessa subespécie, mas ainda assim todos apresentam problemas relacionados à ocorrência de falsos positivos e negativos (OIE, 2018). Dessa maneira, caso haja pedidos do registro de espécies do gênero *Campylobacter*, é necessário garantir que não se trate de *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*, mesmo que sejam utilizadas metodologias que apresentem riscos de apresentarem resultados falsos positivos com *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. Sugere-se a abordagem descrita no trabalho de Schulze & colaboradores (2006), a qual é derivada da metodologia descrita no trabalho de Hum e colaboradores (1997). Para tal são utilizados dois conjuntos de primers em duas reações diferentes, primeiramente o conjunto MG3F e MG4R, que é específico para a espécie *Campylobacter fetus* e, posteriormente, um segundo par, VenSF e VenSR, o qual é específico para a subsp. *venerealis*, sendo utilizado para a diferenciação. A reação, apesar de eficiente, apresenta resultados errôneos entre as duas subespécies em uma média de 10% dos testes. Os primers utilizados podem ser visualizados na tabela abaixo

Grupo	Sequências dos primers (forward/reverse)	Tamanho do amplicon (pb)
<i>Campylobacter fetus</i>	MG3F: 5'-GGTAGCCGCAGCTGCTAAGAT - 3' MG4R: 5'-TAGCTACAATAACGACAAC - 3'	960
<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	VenSF: 5'-CTTAGCAGTTGCGATATTGCCATT - 3' VenSR: 5'-GCTTTGAGATAACAATAAGAGCTT - 3'	142

### Referências bibliográficas:

Botelho, M. P. A., Hirsch, C., Lage, A. P., da Rocha, C. M. B. M., Dorneles, E. M. S., Cardoso, P. G., & da Costa, G. M. (2018). Prevalence of *Tritrichomonas foetus* and *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* among bulls slaughtered in the state of Minas Gerais, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 39(5), 2039-2048.

Borges, J. M., Soares, L. B. F., Silva, B. P., Macedo, A. A., Oliveira, J. M. B., & Pinheiro Júnior, J. W. (2018). Infection occurrence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Tritrichomonas foetus* in buffaloes in the state of Pernambuco, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70(2), 457-462.

Brasil. Ministério da Saúde. (2011). Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter*: gênero *Campylobacter*: diagnóstico laboratorial clássico e molecular / Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. – Brasília, 2011.

CABI Dataset: *Campylobacter fetus* subsp.*venerealis*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/90246>. Acesso em: 07 de janeiro de 2021.

de Oliveira Filho, R. B., Malta, K. C., Lúcio, É. C., Nascimento, G. G., da Costa Dutra, L., Mota, R. A., & Pinheiro Jr, J. W. (2018). Prevalence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* in dairy cows from Brejo Paraibano, Brazil. *Acta Scientiae Veterinariae*, 46(1), 7.

Hum, S., Quinn, K., Brunner, J., & On, S. L. (1997). Evaluation of a PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter fetus* subspecies. *Australian Veterinary Journal*, 75(11), 827-831.

Nascimento, G. G., de Oliveira, P. R. F., da Silva, E. M., Mota, R. A., & Junior, J. W. P. (2018). Occurrence of *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* and *Tritrichomonas foetus*DNA in bulls from Alagoas State, Brazil. *Semina: Ciências Agrárias*, 39(6), 2477-2486.

OIE (2018). Terrestrial Manual for Bovine genital campylobacteriosis.

Schulze, F., Bagon, A., Müller, W., & Hotzel, H. (2006). Identification of *Campylobacter fetus* subspecies by phenotypic differentiation and PCR. *Journal of clinical microbiology*, 44(6), 2019-2024.

## II.7 *Candidatus Hepatobacter penaei*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Alphaproteobacteria  
Ordem: Rickettsiales  
Família: sem classificação  
Gênero: sem classificação  
Espécie: *Candidatus Hepatobacter penaei*

### Motivo da inclusão na lista:

A bactéria *Candidatus Hepatobacter penaei* é um patógeno celular obrigatório da ordem Rickettsiales responsável por causar a hepatopancreatite necrotizante em culturas de camarões marinhos peneídeos, da família Penaidae (CABI, 2020). A transmissão ocorre através da ingestão de animais mortos contaminados ou de material contaminado que infectam as células epiteliais do hepatopâncreas desses camarões, um local muito sensível à penetração de patógenos, por não serem revestidos de exoesqueleto (Gomes et al., 2007; Morales-Covarrubias et al., 2018). O patógeno causa danos nos túbulos hepatopancreáticos, como descamação celular atrofia tubular e melanização e os camarões contaminados apresentam-se letárgicos, anoréxicos, com o exoesqueleto amolecido, corpo flácido, cutícula frouxa, brânquias escurecidas e hepatopâncreas atrofiado e pálido (Gomes et al., 2007; Morales-Covarrubias et al., 2018). A bactéria *Candidatus Hepatobacter penaei* foi relatada pela primeira vez em 1985 nos Estados Unidos e tem causado surtos desde então (CABI, 2020). A doença não tem uma ampla distribuição mundial, sendo limitada ao Hemisfério Ocidental, mas vem causando mortalidade significativa de camarões cultivados nesses países (Nunan et al., 2013; Campos-Garcia et al., 2019). Dessa maneira, em países nos quais a carcinocultura possui uma grande importância econômica a presença do patógeno pode ser devastadora. Esse é o caso de países latino-americanos que contribuem com cerca de 15% da carcinocultura mundial, sendo o Brasil o quinto maior produtor mundial com cerca de 20.000 hectares de lagoas de cultivo. Essa produção é importante principalmente no litoral nordestino, com destaque para a criação do camarão nativo *Penaeus brasiliensis*, da família Penaidae (Nunes, 2001). Por conta dos grandes impactos econômicos e também ambientais a diferentes espécies de camarão, esse patógeno é considerado um problema sério para a indústria de criação de camarão no Hemisfério Ocidental e a hepatopancreatite necrosante está na lista de doenças de notificação à OIE (CABI, 2020). Por tais motivos, principalmente o fato de possuirmos camarões peneídeos nativos, recomenda-se a não utilização deste microrganismo para fins de introdução ambiental.

### Método de identificação:

Para a identificação da bactéria *Candidatus Hepatobacter penaei*, após isolamento do DNA, os principais métodos moleculares utilizados são a PCR convencional e a qPCR. Os principais genes alvos de amplificação pelas técnicas de PCR convencional são o rDNA 16S e o gene responsável por codificar a subunidade β da enzima DNA girase (*GyrB*) e são utilizados *primers* universais para regiões variáveis desses genes (Nunan et al., 2013). Assim, como a classificação taxonômica deste grupo é incerta sugere-se que sempre que houver solicitação de registro de organismos da ordem Rickettsiales, confirme-se que não se trata de *Candidatus Hepatobacter penaei*. É possível encontrar a indicação de *primers* diferentes, baseados nos genes mencionados, para a identificação desse organismo. Sugere-se a utilização do protocolo descrito pela OIE, baseado em abordagem descrita por Aranguren e colaboradores, (2010), com a utilização de ensaios de PCR e qPCR baseados na amplificação do gene que codifica o rRNA 16S, a partir dos oligonucleotídeos iniciadores específicos NHPF2 e NHPR2, os quais estão detalhados na tabela abaixo (OIE, 2019).

<i>Primers</i>	<b>Sequências</b>
NHPF2	5'- CGTTGGAGGTTCGTCCTTCAGT - 3'
NHPR2	5'- GCCATGAGGACCTGACATCATC -3'

### **Referências Bibliográficas:**

Aranguren, L. F., Tang, K. F., & Lightner, D. V. (2010). Quantification of the bacterial agent of necrotizing hepatopancreatitis (NHP-B) by real-time PCR and comparison of survival and NHP load of two shrimp populations. *Aquaculture*, 307(3-4), 187-192.

Bastos Gomes, G., Shinozaki Mendes, E., & Arns da Silva, V. (2007). Necrotizing hepatopancreatitis (NHP) in marine shrimp. *Ci. Vet. Tróp.*, 47-53.

CABI Dataset Necrotising hepatopancreatitis:. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/73087>  
Acesso em: 05 de janeiro de 2021.

Campos-García, J. C., Rodríguez-Ramírez, R., Avila-Villa, L. A., Gómez-Aldama, O., Arias-Martínez, J., & Gollas-Galván, T. (2020). Fractal dimension of hepatopancreas of white shrimp *Litopenaeus vannamei* infected with *Hepatobacter penaei* bacteria (NHPB). *Aquaculture International*, 28(2), 661-673.

Morales-Covarrubias, M. S., Cuéllar-Anjel, J., Varela-Mejías, A., & Elizondo-Ovares, C. (2018). Shrimp bacterial infections in Latin America: a review. *Asian Fisheries Science*, 31, 76-87.

Nunes, A.J.P. (2001). Nota técnica Panorama da aquicultura. O cultivo de camarões marinhos no nordeste do Brasil. Disponível em: <https://panoramadaaquicultura.com.br/o-cultivo-de-camaroes-marinhos-no-nordeste-do-brasil/>. Acesso em: 05 de janeiro de 2021.

Nunan, L. M., Pantoja, C. R., Gomez-Jimenez, S., & Lightner, D. V. (2013). “*Candidatus Hepatobacter penaei*,” an intracellular pathogenic enteric bacterium in the hepatopancreas of the marine shrimp *Penaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda). *Applied and environmental microbiology*, 79(4), 1407-1409.

OIE (2019). Infection with *Hepatobacter penaei* (Necrotising Hepatopancreatitis).

## II.8 *Candidatus Liberibacter* sp.

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Alphaproteobacteria  
Ordem: Rhizobiales  
Família: Rhizobiaceae  
Gênero: *Candidatus* Liberibacter

### Motivo da inclusão na lista:

As bactérias *Candidatus* Liberibacter spp. assim como outras bactérias da ordem Rhizobiales são parasitas intracelulares capazes de habitar o interior dos vasos de floema (Machado et al., 2017). Elas estão associadas ao *huanglongbing* (HLB, ou *exgreening*) dos citros (família Rutaceae), que é uma das doenças mais graves para a citricultura, sendo três as espécies associadas com as diferentes formas da doença: *Ca. Liberibacter asiaticus* (Las), *Ca. Liberibacter africanus* (Laf) e *Ca. Liberibacter americanus* (Lam), todas possuem baixa diversidade genética, porém são bastantes distintas fenotipicamente umas das outras (Li et al., 2006; Machado et al., 2017). Esses patógenos são transmitidos por insetos psilídeos e brotamento dos materiais vegetais contaminados (Li et al., 2006). Las é um patógeno tolerante ao calor e transmitido por *Diaphorina citri*, Laf é um patógeno sensível ao calor e transmitido por *Trioza erytreae* e Lam é um patógeno tolerante ao calor e transmitido por *D. citri* (Li et al., 2006). Essas bactérias apresentam distribuição altamente irregular nos tecidos do hospedeiro, podendo ser detectadas em raízes, lâmina foliar, pecíolo, sementes e frutos, particularmente no eixo da columela e causam expressivos distúrbios no seu metabolismo, constituindo significativo fator de redução de produtividade e qualidade de fruto a curto e médio prazos (Boscariol-Camargo et al., 2010; Machado et al., 2017). Os primeiros relatos da doença datam da década de 70 e atualmente está amplamente difundida nos países asiáticos, no subcontinente indiano, na África meridional e mais recentemente no Brasil, em 2004 no estado de São Paulo (Li et al., 2006; CABI, 2021a). Pelo fato desses patógenos possuírem caráter extremamente danoso às culturas, podendo destruir pomares de citros onde ocorrem dentro de 5 a 8 anos, resultarem em enormes prejuízos econômicos em todas as regiões onde ocorrem, serem facilmente transmitidos por insetos psilídeos e serem microrganismos que possuem grandes propriedades invasivas, eles foram classificados pelo governo americano como agentes selecionados pelo potencial para bioterrorismo, seu uso requer permissão do governo e eles são considerados organismos de quarentena (Teixeira et al., 2005; Li et al., 2008; CABI, 2021b). Assim, sugere-se sua exclusão de uso para introdução e disseminação no Brasil, dado o alto risco de ameaça à biodiversidade brasileira e possibilidade de interferência nas populações de Rutáceas, principalmente as nativas do país.

### Método de identificação:

Técnicas moleculares têm sido utilizadas tanto para identificar quanto diferenciar espécies dentro do gênero *Candidatus* Liberibacter spp., quando isso for necessário, dentre as quais PCR convencional, qPCR, PCR multiplex, nested-PCR, amplificação isotérmica mediada por loop (LAMP) e outras (Li et al., 2006; Li et al., 2008). Como a restrição de uso se estende a todos os organismos do gênero, não há a necessidade de identificação precisa em nível de espécie, mas é preciso garantir que qualquer isolado da família Rhizobiaceae que se pretenda registrar não pertença ao gênero em questão. Com base na literatura disponível, foi possível encontrar trabalhos para identificação das espécies do gênero *Candidatus* Liberibacter spp. baseados na amplificação de sequências específicas do gene que codifica o rRNA 16S, a proteína ribossomal J (*rpJ*), a proteína de membrana externa (*omp*) ou genes de proteínas ribossomais do β-operon (Tian et al., 1996; Hung et al., 1999; Teixeira et al., 2005). Dentre os protocolos disponíveis, pela simplicidade, indica-se o descrito no trabalho de Jagoueix e colaboradores (1996), que se baseia na

utilização dos *primers* universais OA1 e OI2c utilizados para amplificação de regiões do gene rDNA 16S das espécies do gênero. A descrição dos *primers* se encontra na tabela abaixo:

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
OA1	5'-GCGCGTATTTATACGAGCGGCA-3'
OI2c	5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCAT-3'

### **Referências Bibliográficas:**

CABI (a) Dataset: *Liberibacter americanos* (American greening). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16566>. Acesso em: 10 de janeiro de 2021.

CABI (b) Dataset: *Liberibacter americanos* (Asian greening). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/16565>. Acesso em: 10 de janeiro de 2021.

Coletta-Filho, H. D., Takita, M. A., Targon, M. L. P. N., & Machado, M. A. (2005). Analysis of 16S rDNA sequences from *Citrus* huanglongbing bacteria reveal a different “Ca. *Liberibacter*” strain associated with *Citrus* disease in São Paulo. *Plant Disease*, 89(8), 848-852.

Hung, T. H., Wu, N. M., & Su, H. J. (1999). Development of a rapid method for the diagnosis of *Citrus* greening disease using the polymerase chain reaction. *Journal of Phytopathology*, 147(10), 599-604.

Jagoueix, S., Bové, J. M., & Garnier, M. (1996). PCR detection of the two «Candidatus» liberobacter species associated with greening disease of citrus. *Molecular and cellular probes*, 10(1), 43-50.

Li, W., Hartung, J. S., & Levy, L. (2006). Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with *Citrus* huanglongbing. *Journal of microbiological methods*, 66(1), 104-115.

Li, W., Li, D., Twieg, E., Hartung, J. S., & Levy, L. (2008). Optimized quantification of unculturable *Candidatus Liberibacter* spp. in host plants using real-time PCR. *Plant Disease*, 92(6), 854-861.

Machado, M. A., Locali-Fabris, E. C., & Della Coletta-Filho, H. (2017). *Candidatus Liberibacter* spp., citrus huanglongbing agents. *Citrus Research & Technology*, 31(1), 25-35.

Teixeira, D. C., Saillard, C., Eveillard, S., Danet, J. L., da Costa, P. I., Ayres, A. J., & Bove, J. (2005). ‘*Candidatus Liberibacter americanus*’ associated with *Citrus* huanglongbing (greening disease) in São Paulo State, Brazil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(5), 1857-1862.

Tian, Y., Ke, S., & Ke, C. (1996). Polymerase chain reaction for detection and quantitation of *Liberobacter asiaticum*, the bacterium associated with huanglongbing (greening) of *Citrus* in China. In *International Organization of Citrus Virologists Conference Proceedings (1957-2010)* (Vol. 13, No. 13).

## II.9 *Candidatus Phytoplasma* sp.

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Classe: Mollicutes  
Ordem: Acholeplasmatales  
Família: Acholeplasmataceae  
Gênero: *Candidatus Phytoplasma* sp.

### Motivo da inclusão na lista:

Os fitoplasmas são um grupo de bactérias desprovidas de parede celular, razão pela qual possuem elevada pleiomorfia (sem forma específica), que apresenta diferenças significativas na distribuição geográfica dos vários subgrupos (Marcone et al., 2000). Os subgrupos demonstram especificidade de hospedeiro, o que explica distribuição geográfica restrita (Lee et al., 2012). A infecção ocorre principalmente em espécies da família Arecaceae (Palmeiras, Coqueiros), mas inclui outros hospedeiros como a flor-aranha-franjada, erva daninha de ferro, feijão selvagem e erva-de-cobra azul-claro e outros (famílias Fabaceae, Amaryllidaceae, Amaranthaceae, Rosaceae) (CABI, 2020). Após infecção é observado um acentuado desequilíbrio dos hormônios vegetais com sintomas típicos em que incluem amarelecimento das folhas, nanismo, proliferação de brotos auxiliares (aparência de vassoura de bruxa), crescimento volumoso nas pontas dos caules, virescência das flores e esterilidade, filodia, alongamento e estiolamento de entrenós, folhas pequenas e deformadas (Youssef et al., 2017; Duduk et al., 2018). Um dos representantes de grande interesse fitossanitário é a espécie *Candidatus Phytoplasma pyri*, responsável pela doença do declínio da pera, causando amarelamento da folha, avermelhamento, necrose ondulante, folha pequena, desfolha prematura, encurtamento do internodo e declínio progressivo dos vegetais próximos (Fernández et al., 2017). Uma linha necrótica pode ser observada na parte interna da casca na união entre o estoque com o enxerto e, com o agravamento, os sintomas podem variar desde atrofia severa até a morte do vegetal (Pastore et al., 1998). Esta espécie apresenta relatos de ocorrência na Europa, Ásia, América do Norte e do Sul e na África (Marrocos). Um segundo representante expressivo do gênero é o *Candidatus Phytoplasma mali*, conhecido por causar a doença do distúrbio de proliferação em maçãs, causando às plantas infectadas um crescimento distorcido e atrofiado (Siewert et al., 2014). O distúrbio provocado pela espécie induz uma série de sintomas que são específicos, como vassouras de bruxa, rosetas e estípulas aumentadas, ou inespecíficos, como vermelhidão foliar, amarelecimento, supressão de crescimento, e frutas subdimensionadas (Seemüller et al., 2010). Esta espécie apresenta relatos de ocorrência na Ásia, África, Europa e América do Norte. No Brasil, Silva e colaboradores (2009) relatam a espécie *Candidatus Phytoplasma brasiliense* causando clorose foliar, superbrotamento de ramos, folhas e flores pequenas, ramos finos, declínio e morte de ramos ou da planta toda em espécies de Hibiscos e ressaltam que há ocorrência de casos similares em Hibiscos no Japão. Além de sua reconhecida ação fitopatogênica e sua ampla distribuição geográfica microrganismos desse gênero possuem potencial de invasibilidade e estão descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Dada a gravidade da doença causada por espécies de *Candidatus Phytoplasma*, sua capacidade de invasibilidade e seu potencial de infectar representantes nativos brasileiros das famílias afetadas, recomenda-se a não utilização desses fitopatógenos sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

O gênero *Candidatus Phytoplasma* é formado por uma grande variedade de espécies, as quais se organizam em subgrupos, e se encontram na literatura muitos trabalhos focados no desenvolvimento de *primers* para a identificação de grupos ou algumas espécies específicas do gênero (Lee et al., 2010). A escolha do melhor *primer* a ser utilizado é realizada em função da espécie de interesse considerando o subgrupo pertencente, os quais são baseados em diversos genes e regiões diferentes, tais como região espaçadora

intergênica 16S - 23S, gene que codifica o rRNA 16S, além dos genes *hflB* (protease *hflB*), *imp* (Beta lactamase), *tuf* (fator de elongação TU) e *secY* (subunidade de translocase de proteína *secY*) (Smart et al., 1996; Schneider & Seemüller, 2009; Makarova et al., 2012). Entretanto, como a restrição de uso é referente a todas as espécies do gênero, não há a necessidade de identificação em nível de espécie, apenas é preciso garantir que quando houver interesse de se registrar um microrganismo da família Acholeplasmataceae, ele não pertença ao gênero *Candidatus Phytoplasma*. Para tal sugere-se a utilização da metodologia descrita no trabalho de Smart e colaboradores (1996), baseada na utilização dos *primers* universais P1 e Tint a partir de PCR convencional, que amplificam um fragmento de 200 pb da região espaçadora intergênica 16S - 23S que se encontra presente em todos os fitoplasmas, sendo considerado um par de *primers* universal para esse grupo. O conjunto de *primers* se mostrou sensível às espécies de fitoplasmas e outros trabalhos posteriores também obtiveram êxito em sua utilização (Silva et al., 2009). A descrição dos *primers* se encontra na tabela abaixo:

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
P1	5'-AAGAGTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'
Tint	5'-TCAGGCGTGTGCTCTAACCAAGC-3'

### Referências Bibliográficas

CABI Dataset: *Candidatus Phytoplasma* (lethal yellowing (LY)). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/38647>. Acesso em: 08 de janeiro de 2021.

Duduk, B.; Stepanović, J.; Yadav, J.; Rao, G.P. (2018). *Phytoplasmas in Weeds and Wild Plants*. Springer Nature Singapore Pte Ltd., *Phytoplasmas: Plant Pathogenic Bacteria - I*, Chapter 11. [https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3\\_11](https://doi.org/10.1007/978-981-13-0119-3_11).

Fernández, F.D.; Marini, D.; Farrando, R.; Conci, L.R. (2017). First report of a '*Candidatus Phytoplasma pyri*' strain in Argentina. *Australasian Plant Dis. Notes*, 12: 8.

Lee, I.-M.; Bottner-Parker, K. D.; Zhao, Y.; Davis, R. E.; Harrison, N. A. (2010). Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on *secY* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60, 2887–2897.

Lee, I.-M.; Bottner-Parker, K. D.; Zhao, Y.; Bertaccini, A.; Davis, R. E. (2012). Differentiation and classification of phytoplasmas in the pigeon pea witches'-broom group (16SrIX): an update based on multiple gene sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62, 2279–2285.

Makarova, O.; Contaldo, N.; Paltrinieri, S.; Kawube, G.; Bertaccini, A. et al. (2012) DNA Barcoding for Identification of '*Candidatus Phytoplasmas*' Using a Fragment of the Elongation Factor Tu Gene. *PLoS ONE*, 7(12): e52092.

Marcone, C.; Lee, I-M.; Davis, R. E.; Ragazzino, A.; Seemüller, E. (2000). Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1703–1713.

Pastore, M.; Santonastaso, M.; Vibio, M.; Bertaccini, A.; Lee, I.M.; La Cara, F. (1998). Susceptibility to *Phytoplasma* infection of three pear varieties grafted on different rootstocks. *Acta Hort.*, 472, ISHS.

Schneider, B.; Seemüller, E. Strain differentiation of *Candidatus Phytoplasma mali* by SSCP- and sequence analyses of the *hflb* gene (2009). *Journal of Plant Pathology*, 91 (1), 103-112.

Seemüller, E.; Kiss, E.; Sule, S.; Schneider, B. (2010). Multiple Infection of Apple Trees by Distinct Strains of '*Candidatus Phytoplasma mali*' and Its Pathological Relevance. *The American Phytopathological Society*, Vol. 100, No. 9.

Siewert, C.; Luge, T.; Duduk B, Seemüller, E.; Büttner, C. et al. (2014). Analysis of Expressed Genes of the Bacterium '*Candidatus Phytoplasma Mali*' Highlights Key Features of Virulence and Metabolism. PLoS ONE 9(4): e94391.

Silva, E.G.; Bedendo, I.P.; Massola Júnior, N. S.; Silva, R. F. *Candidatus Phytoplasma brasiliense* associado ao superbrotamento do hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) no Estado de São Paulo. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 35, n. 3, p. 234-236.

Smart, C.D.; Schneider, B.; Blomquist, C.L.; Guerra, L. J.; Harrison, N. A.; Ahrens, U.; Lorenz, K.-H.; Seemüller, E.; Kirkpatrick, B. C. (1996). Phytoplasma-Specific PCR Primers Based on Sequences of the 16S-23S rRNA Spacer Region. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 2988–2993.

Youssef, S.A.; Sayed Y.; Hassan, O.S.; Safwat, G.; Shalaby, A. A. (2017). Universal and Specific 16S-23Sr RNA PCR Primers for Identification of Phytoplasma associated with sesame in Egypt. *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 4(7): 191-200.

## II.10 *Clavibacter michiganensis*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Actinobacteria  
Classe: Actinobacteria  
Ordem: Actinomycetales  
Família: Microbacteriaceae  
Gênero: *Clavibacter*  
Espécie: *Clavibacter michiganensis*

### Motivo da inclusão na lista:

A espécie *Clavibacter michiganensis* é responsável pela doença do cancro em vegetais, principalmente em tomateiros, causando lesões com crosta ou corrosão em frutos, murcha e amarelamento e áreas necróticas em folhas e o cancro em caule lenhoso, tendo como desfecho a morte da planta inteira (Hadas et al., 2005). São descritos também casos em pimentão e erva-moura. Em caso de morte da planta pode ocorrer infecção primária para plantas próximas por respingos de água, movimento de máquinas ou por pessoas que trabalham quando o campo está úmido, resultando em necrose marginal de folhas e manchas de frutos (Gartemann et al., 2003). Apresenta relatos de ocorrência mundial. Theodoro e Maringoni (2000) relatam que no Brasil, a infecção foi registrada pela primeira vez em 1957, ocorrendo em São Paulo e hoje se encontra disseminada em todo território nacional, chegando a causar até 30 a 50% de perdas na produção de lavouras da região Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Não foram encontrados relatos da bactéria causando danos em plantas nativas brasileiras. Todavia, destaca-se a que, além de sua reconhecida ação fitopatogênica em cultivares, devido ao seu alto potencial de invasibilidade, microrganismos desta espécie são descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Outro dado relevante é o fato do fitopatógeno prevalecer na família das Solanáceas, a qual, no Brasil, é amplamente representada, ocorrendo 34 gêneros e 449 espécies, sendo 215 destas exclusivas do país (Stehmann et al., 2015). E, com isso, os representantes nativos tornam-se possíveis hospedeiros, considerando características comuns à família. Por isso, conhecida a gravidade da doença causada pela espécie *Clavibacter michiganensis*, podendo levar os vegetais à morte com a subsequente infecção primária em vegetais próximos, acrescida de sua conhecida capacidade de invasibilidade, recomenda-se a sua não utilização sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

*Clavibacter michiganensis* foi subdividida em cinco subespécies com base na especificidade de hospedeiro e outras características e é possível obter identificações de cada subespécie com a utilização de *primers* específicos (Eichenlaub e Gartemann, 2011). Diversos genes são utilizados como alvo para a elaboração desses *primers*, dentre os quais o RNA ribossômico, sequências repetitivas, genes de virulência conhecidos e diversos genes *housekeeping*, *comoatpD* (cadeia de ATP sintase), *dnaK* (proteína de choque), *gyrB* (subunidade β da DNA girasse), *ppk* (polifosfato quinase), *recA* (recombinase A) e *rpoB* (subunidade da RNA polimerase) (Kaneshiro et al., 2006; Jacques et al., 2012; Ahmad et al., 2015). Entretanto, como a restrição se refere à espécie como um todo, independente da subespécie, não há a necessidade de identificação nesse nível, é preciso apenas garantir que quando houver a solicitação de registro de qualquer outra espécie do gênero *Clavibacter* ela não se trate realmente de qualquer subespécie de *C. michiganensis*. Assim, é necessário que seja realizada uma identificação precisa do isolado em nível de espécie. Não foram encontrados trabalhos com a utilização de *primers* únicos, por meio de PCR convencional, que permitam a amplificação de todas as subespécies de *C. michiganensis* e, ao mesmo tempo, não resultem na obtenção de falsos positivos com outras espécies do gênero. Dessa maneira, sugere-se utilização da metodologia descrita no trabalho de Thapa e colaboradores (2020) e que se baseia na realização de um ensaio de PCR multiplex com a utilização dos *primers* 16sR-F/R, RhuM-F/R e TomA-

F1/R1 desenhados, respectivamente, a partir de regiões conservadas na espécie presentes nos genes que codificam o rRNA 16S além de *RhuM* (proteína de virulência) e *TomA* (hidrolase). O ensaio foi validado e demonstrou alta especificidade e sensibilidade. A descrição dos *primers* se encontra na tabela abaixo:

Gene	Seqüências dos <i>primers</i> (forward/reverse)
rDNA 16S	16sR-F: 5' - TTGCGGGACTTAACCCAAC -3' 16sR-R: 5' - AGCGGTGAAATGCGCAGA - 3'
<i>RhuM</i>	RhuM-F: 5' - GGGTCGGTTCATCCTGTA - 3' RhuM-R: 5' - CTTCGGGAGGTTCTCCTGT -3'
<i>TomA</i>	TomA-F1: 5' - ATGAAGAGCTTCGCGTCCG - 3' TomA-F2: 5' -GAGAACACTGACATCCGCAG - 3'

## Referências Bibliográficas

- Ahmad, A.; Mbofung, G.Y.; Acharya, J.; Schmidt, C.L.; Robertson, A.E. (2015). Characterization and Comparison of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* Strains Recovered from Epiphytic and Symptomatic Infections of Maize in Iowa. *PLoS ONE*, 10(11): e0143553.
- Dreier, J.; Bermpohl, A.; Eichenlaub, R. (1995). Southern Hybridization and PCR for Specific Detection of Phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Genetics*, Vol. 85, No.4.
- Eichenlaub, R. e Gartemann, K-H. (2011). The *Clavibacter michiganensis* subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 49:445–64.
- Gartemann, K-H.; Kirchner, O.; Engemann, J.; Gäfen, I.; Eichenlaub, R.; Burguer, A. (2003). *Journal of Biotechnology*, 106, 179–191.
- Hadas, R.; Kritzman, G.; Klietman, F.; Gefen, T.; Manulis, S. (2005). Comparison of extraction procedures and determination of the detection threshold for *Clavibacter michiganensis* ssp. *michiganensis* in tomato seeds. *Plant Pathology*, 54, 643–649.
- Jacques, M.-A.; Durand, K.; Orgeur, G.; Balidas, S.; Fricot, C.; Bonneau, S.; Quillévéré, A.; Audusseau, C.; Olivier, V.; Grimault, V.; Mathis, R. (2012). Phylogenetic Analysis and Polyphasic Characterization of *Clavibacter michiganensis* Strains Isolated from Tomato Seeds Reveal that Nonpathogenic Strains Are Distinct from *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 8388.
- Kaneshiro1, W.S.; Mizumoto, C.Y.; Alvarez, A.M. (2006). Differentiation of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* from seed-borne saprophytes using ELISA, Biolog and 16S rDNA sequencing. *European Journal of Plant Pathology*, 116:45–56.
- Stehmann, J.R.; Mentz, L.A.; Agra, M.F.; Vignoli-Silva, M.; Giacomin, L.; Rodrigues, I.M.C. (2015). Solanaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB225>>. Acesso em 15 de janeiro de 2021.
- Thapa, S. P., O’Leary, M., Jacques, M. A., Gilbertson, R. L., & Coaker, G. (2020). Comparative genomics to develop a specific multiplex PCR assay for detection of *Clavibacter michiganensis*. *Phytopathology*, 110(3), 556-566.

Theodoro, G.F.; Maringoni, A.C. (2000). Ação de Produtos Químicos *In Vitro* e *In Vivo* sobre *Clavibacter Michiganensis* subsp. *michiganensis*, Agente Causal do Cancro Bacteriano do Tomateiro. *Scientia Agricola*, v.57, n.3, p.439-443.

## II.11 *Coxiella burnetii*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Betaproteobacteria  
Ordem: Legionellales  
Família: Coxiellaceae  
Gênero: *Coxiella*  
Espécie: *Coxiella burnetii*

### Motivo da inclusão na lista:

*Coxiella burnetii* é uma bactéria intracelular obrigatória que causa uma zoonose de ampla distribuição mundial conhecida como febre Q, sendo a Nova Zelândia o único país onde não há relatos de sua ocorrência (Kazar, 2005). *C. burnetii* é um parasita muito resistente ao calor, pressão e estresses químicos e por isso consegue sobreviver por meses no ambiente fora do hospedeiro e se espalhar (Kazar, 2005). *C. burnetii* é altamente infecciosa e tem a capacidade de induzir infecções persistentes em humanos e uma ampla gama de animais. No caso dos humanos, a febre Q geralmente é assintomática ou causa apenas sintomas leves, sendo a principal forma de contaminação a inalação de aerossóis compostos por partículas contaminadas, um risco principalmente para pessoas que trabalham com animais infectados (Kazar, 2005; Damasceno & Guerra, 2018). Quanto aos animais, ela afeta principalmente bovinos, ovelhas e cabras, mas também camelos, cães, ratos, porcos, cavalos, coelhos, camundongos, macacos, coiotes, artrópodes, aves, marsupiais e até répteis e peixes, causando, em geral, lesões graves principalmente no fígado e baço (Glazunova et al., 2005; CABI, 2020). Devido à sua relevância, as doenças associadas a esse patógeno estão na lista de doenças notificáveis à Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), que inclui doenças transmissíveis consideradas de importância socioeconômica ou de saúde pública (CABI, 2020). Dessa maneira, apesar de haver poucos relatos de sua ocorrência no Brasil (Damasceno & Guerra, 2018), devido à ampla distribuição e gama de hospedeiros listados para essa bactéria, sua utilização seria muito arriscada, com possibilidade de impactos econômicos e à saúde pública, bem como oferecendo perigo para várias espécies de animais nativos.

### Método de identificação:

Vários ensaios de PCR estão disponíveis para identificação de *C. burnetii*, estes incluem trans-PCR, empregando primers baseados em regiões repetitivas do tipo transposon do genoma de *C. burnetii*, além de ensaios PCRs touchdown e multiplex (CABI, 2020). Como a restrição de uso é somente para essa espécie do gênero *Coxiella* é preciso garantir, sempre que houver pedidos de registro de isolados que pertençam a esse gênero, que os mesmos não se tratem de *C. burnetii* e para tal utilizar uma metodologia que permita a identificação da espécie de forma sensível e específica. Dentre os trabalhos disponíveis não se encontrou a possibilidade de identificação do isolado em nível de espécie utilizando o gene que codifica o rRNA 16S. Dessa maneira, sugere-se a utilização dos primers descritos no trabalho de Willems e colaboradores (1994), os quais amplificam um fragmento de 687 bp do elemento repetitivo *IS1111* de um gene de proteína de choque térmico (*htpAB transposase*), por ser uma abordagem que apresenta alta eficiência, além de ser comumente utilizada na maioria dos trabalhos, tais como Rozental e colaboradores, (2012) e Mares-Guia e colaboradores, (2014). Os primers utilizados nessa abordagem são Trans1/QBT-1 e Trans2/QBT-2 e se encontram descritos na tabela abaixo.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
Trans1/QBT-1	5'- TATGTATCCACCGTAGCCAGTC - 3'
Trans2/QBT-2	5'- CCCAACAAACACCTCCTTATTTC -3'

### **Referências Bibliográficas:**

CABI Dataset: Q fever. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/66416>. Acesso em: 30 de dezembro de 2020.

Damasceno, I. A. D. M., & Guerra, R. C. (2018). *Coxiella burnetii* e a febre Q no Brasil, uma questão de saúde pública. *Ciência & Saúde Coletiva*, 23, 4231-4239.

Glazunova, O., Roux, V., Freylikman, O., Sekeyova, Z., Fournous, G., Tyczka, J., ... & Raoult, D. (2005). *Coxiella burnetii* genotyping. *Emerging infectious diseases*, 11(8), 1211.

Kazar, J. (2005). *Coxiella burnetii* infection. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1063(1), 105-114.

Mares-Guia, M. A. M. D. M., Rozental, T., Guterres, A., Gomes, R., Almeida, D. N. D., Moreira, N. S., ... & Lemos, E. R. S. D. (2014). Molecular identification of the agent of Q fever—*Coxiella burnetii*—in domestic animals in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(2), 231-234.

Rozental, T., Mascarenhas, L. F., Rozenbaum, R., Gomes, R., Mattos, G. S., Magno, C. C., ... & Lemos, E. R. S. D. (2012). *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever in Brazil: its hidden role in seronegative arthritis and the importance of molecular diagnosis based on the repetitive element IS1111 associated with the transposase gene. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(5), 695-697.

Willems, H., Thiele, D., Frölich-Ritter, R., & Krauss, H. (1994). Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 41(1-10), 580-587.

## **II.12 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv.*flaccumfaciens***

### **Classificação taxonômica:**

Domínio: Bacteria  
Filo: Actinobacteria  
Classe: Actinobacteria  
Ordem: Micrococcales  
Família: Microbacteriaceae  
Gênero: *Curtobacterium*  
Espécie: *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*

### **Motivo da inclusão na lista:**

A espécie *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* infecta principalmente representantes da família vegetal Fabaceae, mas são descritas infecções em espécies das famílias Amaranthaceae e Asteraceae (Nascimento et al., 2020). Ainda são descritas por Osdaghi e colaboradores (2018) infecções em milho, abobrinha, melão, colza, beterraba, sacarina e girassol. Esta bactéria causa a síndrome de murcha na planta, incluindo uma série de áreas cloróticas e necróticas intervinais nas folhas circundadas por um halo amarelo, acompanhadas por murcha geral da planta, levando à morte (Harveson et al., 2015). Sua distribuição ocorre nas Américas do Norte e do Sul, Europa, África, Austrália e Ásia Ocidental (EPPO, 2011). No Brasil, são descritos casos em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e São Paulo (CABI, 2020). Apesar de não ter sido evidenciado relato deste fitopatógeno em representantes diretos da flora nativa brasileira, a bactéria é descrita como patógeno numa extensa lista de plantas leguminosas (família Fabaceae). Isto demonstra um alto risco para as espécies nativas, uma vez que tanto os representantes arbustivos como herbáceos da família são integrantes de diversos nichos para eucariontes (cadeia alimentar, abrigo), assim como para procariões (em associação com estas plantas participam da ciclagem e fixação de nitrogênio). Desta forma, além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu alto potencial de invasibilidade, microrganismos desta espécie são descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. A invasão pode ocorrer não apenas pela introdução voluntária, como também através da dispersão de grãos (Nascimento et al., 2020). Dada a gravidade da doença causada pela espécie *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* podendo levar os vegetais à necrose/morte, sua potencial causa de desequilíbrio para diferentes nichos e a sua conhecida capacidade de invasibilidade, recomenda-se a sua não utilização sob quaisquer condições.

### **Método de identificação:**

Pelo fato da restrição de uso ser apenas para a espécie *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*, sempre que houver pedidos de registros de isolados que pertençam ao gênero *Curtobacterium*, é preciso garantir que não se tratem da espécie em questão, sendo necessário para tal a realização de um ensaio molecular que permita sua identificação precisa. Dentre os trabalhos levantados sugere-se utilizar a metodologia descrita no trabalho de Tegli e colaboradores (2002), que propuseram o uso do par de *primers* ERIC (Enterobacterial Repetitive Intragenic Consensus) designados como Cff FOR2 e Cff REV4, que permitem a amplificação de um fragmento específico de 306 pb. A indicação de uso dessa metodologia decorre de o fato dos pesquisadores terem obtido um resultado com alta sensibilidade para a identificação molecular da espécie, ser comumente utilizada em uma série de trabalhos levantados e não terem sido encontrados trabalhos que propusessem a utilização do gene que codifica o rRNA 16S com resultados precisos e específicos (Osdaghi et al., 2015; Osdaghi et al., 2017; Soares et al., 2018; Gonçalves et al., 2018; Nascimento et al., 2020). Os *primers* mencionados se encontram descritos na tabela abaixo:

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
Cff FOR2	5'- GTTATGACTGAACTTCACTCC -3'
Cff REV4	5'- GATGTTCCCGGTGTCAG -3'

### **Referências bibliográficas**

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). (2011). *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin, 320–328.

Gonçalves, R.M.; Balbi-Peña, M.I.; Soman, J.M.; Maringoni, A.C.; Taghouti, G.; Fischer-Le Saux, M.; Portier, P. (2018). Genetic diversity of *Curtobacterium flaccumfaciens* revealed by multilocus sequence analysis. *Eur J Plant Pathol.*, <https://doi.org/10.1007/s10658-018-01648-0>.

Harveson, R.M.; Schwartz, H.F.; Urrea, C.A.; Yonts, C.D. (2015). Bacterial Wilt of Dry-Edible Beans in the Central High Plains of the U.S.: Past, Present, and Future. *Plant Disease*, p.1665-1677.

Nascimento, D.M.; oliveira, L.R.; Melo, L.L.; Silva, J.C.; Soman, J.M.; Girotto, K.T.; Eburneo, R.P.; Ribeiro-Junior, M.R.; Sartori, M.M.P.; Silva Júnior, A.F.; Maringoni, A.C. (2020). Survival of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in weeds. *Plant Pathology*. doi:10.1111/ppa.13206.

Osdaghi, E.; Taghavi, S.M.; Fazliarab, A.; Elahifard, E.; Lamichhane, J.R. (2015). Characterization, geographic distribution and host range of *Curtobacterium flaccumfaciens*: An emerging bacterial pathogen in Iran. *Crop Protection*, 78, 185-192.

Osdaghi, E., Taghavi, S. M., Hamzehzarghani, H., Fazliarab, A., Harveson, R. M., Tegli, S., & Lamichhane, J. R. (2017). Epiphytic *Curtobacterium flaccumfaciens* strains isolated from symptomless solanaceous vegetables are pathogenic on leguminous but not on solanaceous plants. *Plant Pathology*, 67(2), 388–398.

Soares, R.M.; Fantinato, G.G.P.; Ferreira, E.G.C.; Marcelino-Guimarães, F.C. (2018). Plant-to-seed transmission of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* on soybean. *Tropical Plant Pathology*. <https://doi.org/10.1007/s40858-018-0227-z>

Tegli, S.; Sereni, A.; Surico, G. (2002). PCR-based assay for the detection of *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens* in bean seeds. *Letters in Applied Microbiology*, 35, 331–337.

## II.13 *Dermatophilus congolensis*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Actinobacterias  
Classe: Actinobacterias  
Ordem: Actinomycetales  
Família: Dermatophilaceae  
Gênero: *Dermatophilus*  
Espécie: *Dermatophilus congolensis*

### Motivo da inclusão na lista:

*Dermatophilus congolensis* é um microrganismo caracterizado pela presença de filamentos ramificados transversal e longitudinalmente septados, responsável por causar a dermatofilose, que é uma dermatite pustulosa exsudativa aguda, subaguda ou crônica, formadora de crosta e transmitida por carrapatos da espécie *Amblyomma variegatum* e afeta uma ampla gama de animais (Zaria, 1993; CABI, 2021). Gado, ovelhas, cavalos e cabras são os hospedeiros mais comuns, mas porcos, cães, gatos, búfalos, burros, camelos, dromedários, mamíferos selvagens e humanos também podem ser infectados (Awade et al., 2008). É uma bactéria estritamente parasitária da pele, mas persiste em crostas secas e pode sobreviver por mais de 42 meses no ambiente. A doença está amplamente distribuída mundialmente, mas é mais prevalente em regiões úmidas, tropicais e subtropicais, sendo os principais registros em países africanos e, em certa medida, na Europa, Ásia, Austrália e nos continentes americanos (Zaria, 1993; Awade et al., 2008). No Brasil há registros de ocorrência da dermatofilose em vários estados como São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso do Sul e outros (Júnior et al., 2006; Olinda et al., 2009; Bacha et al., 2014). Apesar de *D. congolensis* em si não ser altamente patogênica e depender de uma combinação de fatores para o desenvolvimento de lesões clínicas, a dermatofilose tem causado grandes perdas econômicas em países africanos e algumas ilhas do Caribe devido à qualidade inferior de lã e couro, morte e abate de animais, diminuição da produção de leite e da qualidade de sêmen (Awade et al., 2008; CABI, 2021). Além de sua importância econômica a doença desempenha um papel na saúde pública por sua transmissão em humanos, causando lesões nas pessoas que manuseiam animais infectados e dores estomacais quando ocorre o consumo de carne contaminada (Awade et al., 2008; Ndhlovu & Masika, 2016). Por esses motivos, além do fato de *D. congolensis* ser considerada uma bactéria invasiva e afetar uma ampla gama de hospedeiros, o que representa um risco aos animais nativos brasileiros, é muito importante garantir a restrição de seu uso no país.

### Método de identificação:

Como a restrição de utilização se aplica apenas a *D. congolensis*, sempre que houver o pedido de registro de qualquer microrganismo que pertença ao gênero *Dermatophilus*, é preciso garantir que não se trate apenas dessa espécie. Para a identificação molecular precisa de *D. congolensis* foram encontrados mais de um trabalho com abordagens e utilização de primers diferentes, os quais foram desenhados a partir de genes diversos. Dentre todos, sugere-se a utilização da abordagem descrita no trabalho de García-Sánchez e colaboradores (2003), que realizaram uma reação de amplificação aleatória de DNA polimórfico (RAPD) para inicialmente identificar um fragmento de DNA de 0,6 kb específico da espécie (gene de uma ceramidase alcalina). Esse fragmento foi utilizado para projetar primers a serem utilizados em reações de PCR convencional visando amplificar um fragmento de 438 pb de *D. congolensis*: ESP1 ESP2. A reação demonstrou sensibilidade, amplificando todos os DNA de isolados de *D. congolensis* testados e especificidade, uma vez que não houve amplificação de outras espécies. A descrição dos primers está disponível na tabela abaixo:

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
ESP1	5'- CTTCAGCAGAAAATTCAACCA -3'
ESP2	5'-CGTACATTCCCGGAATCTTC -3'

### **Referências Bibliográficas:**

- Amor, A., Enríquez, A., Corcuera, M. T., Toro, C., Herrero, D., & Baquero, M. (2011). Is infection by *Dermatophilus congolensis* underdiagnosed?. *Journal of clinical microbiology*, 49(1), 449-451.
- Awad, W. S., Nadra-Elwgoud, M. I., & El-Sayed, A. A. (2008). Diagnosis and treatment of bovine, ovine and equine dermatophilosis. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(4), 367-374.
- Bacha, F. B., Faccin, T. C., Lima, S. C., Leal, C. R. B., & Lemos, R. A. A. (2014). Dermatofilose em bezerros da raça Nelore no Mato Grosso do Sul. *Semina: Ciências Agrárias*, 35(4), 1947-1954.
- CABI (2021). Dermatophilosis. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/85716>. Acesso em: 09 de janeiro de 2021.
- García-Sánchez, A., Cerrato, R., Larrasa, J., Ambrose, N. C., Parra, A., Alonso, J. M., ... & Hermoso-de-Mendoza, J. (2004). Identification of an alkaline ceramidase gene from *Dermatophilus congolensis*. *Veterinary microbiology*, 99(1), 67-74.
- Junior<sup>1</sup>, E. B., Dagli, M. L. Z., Benites, N. R., Gomes, V., Kimura, K. C., Melville, P. A., ... & Raimondo<sup>1</sup>, R. F. S. (2006). Ocorrência da dermatofilose (*Dermatophilus congolensis*) em suínos criados no Estado de São Paulo, Brasil. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 73(3), 361-364.
- Ndhlovu, D. N., & Masika, P. J. (2016). Bovine dermatophilosis: Awareness, perceptions and attitudes in the small-holder sector of north-west Zimbabwe. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 83(1), 1-7.
- Olinda, R. G., Câmara, A. C. L., & Feijó, F. M. C. (2009). Primeiro relato de dermatofilose generalizada em equino no Rio Grande do Norte. *Acta Veterinaria Brasilica*, 3(4), 187-192.
- Zaria, L. T. (1993). *Dermatophilus congolensis* infection (dermatophilosis) in animals and man! An update. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 16(3), 179-222.

## II.14 *Dickeya* spp.

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Gammaproteobacteria  
Ordem: Enterobacteriales  
Família: Pectobacteriaceae  
Gênero: *Dickeya*

### Motivo da inclusão na lista:

*Dickeya* spp. é considerado um gênero fitopatogênico em regiões tropicais e subtropicais (Janse e Ruijsen 1988). São bactérias com ação pectinolítica, pois produzem enzimas degradadoras de pectina ou ácido pectíco (Van Der Wolf et al., 2014). No Brasil são descritos casos de infecções em diversos cultivares (batata, abacaxi, alface, couve-chinesa, cebola, cenoura, pimentão, repolho e tomate (Gama et al., 2016). Porém, devido à sua ação degradadora em pectina, um polissacarídeo estrutural encontrado na parede celular primária das células vegetais e nas camadas intercelulares (Paiva et al., 2009), as bactérias deste gênero exercem risco de potencial dano a espécies silvestres. Os sintomas causados incluem a murcha, podridão mole, talo-oco e tombamento de plântulas. Relatos de casos ocorrem praticamente em todo mundo, infectando uma variada gama de hospedeiros de diversas famílias botânicas (Mariano et al., 2005), demonstrando que a importância desse patógeno deve ser considerada relevante. Uma espécie de destaque do gênero é a *D. solani*, que causa a canela-preta e a murcha da planta em espécies vegetais das famílias das Cyperaceae (ervas), Liliaceae (flores) e Solanaceae (batata). Os sintomas incluem a podridão mole que se desloca do tubérculo infectado através do sistema vascular da planta, sendo que em algumas variedades, a murcha pode ocorrer sem qualquer canela preta aparente (Tsror et al., 2012). Essarts e colaboradores (2019) enfatizaram que *D. solani* tem uma maior capacidade de colonizar rapidamente os vasos do xilema da planta do que outros representantes do gênero *Dickeya*, o que poderia auxiliar no entendimento da alta incidência da espécie em relação às demais. A distribuição da espécie ocorre na Ásia, Europa e América do Sul. Além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu potencial de propagação, microrganismos desta espécie são descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Dada a gravidade da doença causada pelo gênero como um todo, acrescida de sua conhecida capacidade de invasibilidade e a ampla gama de hospedeiros de diferentes famílias que é capaz de afetar, recomenda-se a não utilização de *Dickeya* sp. sob quaisquer condições, pois pode representar um risco às espécies nativas brasileiras.

### Método de identificação:

Em 2005, Samson e colaboradores propuseram a substituição do complexo “*Erwinia chrysanthemi*” pelo gênero *Dickeya*, englobando seis espécies. Em 2014, Van Der Wolf e colaboradores propuseram uma nova espécie *D. solani*, totalizando então, sete espécies integrantes do gênero, entretanto por ser um gênero recente muitos estudos filogenéticos continuam sendo realizados para confirmar sua posição filogenética e possíveis novas variantes. Como a restrição de uso se estende a todas as espécies do gênero, quando houver pedido de registro de microrganismos da família Pectobacteriaceae, é necessário assegurar que não se trate de isolados do gênero *Dickeya*. Para a identificação molecular precisa das espécies do gênero, os trabalhos têm sugerido a utilização de sequências dos genes *recA*, *dnaX*, *rpoD*, *gyrB* e do *rDNA 16S* individualmente e em conjunto (Suharjo et al., 2014). Nesse caso, como não há a necessidade de identificação em nível de espécie, mas sim dos isolados do gênero como um todo sugere-se, em um primeiro momento, a utilização de *primers* universais para a amplificação de regiões variáveis do gene que codifica o *rRNA 16S*, porque alguns trabalhos relatam a possibilidade de identificação em nível de gênero apenas com sua utilização. Entretanto, também há relatos de identificação conflituosa com outros

gêneros próximos utilizando-se apenas essa região e, nesse caso, é necessário a utilização de genes ou regiões adicionais para melhorar essa resolução. Dentre eles sugere-se a utilização do *dnaX* (DNA polimerase III) ou da região espaçadora intergênica 16S - 23S, por terem apresentado boa resolução quando usados em combinação com o gene rDNA 16S (Sławiak et al., 2009; Suharjo et al., 2014). As sequências de *primers* sugeridos para cada uma dessas regiões se encontram descritas na tabela abaixo:

Gene	Sequências dos <i>primers</i> (forward/reverse)	Referência
rDNA 16S	F985PTO: 5' - AACCGGAAGAACCTTAC - 3' R1378: 5' - CGGTGTGTACAAGGCCGGAACG -3'	Heuer et al. 1999.
<i>dnaX</i>	<i>dnaXf</i> : 5' - TATCAGGYCTTGCCTAAGTGG - 3' <i>dnaXr</i> : 5' - TCGACATCCARCGCYTTGAGATG - 3'	Sławiak et al., 2009
região espaçadora intergênica 16S - 23S	1491fb: 5' - GAAGTCGTAACAAGGTA - 3' L1rc: 5' - CA(A/G)GGCATCCACCGT - 3'	Fessehaie et al. 2002

## Referências Bibliográficas

Czajkowski, R.; Grabe, G.J.; Van der Wolf. (2009). Distribution of *Dickeya* spp. and *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in naturally infected seed potatoes. *Jan M. Eur. J. Plant Pathol.*, 125:263–275.

Essarts, Y.R.; Pétron, J.; Blin, P.; Dijk, E.V.; Faure, D.; Gijsegem, F.V. (2019). Common and distinctive adaptive traits expressed in *Dickeya dianthicola* and *Dickeya solani* pathogens when exploiting potato plant host. *Environmental Microbiology*, 21(3), 1004–1018.

Fessehaie, A., De Boer, S. H., & Lévesque, C. A. (2002). Molecular characterization of DNA encoding 16S 23S rRNA intergenic spacer regions and 16S rRNA of pectolytic *Erwinia* species. *Canadian journal of microbiology*, 48(5), 387-398.

Gama, M.A.S.; Nicoli, A.; Guimarães, L.M.P.; Lopes, U.P.; Michereff, S.J. (2016). Estado da arte em fitobacterioses tropicais (State of the art in tropical Phytobacteriosis). Recife: EDUFRPE, 2016. 308 p. : il., ISBN 978-85-7946-259-7.

Heuer, H., Hartung, K., Wieland, G., Kramer, I., & Smalla, K. (1999). Polynucleotide probes that target a hypervariable region of 16S rRNA genes to identify bacterial isolates corresponding to bands of community fingerprints. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), 1045-1049.

Janse, J.D. e Ruissen, M.A. (1988). Characterization and Classification of *Erwinia chrysanthemi* Strains from Several Hosts in the Netherlands. *Physiology and Biochemistry*, Vol. 78, No.6.

Mariano, R.L.R.; Silveira, E.B.; Alvarado, I.D.C.M.; Silva, A.M.F. (2005). Bactérias Fitopatogênicas Pectinolíticas dos Gêneros *Pectobacterium* e *Dickeya*. *Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agronômica, Recife*, vol. 2,p.121-153.

Paiva, E.P.; Lima, M.S.; Paixão, J.A. (2009). Pectina: propriedades químicas e importância sobre a estrutura da parede celular de frutos durante o processo de maturação. *Revista Iberoamericana de Polímero*, Volumen 10(4), 196-211.

Samson, R.; Legendre, J.B.; Christen, R.; Saux, M.F-Le; Achouak, W.; Gardan, L. (2005). Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55, 1415–1427.

Sławiak, M., van Beckhoven, J. R., Speksnijder, A. G., Czajkowski, R., Grabe, G., & van der Wolf, J. M. (2009). Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. *European Journal of Plant Pathology*, 125(2), 245-261.

Suharjo, R.; Sawada, H.; Takikawa, Y. (2014). Phylogenetic study of Japanese *Dickeya* spp. and development of new rapid identification methods using PCR-RFLP. *J Gen Plant Pathol.*, 80:237–254.

Tsror, L.; Erlich, O.; Hazanovsky, M.; Daniel, B.B.; Zig, U.; Lebiush, S. (2012). Detection of *Dickeya* spp. latent infection in potato seed tubers using PCR or ELISA and correlation with disease incidence in commercial field crops under hot-climate conditions. *Plant Pathology*, 61, 161–168.

Van der Wolf, J.M.; Saddler, G.S.; Nijhuis, E.; Parkinson, N. et al... (2014). *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 768–774.

## II.15 *Edwardsiella* sp.

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Gammaproteobacteria  
Ordem: Enterobacteriales  
Família: Hafniaceae  
Gênero: *Edwardsiella*

### Motivo da inclusão na lista:

O gênero *Edwardsiella* foi identificado e descrito a primeira vez por Erwing e colaboradores em 1965 e é composto por cinco espécies: *E. anguillarum*, *E. piscicida*, *E. tarda*, *E. hoshinae* e *E. ictaluri*. Quase todas são patógenas de animais sendo que *E. ictaluri* e *E. tarda* comprovadamente causam septicemia e necrose no tecido dos peixes, fazendo com que os animais comprometidos apresentem lesões hemorrágicas externas e internas e lesões necróticas externas (Lima et al., 2008; CABI, 2020). As doenças ocorrem mundialmente em peixes de águas doce e marinha, sendo algumas das espécies mais acometidas o dourado (*Salminus* sp.), a carpa comum (*Cyprinus carpio*), a tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*), o bagre (*Ictalurus punctatus*) e a truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) quando mantidos em cultivo intensivo (Xu & Zhan, 2014, CABI, 2020). A enfermidade pode ser transmitida ao homem pela ingestão de carne de peixes contaminados, causando infecções entéricas, meningites, abscessos hepáticos e infecções de feridas que ocorrem também pelo manuseio de material contaminado (Xu & Zhan, 2014). Em janeiro de 2005 um surto da espécie *Edwardsiella tarda* que se estendeu pelo ano de 2006 causou uma mortalidade significativa de várias espécies tropicais no rio São Francisco, como o Pacu (*Myleus micans*) (Lima et al., 2008). Também foram observados sinais clínicos e feito o isolamento de bactérias do gênero em criações de tilápias no Rio Grande do Sul, tilápias e pintados no Mato Grosso do Sul e bagre americano em Santa Catarina (Albinati et al., 2006). Assim, além ser uma preocupação econômica por afetar espécies de grande valor econômico, bactérias desse gênero também representam um risco à biodiversidade brasileira, por causar mortalidade em diversas espécies nativas como o dourado, o pacu e o pintado e, consequentemente, desequilíbrios no ecossistema aquático.

### Método de identificação:

Como a restrição de uso se estende a todas as espécies do gênero *Edwardsiella*, não há a necessidade de identificação em nível de espécie, sendo necessário apenas garantir que quando ocorra pedido de registro de microrganismos da família Hafniaceae, ele não se trate de um isolado desse gênero. Apesar de ser um gênero que ainda é alvo de estudos filogenéticos visando uma melhor determinação e classificação de suas espécies, de acordo com os trabalhos levantados, para a identificação molecular precisa dos microrganismos do gênero *Edwardsiella* nesse nível, apenas a amplificação de fragmentos do gene que codifica o rRNA 16S costuma fornecer resolução suficiente. Somente para a identificação em nível de espécie seria necessária a utilização de outros genes *housekeeping*, tais como *adk* (adenilato quinase), *atpD* (subunidade β da ATPase), *dnaJ* (proteína de choque térmico 40), *glnA* (glutamina sintetase), *hsp60* (proteína de choque térmico de 60-KDs) e *tuf* (fator de alongamento Tu) (Buján et al., 2018a). Dessa maneira, sugere-se utilizar para a identificação desses microrganismos, reação de PCR convencional com a utilização dos *primers* universais pA e pH, os quais permitem a amplificação do gene *rDNA 16S* (Buján et al., 2018a). Os referidos *primers* se encontram descritos na tabela abaixo.

<b>Primers</b>	<b>Sequência</b>
pA	5' - AGAGTTGATCCTGGCTCAG -3'
pH	5' - AAGGAGGTGATCCAGCCGCA - 3'

### **Referências Bibliográficas:**

Albinati, A. C. L., Albinati, R. C. B., de Deus Oliveira, E. M., da Silva Laborda, S., & Vidal, L. V. O. (2006). Edwardsielose em Tilápias do Nilo ("*Oreochromis niloticus*"). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 7(2).

Buján, N., Mohammed, H., Balboa, S., Romalde, J. L., Toranzo, A. E., Arias, C. R., & Magariños, B. (2018). Genetic studies to re-affiliate *Edwardsiella tarda* fish isolates to *Edwardsiella piscicida* and *Edwardsiella anguillarum* species. *Systematic and applied microbiology*, 41(1), 30-37.

Buján, N., Balboa, S., Romalde, J. L., Toranzo, A. E., & Magariños, B. (2018). Population genetic and evolution analysis of controversial genus *Edwardsiella* by multilocus sequence typing. *Molecular phylogenetics and evolution*, 127, 513-521.

CABI Dataset: *Edwardsiella septicaemia* (*Edwardsiella tarda* infection). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/84398>. Acesso em: 29 de dezembro de 2020.

Ewing, W. H., McWhorter, A. C., Escobar, M. R., & Lubin, A. H. (1965). *Edwardsiella*, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 15(1), 33-38.

Lima, L. C., Fernandes, A. A., Costa, A. A. P., Velasco, F. O., Leite, R. C., & Hackett, J. L. (2008). Isolation and characterizaton of *Edwardsiella tarda* from pacu *Myleus micans*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(1), 275-277.

Xu, T., & Zhang, X. H. (2014). *Edwardsiella tarda*: an intriguing problem in aquaculture. *Aquaculture*, 431, 129-135.

## II.16 *Ehrlichia ruminantium*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Alphaproteobacteria  
Ordem: Rickettsiales  
Família: Anaplasmataceae  
Gênero: *Ehrlichia*  
Espécie: *Ehrlichia ruminantium*

### Motivo da inclusão na lista:

*Ehrlichia ruminantium* é o agente causador da doença chamada de água do coração ou cowdriose, que acomete ruminantes selvagens, tais como antílopes, búfalos, murídeos, impalas, e também domésticos em alguns locais ao redor do mundo. Essa bactéria é transmitida pela picada de carrapatos do gênero *Amblyomma*. Os sinais clínicos dessa doença são diversos e a gravidade é variável. Os principais são: temperatura corporal elevada, perda de apetite, respiração pesada, cabeça baixa, marcha rígida, depressão, piscar e movimentos de mastigação exagerados, anorexia, hiperestesia, lacrimação, convulsões, prostração e morte. O período de incubação é em média 18 dias em bovinos e 14 dias em ovinos e caprinos (Allsopp, 2015). Essa doença foi inicialmente diagnosticada na África do Sul no século XIX e a bactéria causadora identificada em 1925. A *Ehrlichia ruminantium* tem sido considerada como uma espécie invasiva, portanto, sua notificação à Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) é obrigatória. Até 2005 sua presença havia sido relatada, na lista da OIE, em vários países africanos, como Benin, Burkina Faso, Burundi, Camerão, Eswatini, Kênia, Madagascar, Malawi, Moçambique, Nigéria, São Tomé e Príncipe, Tanzânia, Togo, Zâmbia, Zimbabwe. Na América do Norte foi também relatada em Guadalupe e São Cristóvão e Neves. Nos demais países, incluindo o Brasil, ainda não houve relatos (CABI/EPPO, 2021). Dessa forma, a vigilância no território brasileiro precisa garantir a segurança de nossos ruminantes silvestres e, principalmente, nativos perante esse patógeno controlando a sua entrada. Isso, certamente, evitará os prejuízos econômicos oriundos de uma possível infecção dos rebanhos, bem como um desequilíbrio ao ambiente dado a característica invasiva dessa bactéria.

### Método de identificação:

Pelo fato de *E. ruminantium* ser uma espécie do gênero *Ehrlichia* é preciso garantir que quando um solicitante tenha a intenção de registrar qualquer outra espécie do gênero, fique garantido que ela não se trata de *E. ruminantium*. Dessa forma, é necessário que seja realizada uma identificação precisa do isolado em nível de espécie. A partir do levantamento da literatura disponível observa-se a utilização de genes específicos para obter essa identificação, tais como *pCS20*, que é um gene extremamente conservado e específico para *E. ruminantium*, *groEL* (chaperona) e *map1* (metionina aminopeptidase), em detrimento de abordagens utilizando apenas o gene que codifica o rRNA 16S (Allsop et al., 1999; Matsumoto et al., 2011). Dessa maneira, para a identificação da espécie, sugere-se a abordagem recomendada pela OIE, baseada no trabalho de Mahan e colaboradores (1992) e que consiste de uma reação de PCR especificamente para o gene *pCS20*. As informações a respeito dos *primers* utilizados se encontram na tabela abaixo. Contudo destaca-se que alguns trabalhos publicados recentemente descrevem que ensaios mais otimizados de qPCR tanto com o gene *pCS20* quanto *groE* são capazes de promover uma identificação mais sensível, específica e reproduzível da espécie, caso isso seja necessário (Sayler et al., 2016; Cangi et al., 2017).

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
ABI28	5' - ACTAGTAGAAATTGCACAATCTAT - 3'
ABI29	5' - TGATAACTGGTGCAGGAAATCCTT - 3'

### **Referências Bibliográficas:**

Allsopp, M. T. E. P., Hattingh, C. M., Vogel, S. W., & Allsopp, B. A. (1999). Evaluation of 16S, map1 and pCS20 probes for detection of *Cowdria* and *Ehrlichia* species. *Epidemiology & Infection*, 122(2), 323-328.

Allsopp, B. A. (2015). Heartwater-*Ehrlichia ruminantium* infection. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 34 (2), 557-568.

CABI Dataset: *Ehrlichia ruminantium*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/87240> Acesso em: 05 de janeiro de 2021.

Cangi, N., Pinarello, V., Bournez, L., Lefrançois, T., Albina, E., Neves, L., & Vachiéry, N. (2017). Efficient high-throughput molecular method to detect *Ehrlichia ruminantium* in ticks. *Parasites & vectors*, 10(1), 566.

Mahan, S. M., Waghela, S. D., McGuire, T. C., Rurangirwa, F. R., Wassink, L. A., & Barbet, A. F. (1992). A cloned DNA probe for *Cowdria ruminantium* hybridizes with eight heartwater strains and detects infected sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(4), 981-986.

Matsumoto, K., Takeuchi, T., Yokoyama, N., Katagiri, Y., Ooshiro, M., Zakimi, S., ... & Inokuma, H. (2011). Detection of the new *Ehrlichia* species closely related to *Ehrlichia ewingii* from *Haemaphysalis longicornis* in Yonaguni Island, Okinawa, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 1106210552-1106210552.

Sayler, K. A., Loftis, A. D., Mahan, S. M., & Barbet, A. F. (2016). Development of a quantitative PCR assay for differentiating the agent of heartwater disease, *Ehrlichia ruminantium*, from the Panola Mountain Ehrlichia. *Transboundary and emerging diseases*, 63(6), e260-e269.

## II.17 *Erwinia amylovora*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Gammaproteobacteria  
Ordem: Enterobacteriales  
Família: Enterobacteriaceae  
Gênero: *Erwinia*  
Espécie: *Erwinia amylovora*

### Motivo da inclusão na lista:

*Erwinia amylovora* é responsável pela doença denominada praga do fogo em plantas da família Rosaceae. O sintoma básico da praga do fogo é a necrose ou morte de tecidos. A partir de flores e brotos infectados, a bactéria pode invadir ramos progressivamente maiores, o tronco, até o porta-enxerto e quando a casca externa é arrancada, os tecidos internos ficam encharcados de água, e, às vezes, racham nas margens, formando um cancro (Piqué et al, 2015; CABI, 2020). Norelli e colaboradores (2003) destacam que devido à diversidade de tecidos hospedeiros suscetíveis à infecção, combinada com o número limitado de ferramentas de gerenciamento disponíveis para controlar a doença, torna-se difícil interromper ou desacelerar o progresso das epidemias por este patógeno. Apresenta relatos de ocorrência mundial. No Brasil, não há relatos da presença do fitopatógeno, mas ele é registrado como um patógeno de alerta pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, uma vez que o risco potencial de introdução da bactéria no país existe devido ao intercâmbio de germoplasma (EMBRAPA, 2007). Além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu alto potencial de invasibilidade, microrganismos desta espécie são descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Apesar de não haver relatos de sua ocorrência no Brasil, devido ao alto risco de introdução e à possibilidade de impactos ambientais e econômicos, oferecendo perigo para várias espécies de vegetais nativos da família Rosaceae, bem sua conhecida capacidade de invasibilidade, recomenda-se a não utilização de *Erwinia amylovora* sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

Pelo fato da bactéria *E. amylovora* ser uma espécie do gênero *Erwinia* é preciso garantir que quando um solicitante tenha a intenção de registrar qualquer outra espécie do gênero, fique garantido que ela não se trata de *E. amylovora*. Dessa forma, é necessário que seja realizada uma identificação precisa do isolado em nível de espécie. De modo geral, observa-se, na maioria dos trabalhos, a busca da utilização diretamente de genes específicos e direcionados para a identificação da espécie, tais como *hrpW* (pectato liase) e proteínas hipotéticas, ao invés da utilização de marcadores mais gerais como o gene que codifica o rRNA 16S, pois a possibilidade da não identificação precisa em nível de espécie com a sua utilização é muito grande (Lehman et al., 2008; Gottsberger, 2010). Sugere-se a, para a identificação da espécie, a utilização da abordagem utilizada no trabalho de Taylor e colaboradores (2001) e que se baseia na amplificação de um fragmento de 187 pb das sequências terminais do inserto pEA71, que é específico para a espécie, utilizando os primers pEa71F e pEa71R, por ser uma metodologia simples, específica e que demonstrou alta especificidade e sensibilidade. Os primers mencionados estão listados na tabela abaixo:

<i>Primers</i>	<i>Sequência</i>
pEa71F	5'-CCTGCATAAATCACCGCTGACAGCTCAATG-3'
pEa71R	5'-GCTACCACTGATCGCTCGAACATCGGC-3'

### **Referências Bibliográficas:**

EMBRAPA. Martins, O.M.; Oliveira, M.R.V. (2007): Documentos: Subsídios Técnicos para a elaboração de Plano de Contingência *Erwinia amylovora*. 214, ISSN 0102-0110.

Gottsberger, R.A. (2010). Development and evaluation of a real-time PCR assay targeting chromosomal DNA of *Erwinia amylovora*. *The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology*, 51, 285–292.

Laforest, M.; Bisaillon, K.; Ciotola, M.; Cadieux, M.; Hébert, P-O.; Toussaint, V.; Svircev, A.M. (2019). Rapid identification of *Erwinia amylovora* and *Pseudomonas syringae* species and characterization of *E. amylovora* streptomycin resistance using quantitative PCR assays *Canadian Journal of Microbiology*. 65(7): 496-509.

Lehman, S.M.; Kim, W-S.; Castle, A.J.; Svircev, A.M. (2008). Duplex Real-Time Polymerase Chain Reaction Reveals Competition between *Erwinia amylovora* and *E. pyrifoliae* on Pear Blossoms. *Bacteriology*, Vol. 98, No. 6, 2008, 673-679.

Norelli, J.L.; Jones, A.L.; Aldwinckle, H.S. (2003). Fire Blight Management in the Twenty-first Century using new Technologies that Enhance Host Resistance in Apple. *Plant Disease*, Vol. 87 No. 7, p. 756-765.

Piqué, N.; Miñana-Galbis, D.; Merino, S.; Tomás, J.M. (2015). Virulence Factors of *Erwinia amylovora*: A Review. *Int. J. Mol. Sci.*, 16, 12836-12854.

R. K. Taylor , P. J. Guilford , R. G. Clark , C. N. Hale & R. L. S. Forster. (2001). Detection of *Erwinia amylovora* in plant material using novel polymerase chain reaction (PCR) primers. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 29:1, 35-43.

## II.18 *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Actinobacteria  
Classe: Actinobacteria  
Ordem: Micrococcales  
Família: Microbacteriaceae  
Gênero: *Leifsonia*  
Espécie: *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*

### Motivo da inclusão na lista:

A espécie *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* é responsável pela doença do raquitismo-da-soqueira da cana-de-açúcar (RSD), apresentando sintomas inespecíficos, os quais podem ser identificados principalmente em períodos de déficit hídrico (Zhang et al., 2016). São observados em alguns cultivares, por meio do corte longitudinal de caules, sintomas como descoloração rosada logo abaixo da área meristemática apical e podem se estender para baixo em até um centímetro (Quecine et al., 2015). Apesar de afetar diretamente apenas a cana-de-açúcar, que levaria a uma perda econômica na agricultura, as culturas fracas e doentes podem abrir caminho para uma infestação de ervas daninhas, deixando as espécies da área ocupada e do entorno sujeitas a uma competição por nutrientes e nicho com as mesmas (CABI, 2019) e, portanto, representar uma fonte de desequilíbrio para a flora nativa local. São relatados casos de ocorrência mundial. No Brasil, Urashima e colaboradores (2020) ressaltam que em pesquisa realizada em 50 usinas de cinco estados do Centro-Sul, a mais importante região canavieira do Brasil, 9% dos canaviais mostraram-se positivos para RSD. Ainda neste estudo, são relatados casos na Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo. Além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu potencial de invasibilidade, microrganismos desta espécie são descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Dada a conhecida presença no país, à possível interferência em nichos de espécies cultivares e nativas, e de sua conhecida capacidade de invasibilidade, recomenda-se a sua não utilização de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

A restrição de uso contempla apenas uma subespécie da espécie *Leifsonia xyli* e por isso a única preocupação ocorre quando houver o interesse e solicitação de se registrar um microrganismo dessa espécie, pois nesse caso é preciso garantir, de forma confiável, que não se trata da subesp. *xyli*. Em geral, por se tratar de uma identificação em um nível taxonômico tão específico, a utilização de genes e *primers* mais gerais, incluindo o gene rDNA 16S não permite uma identificação precisa. Nesse caso e, de acordo com os trabalhos levantados, há a necessidade de utilização de genes mais específicos e vários métodos vêm sendo propostos desde então. Dentre os principais genes e *primers* comumente utilizados para a identificação da subespécie *xyli*, destacam-se regiões variáveis do espaço intergênico (ITS) e, principalmente, genes identificados exclusivamente no genoma desses isolados (Quecine et al., 2015; Urashima et al., 2019; Sun et al., 2019). Considerando os trabalhos levantados, devido à precisão e confiabilidade, sugere-se a utilização da metodologia descrita no trabalho de Zavaglia e colaboradores (2016), com a utilização de *primers* desenhados com base na sequência do gene Lxx12650, o qual é considerado exclusivo da subespécie, uma vez que não há nenhuma outra sequência gênica depositada no GenBank com uma sequência semelhante. Os *primers* utilizados nessa abordagem estão descritos na tabela abaixo.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
FL12650F2	5'-GCGTGGAGAAGTTCATCGTT-3'
FL12650R2	5'-AGCGGCTGAAGGGAGTAGTT-3'

### **Referências Bibliográficas**

- Fegan, M.; Croft, B.J.; Teakle, A.C.; Hayward, A.C., Smith, G.R. (1998). Sensitive and specific detection of *Clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay. *Plant Pathology*, 47, 495-504.
- Ponte, E.C.; Silveira, S.F.; Carneiro Jr., J.B.; Lima, R.M.P. (2010). Incidência de *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* em áreas de multiplicação de cana-de-açúcar no Espírito Santo, sul da Bahia e oeste de Minas Gerais. *Summa Phytopathol.*, Botucatu, v. 36, n. 4, p. 313-321.
- Quecine, M. C.; Silva, T. M.; Carvalho, G.; Saitoa, S.; Mondina, M.; Teixeira-Silva, N. S.; Camargo, L.E.A.; Monteiro-Vitorello, C.B. (2016). A stable *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues. *Plant Pathology*, 65, 154–162.
- Sun, S-R.; Chen, J-L.; Duan, Y-Y.; Chu, N.; Huang, M-T.; Fu, H-Y.; Gao, S-J. (2019). Improve Primers for the specific detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in Sugarcane using a conventional PCR assay. *Plant Disease*, 103:3251-3258.
- Urashima, A.S.; Silva, M.F.; Coraini, N.F.; Gazaffi, R. (2020). Temporal incidence of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane propagating materials of Brazilian cultivars. *Crop Protection* 128, 104976.
- Zavaglia, A.C.; Cia, M.C.; Popin, R.V.; Camargo, L.E.A. (2016). No alternative hosts of the sugarcane pathogen *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* were identified among grass and non-grass species using novel PCR primers. *Trop. plant pathol.* DOI 10.1007/s40858-016-0107-3.
- Zhang, X.; Chen, M.; Liang, Y.; Xing, Y.; Comstock, J.C.; Li, Y.; Yang, L. (2016). Morphological and Physiological responses of Sugarcane to *Leifsonia xyli* subst. *xyli* infection. *Plant Disease*, 100:2499-2506.

## II.19 *Mannheimia haemolytica*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Gammaproteobacteria  
Ordem: Pasteurellales  
Família: Pasteurellaceae  
Gênero: *Mannheimia*  
Espécie: *Mannheimia haemolytica*

### Motivo da inclusão na lista:

A bactéria *Mannheimia haemolytica* é um dos principais patógenos respiratórios de ruminantes, causando uma doença economicamente significativa, principalmente, em bovinos, ovinos e caprinos, conhecida como pasteurelose pneumônica bovina ou manheimiose (Araújo et al., 2009; CABI, 2020). Também está indiretamente associada com outras doenças como mastite em ovelhas e camelos, septicemia em cordeiros edoença respiratória rara em suínos associada com *Actinobacillus pleuropneumoniae*, além de ter sido isolada de aves e outros animais selvagens, como a onça pintada (*Panthera onca*) (Confer & Ayalew, 2018; CABI, 2020). Em animais saudáveis essa bactéria se caracteriza como um comensal nasal e nasofaríngeo sem desenvolver sinais clínicos, mas em animais estressados, imunocomprometidos ou com outras infecções ela se replica e ganha acesso aos pulmões onde causa danos graves (Rice et al., 2008). Não é considerada um agente zoonótico importante, mas pode causar doenças graves em bebês e adultos imunocomprometidos ou com problemas cardíacos (CABI, 2020). *M. haemolytica* é uma bactéria encontrada em todo o mundo, sendo relatada com mais frequência na Ásia, África, América do Norte e alguns países da Europa (CABI, 2020), mas também há alguns relatos em estados brasileiros, tendo sido relatados, inclusive, surtos em ovinos de propriedades do Rio Grande do Sul (Hancock, 1991) e de Minas Gerais (Araújo et al., 2009). Além de grandes impactos econômicos em diversos países, a bactéria foi relacionada ao declínio da população de animais selvagens, como os carneiros norte americanos, o que demonstra potencial de poder afetar também espécies nativas brasileiras. Além disso, é considerada invasiva não só dentro, mas também fora da sua área nativa, com alta probabilidade de ser transportada internacionalmente, ser difícil e com alto custo de controle, além de representar uma ameaça à perda de animais ameaçados de extinção (Confer & Ayalew, 2018; CABI, 2020).

### Método de identificação:

*M. haemolytica* é um Gram-negativo correspondente ao biogrupo 1 de *Pasteurella haemolytica*, que em 1999 foi renomeado como *Mannheimia* (Araújo et al., 2009). Pela restrição contemplar apenas essa espécie do gênero, quando houver solicitação de registro e uso de outras espécies do mesmo, uma identificação precisa deve ser realizada para garantir que não se trate de *M. haemolytica*. De acordo com a literatura para a identificação molecular da espécie, a amplificação de regiões do gene rDNA 16S não fornece resolução suficiente para definição da espécie e por isso não é comumente utilizada nos trabalhos. Por outro lado, vários outros genes específicos vêm sendo descritos nos trabalhos e podem ser utilizados para essa identificação, a maioria dos quais genes associados à virulência de *M. haemolytica*, com destaque para o gene PHSSA (antígeno específico sorotipo *M. haemolytica*) que codifica um antígeno específico da espécie ou gene Rpt2 (gene que codifica a proteína metiltransferase) (Legesse et al., 2018). Outros genes também utilizados são o gene HP (responsável pela amplificação do gene de uma proteína hipotética desconhecida), Lkt e Lkt2 (amplificam regiões distintas do gene da leucotoxina D), porém nesse caso fornecem melhor resolução apenas com a utilização da técnica de PCR-multiplex (Alexander et al., 2008). Por isso, sugere-se a abordagem descrita no trabalho de Kumar e colaboradores, 2015 e que consiste na realização de PCR convencional ou PCR-multiplex a partir de primers para o gene PHSSA e

Rpt2. Entretanto, destaca-se que caso apresente resolução taxonômica suficiente e sem ambiguidades, apenas um deles pode ser selecionado para uso.

Gene	Sequências dos primers (foward/reverse)	Tamanho do amplicon (pb)	Referências
<i>Rpt2</i>	F: 5' - GTTTGTAAGATATCCCATT - 3' R: 5' - CGTTTCCACTTGCCTGA - 3'	1022	Deressa et al., 2010
<i>PHSSA</i>	F: 5' - TTCACATCTTCATCCTC - 3' R: 5' - TTTTCATCCTCTCGTC - 3'	325	Hawari et al., 2008

### Referências Bibliográficas:

Alexander, T. W., Cook, S. R., Yanke, L. J., Booker, C. W., Morley, P. S., Read, R. R., ... & McAllister, T. A. (2008). A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. *Veterinary microbiology*, 130(1-2), 165-175.

Araújo, M. R. D., Costa, M. C., & Ecco, R. (2009). Ocorrência de pneumonia associada à infecção por *Mannheimia haemolytica* em ovinos de Minas Gerais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 29(9), 719-724.

CABI Dataset: *Mannheimia haemolytica*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/70912>  
Acesso em: 01 de janeiro de 2021.

Deressa, A., Asfaw, Y., Lubke, B., Kyule, M. W., Tefera, G., & Zessin, K. H. (2010). Molecular detection of *Pasteurella multocida* and *Mannheimia haemolytica* in sheep respiratory infections in Ethiopia. *The Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 8(2), 101.

Hancock, R. D., Fallavena, L. C., & Ribeiro, L. A. (1991). *Pneumonic pasteurellosis* due to *P. multocida* in a flock of lambs in Brazil. *Veterinary Record*, 128(7), 154-155.

Hawari, A. D., Hassawi, D. S., & Sweiss, M. (2008). Isolation and identification of *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in sheep and goats using biochemical tests and random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *J. Biol. Sci*, 8(7), 1251-1254.

Kumar, J., Dixit, S. K., & Kumar, R. (2015). Rapid detection of *Mannheimia haemolytica* in lung tissues of sheep and from bacterial culture. *Veterinary World*, 8(9), 1073.

Legesse, A., Abayneh, T., Mamo, G., Gelaye, E., Tesfaw, L., Yami, M., & Belay, A. (2018). Molecular characterization of *Mannheimia haemolytica* isolates associated with pneumonic cases of sheep in selected areas of Central Ethiopia. *BMC microbiology*, 18(1), 205.

Rice, J. A., Carrasco-Medina, L., Hodgins, D. C., & Shewen, P. E. (2007). *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Review*.

## II.20 *Melissococcus plutonius*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Classe: Bacilli  
Ordem: Lactobacillales  
Família: Enterococcaceae  
Gênero: *Melissococcus*  
Espécie: *Melissococcus plutonius*

### Motivo da inclusão na lista:

*Melissococcus plutonius* é o agente causador da “European foulbrood”, doença que acomete ninhadas de abelhas causando infecções letais nas larvas, podendo levar à destruição da colônia. Essa doença afeta abelhas em diferentes países ao redor do mundo, infectando não só a espécie *Apis mellifera*, mas também as espécies *A. cerana* e *A. laboriosa*. Dado o alto potencial de invasividade dessa bactéria, sua notificação OIE é obrigatória (CABI/EPPO, 2020). *M. plutonius* infecta, principalmente, as larvas não seladas quando têm entre 4 e 5 dias de vida, mas pode afetar também larvas seladas. Inicialmente, essa bactéria é digerida com alimentos contaminados e se multiplica no intestino da larva, a qual se move alterando a posição normal que é enrolada para estendida. Além disso, as larvas doentes são caracterizadas por uma mudança na cor do branco para amarelo, seguido de laranja e marrom até atingir o preto acinzentado quando a larva morre. Pode ocorrer também um cheiro fétido ou azedo na colônia infectada (Forsgren, 2010). Conforme mencionado, essa doença está amplamente distribuída no mundo, com registros em todos os continentes, sendo os primeiros relatos no início do século XX. Na América do Sul, em países como Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Colômbia, Paraguai, Peru e Venezuela, por exemplo, encontram-se relatos desde a década de 80, enquanto o Uruguai registrou essa doença nos anos 2000. No Brasil, a perda de colmeias de abelhas tem sido uma preocupação e estudo recente reportou a presença de *M. plutonius* em colmeias sintomáticas relacionadas à morte de larvas e perdas de algumas colônias (Teixeira et al., 2020). Dessa forma, torna-se imprescindível o elevado controle da utilização desse patógeno no território brasileiro, dada a importância econômica e garantia de equilíbrio ecológico que as abelhas representam ao ambiente.

### Método de identificação:

Sempre que houver solicitação de registro de isolados do gênero *Melissococcus*, é preciso garantir que não se trate da espécie *M. plutonius*, única espécie do gênero que possui restrições de uso. Poucos protocolos moleculares visando à identificação da espécie, os quais envolvem PCR convencional, nested-PCR e qPCR a partir dos genes rDNA 16S e *sodA* (superóxido dismutase) foram publicados (Forsgren et al., 2015). Para a identificação, sugere-se a utilização de protocolo de PCR convencional a partir do gene que codifica o rRNA 16S com um único par de *primers*, apresentado no trabalho de Govan & colaboradores (1998). Entretanto, destaca-se, que alguns autores afirmam que nem sempre essa reação apresenta alta especificidade e por isso, para a identificação precisa da espécie, pode vir a ser necessário complementar com uma segunda abordagem, descrita no trabalho de Djordjevic & colaboradores (1998), também baseada no gene rDNA 16S, mas envolvendo uma reação de hemi-nested PCR. Os *primers* utilizados nessas metodologias estão descritos na tabela abaixo.

Gene	Sequências dos primers (forward/reverse)	Referências
rDNA 16S	Primer 1: 5' - GAAGAGGAGTTAAAAGGCGC - 3' Primer 2: 5' - TATCTCTAAGGCAGTCAAAGG - 3'	Govan e colaboradores (1998)
sodA	MP1: 5' - CTTTGAAACGCCTTAGAGA - 3' MP2: 5' - ATCATCTGTCCCACCTTA -3' MP3: 5' - ATCATCTGTCCCACCTTA -3'	Djordjevic e colaboradores (1998)

### Referências:

CABI Dataset: *Melissococcus plutonius*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/34446>. Acesso em: 04 de janeiro de 2021.

Djordjevic, S. P., Noone, K., Smith, L., & Hornitzky, M. A. (1998). Development of a hemi-nested PCR assay for the specific detection of *Melissococcus pluton*. *Journal of Apicultural Research*, 37(3), 165-174.

Forsgren, E. (2010). European foulbrood in honeybees. *Journal of invertebrate pathology*, 103, S5-S9.

Forsgren, E., Budge, G. E., Charrière, J. D., & Hornitzky, M. A. (2015). Standard methods for European foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-14.

Govan, V. A., Brözel, V., Allsopp, M. H., & Davison, S. (1998). A PCR Detection Method for Rapid Identification of *Melissococcus pluton* in Honeybee Larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5), 1983-1985.

Teixeira, É. W., Ferreira, E. A., da Luz, C. F. P., Martins, M. F., Ramos, T. A., & Lourenço, A. P. (2020). European Foulbrood in stingless bees (Apidae: Meliponini) in Brazil: Old disease, renewed threat. *Journal of Invertebrate Pathology*, 107357.

## II.21 *Mycoplasma agalactiae*

### Classificação taxonômica

Domínio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Classe: Mollicutes  
Ordem: Mycoplasmatales  
Família: Mycoplasmataceae  
Gênero: *Mycoplasma*  
Espécie: *Mycoplasma agalactiae*

### Motivo da inclusão na lista:

*Mycoplasma agalactiae* é o agente causador da agalaxia contagiosa, uma doença infecciosa que acomete rebanhos de pequenos ruminantes, como ovinos e caprinos, e que causa, principalmente, perda de apetite, mastite, poliartrite, ceratoconjuntivite, agalactia e, ocasionalmente, problemas oculares, hiperemia das mucosas, secreções, aborto e pneumonia nos animais infectados (Santos et al., 2015). As glândulas mamárias são as mais atingidas por *M. agalactiae*, causando uma queda ou perda completa da produção de leite em raças leiteiras e o leite de animais doentes apresenta uma aparência amarelada e granular com consistência espessa (OIE, 2018; CABI, 2021). Além disso, pode causar morbidade e mortalidade em animais jovens de raças de corte, o que causa grandes perdas e prejuízos econômicos aos produtores (Azevedo et al., 2006). Embora *M. agalactiae* seja o agente responsável pela doença, espécies desse gênero podem estar envolvidas em infecções com características semelhantes (Santos et al., 2015). Ovelhas prenhas, especialmente durante o último trimestre de gestação, são mais suscetíveis a contrair essa doença. Contudo, ambos os sexos de ovinos e caprinos podem ser afetados e, adicionalmente, as manifestações têm sido mais letais às cabras do que às ovelhas (CABI, 2021). A doença ocorre em vários continentes como Europa, Ásia e África e atualmente países como Eritreia, China, Irã, Iraque, Líbano, Mongólia, Turquia, Albânia, Chipre, Itália, Sérvia, Espanha e Estados Unidos têm reportado a presença desse patógeno (Azevedo et al., 2006; CABI, 2021). O Brasil, embora atualmente não esteja na lista de países portadores dessa doença, teve o seu primeiro relato no estado de São Paulo em 1942, mas não foi possível confirmar o agente causador. Dessa maneira o primeiro relato confirmado no país e publicado foi em 2006 (Azevedo et al., 2006). Desde então outros relatos de casos de agalaxia contagiosa causada por *M. agalactiae* foram reportados, sendo considerada uma doença emergente no país (Santos et al., 2015; Santos et al., 2018). Destaca-se que a aproximação dos animais selvagens a hospedeiros incomuns a seu habitat, como rebanhos e grandes criações, pode contribuir para o aumento do espectro de microrganismos circulantes na população nativa, pois atuam diretamente como reservatórios de patógenos. Bonato e colaboradores (2015) relatam a ocorrência de *Mycoplasma* spp. infectando primatas neotropicais do Brasil na extensão da Amazônia. A Amazônia Legal compreende os estados brasileiros de Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Mato Grosso e Maranhão, dos quais há representantes que possuem extensas criações de caprinos e ovinos. Sendo assim, apesar de não haver citação da específica de *M. agalactiae* no referido estudo e tendo em vista o perfil invasivo que essa bactéria possui, torna-se importante o controle de sua disseminação no território brasileiro, visando impedir o desequilíbrio ecológico na relação dos pequenos ruminantes com outros organismos silvestres.

### Método de identificação:

Sempre que houver a solicitação de registro de microrganismos do gênero *Mycoplasma*, é preciso garantir que não se trate da espécie *M. agalactiae*, devido à sua restrição de uso. Para a identificação de *M. agalactiae*, ensaios de PCR têm sido rotineiramente usados em muitos laboratórios e são considerados extremamente sensíveis, por isso vários ensaios foram desenvolvidos ao longo dos anos a partir de genes diferentes, porém demonstrando níveis semelhantes de sensibilidade (OIE, 2018). Dentre os principais genes utilizados para a identificação de *M. agalactiae* se encontram o rDNA 16S e gene-alvo P30, que

codifica uma lipoproteína (antígeno monoespecífico e policlonal anti-P30-His) específica para esta espécie. Como uma abordagem que é baseada na amplificação do gene que codifica o rRNA 16S, utilizando os *primers* FS1 e FS2 (Tola et al., 1997) se mostrou sensível e específica e vem sendo utilizada com sucesso em trabalhos recentes, tais como Santos e colaboradores, (2018) e Matos e colaboradores, (2019), recomenda-se a sua utilização. Entretanto, destaca-se que, caso essa reação não apresente especificidade suficiente para discriminação em nível de espécie sem abiguidades, a abordagem recente, descrita no trabalho de Babazadeh e colaboradores (2020) e que se baseia na amplificação do gene P30 pode ser usada de forma complementar, dado que se trata de um gene específico da espécie. Os *primers* de ambas as abordagens estão descritos na tabela abaixo.

Gene	Sequências dos <i>primers</i> (foward/reverse)	Referências
rDNA 16S	FS1: 5'- AAAGGTGCTTGAGAAATGCC - 3' FS2: 5'- GTGCAGAAGAAAGTCCAATCA - 3'	Tola et al., 1997
P30	30F: 5'- CGAGTTTAAATAACACAGG - 3' P30R: 5'-AAATCTTGCAGCAAGA - 3'	Babazadeh et al., 2020

#### Referências bibliográficas:

- Azevedo, E. O. D., Alcântara, M. D. B. D., Nascimento, E. R. D., Tabosa, I. M., Barreto, M. L., Almeida, J. F. D., ... & Castro, R. S. D. (2006). Contagious agalactia by *Mycoplasma agalactiae* in small ruminants in Brazil: first report. *Brazilian Journal of Microbiology*, 37(4), 576-581.
- Babazadeh, M., Pourbakhsh, S. A., Noormohammadi, Z., Esmaelizad, M., & Goudarzi, H. (2020). Molecular identification of *Mycoplasma agalactiae* in Iran based on P30 gene. *Archives of Razi Institute*.
- Bonato, L., Figueiredo, M. A. P., Gonçalves, L. R., Machado, R. Z., & André, M. R. (2015). Occurrence and molecular characterization of *Bartonella* spp. and hemoplasmas in neotropical primates from Brazilian Amazon. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 42, 15–20.
- CABI Dataset: *Mycoplasma agalactiae* infections. Disponível em:<https://www.cabi.org/isc/datasheet/74487>. Acesso em 08 de janeiro de 2021.
- Matos, R. A., Santos, S. B., Alves, R. V., Silva, E. J., Marinho, M. L., Júnior, J. W. P., ... & Garino Júnior, F. (2019). Ocorrência e fatores de risco associados à infecção por *Mycoplasma agalactiae* em rebanhos caprinos leiteiros do estado da Paraíba, Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 39(2), 93-98.
- OIE, (2018) Contagius Agalactia.
- Santos, O. M., Campos, A. C., Santos, J. P., Santos, P. O. M., Caldas, E. L. C., Santos, A. D. F., ... & Azevedo, E. O. (2015). Agalaxia contagiosa em ovinos e caprinos do Estado de Sergipe: dados preliminares. *Scientia Plena*, 11(4).
- Santos, S. B. D., Melo, R. P. B. D., Silva, L. T. R. D., Oliveira, J. M. B. D., Abad, A. C. A., Pinheiro Júnior, J. W., & Mota, R. A. (2018). Epidemiology of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma mycoides* cluster in flocks of northeastern Brazil. *Ciência Rural*, 48(4).

Tola, S., Angioi, A., Rocchigiani, A. M., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G., & Leori, G. (1997). Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Veterinary microbiology*, 54(1), 17-22.

## **II.22 *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma iowae* e *Mycoplasma meleagridis* (Mycoplasmas aviários)**

### **Classificação taxonômica:**

Domínio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Classe: Mollicutes  
Ordem: Mycoplasmatales  
Família: Mycoplasmataceae  
Gênero: *Mycoplasma*  
Espécies: *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma. synoviae*, *Mycoplasma iowae* e  
*Mycoplasma meleagridis*

### **Motivo da inclusão na lista:**

Bactérias do gênero *Mycoplasma* são diferenciadas fenotípicamente de outras bactérias por seu tamanho diminuto e total falta de uma parede celular. Organismos com essas características fazem parte da classe Mollicutes e cerca de 200 organismos foram descritos dentro dessa classe (Razin, 2006). Mais de 23 espécies do gênero *Mycoplasma* foram recuperadas principalmente de membranas mucosas de aves e quatro delas são reconhecidas como patógenos de hospedeiros aviários: *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae* e *M. meleagridis*, sendo que sua proliferação diferenciada afeta aves como perus, faisão, galinhas, passarinhos, gansos, patos, galinha d'angola e aves silvestres (Ferguson-Noel et al., 2020; CABI, 2021). Geralmente, nos animais doentes, são observados lesões e sinais respiratórios como tosses, espirros, coriza, e conjuntivite, o que pode resultar em diminuição do consumo de ração e produção de ovos, aumento da mortalidade e baixa eclodibilidade (Nascimento et al., 2005). Esses patógenos possuem ampla distribuição mundial, sendo observados em diversos países em todos os continentes, inclusive no Brasil, onde uma série de medidas de controle e monitoramento são exigidas para evitar a proliferação da doença (MAPA, 2020). *Mycoplasma gallisepticum* e *Mycoplasma synoviae* estão na lista da OIE de doenças economicamente importantes e as infecções devem ser notificadas a eles. A Diretiva da UE 2009/198 inclui *M. gallisepticum* e *M. meleagridis* e se refere às condições de saúde animal que regem o comércio intracomunitário e as importações de países terceiros de aves e ovos para incubação (CABI, 2021). Além dos impactos econômicos, o fato de espécies desse gênero afetarem aves silvestres é um problema adicional, pois podem representar um risco à biodiversidade de aves nativas brasileiras.

### **Método de identificação:**

Sempre que houver a solicitação de registro de microrganismos do gênero *Mycoplasma*, além da espécie *M. agalactiae* mencionada, é preciso garantir que eles não se tratam também das espécies *M. gallisepticum*, *M. synoviae*, *M. iowae* e *M. meleagridis*. Não foram encontrados métodos que permitam a identificação conjunta e de forma específica apenas dessas espécies do gênero *Mycoplasma*, portanto sugere-se a utilização de uma abordagem que permita obter a identificação geral das espécies do gênero de forma confiável, pois isso permitiria determinar se ela se trata de uma dessas espécies em questão. Vários genes vêm sendo utilizados para identificar as espécies do gênero, dentre os quais o rDNA 16S, fragmentos parciais do gene *pvpA* (proteína relacionada à citadesina putativa) e o gene *vlhA* (lipoproteína variável hemaglutinina A) (Sprygin et al., 2010; Ghorashi et al., 2010). Outra possibilidade é a utilização de abordagens moleculares mais complexas tais como polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP) e análise de DNA polimórfico amplificado aleatório (RAPD) (Feberwee et al., 2005). Entretanto, por se tratar de um método mais simples e que demonstrou resultados precisos e confiáveis, sendo capaz de detectar e identificar a maioria das espécies de micoplasmas, sugere-se a utilização da metodologia descrita no trabalho de McAuliffe e colaboradores, (2005), que se baseia na amplificação de fragmentos do gene 16S rDNA a partir dos primers GC-341F e R543F (específicos paramolicutes), seguido

do uso de eletroforese em gel de gradiente desnaturante. Os *primers* utilizados no trabalho se encontram descritos na tabela abaixo:

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
GC-341F	5'- CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGGGCTACGGGAGGCAGCAG - 3'
R543F	5'- ACCTATGTATTACCGCG -3'

### **Referências Bibliográficas:**

Ashelford, K. E., Weightman, A. J., & Fry, J. C. (2002). PRIMROSE: a computer program for generating and estimating the phylogenetic range of 16S rRNA oligonucleotide probes and *primers* in conjunction with the RDP-II database. *Nucleic acids research*, 30(15), 3481-3489.

CABI Dataset: avian mycoplasmosis. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/92922>. Acesso em: 05 de janeiro de 2021.

Feberwee, A., Dijkstra, J. R., von Banniseht-Wysmuller, T. E., Gielkens, A. L., & Wagenaar, J. A. (2005). Genotyping of *Mycoplasma gallisepticum* and *M. synoviae* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis and digitalized random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Veterinary microbiology*, 111(1-2), 125-131.

Ferguson-Noel, N., Armour, N. K., Noormohammadi, A. H., El-Gazzar, M., & Bradbury, J. M. (2020). Mycoplasmosis. *Diseases of poultry*, 907-965.

Ghorashi, S. A., Noormohammadi, A. H., & Markham, P. F. (2010). Differentiation of *Mycoplasma gallisepticum* strains using PCR and high-resolution melting curve analysis. *Microbiology*, 156(4), 1019-1029.

MAPA: Micoplasmose aviária. Disponível em:<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/sanidade-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saudeanimal/pnsa/micoplasmas>. Acesso em: 05 de janeiro de 2021.

McAuliffe, L., Ellis, R. J., Lawes, J. R., Ayling, R. D., & Nicholas, R. A. (2005). 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *Journal of medical microbiology*, 54(8), 731-739.

Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.

Nascimento, E. R., Pereira, V. L. A., Nascimento, M. G. F., & Barreto, M. L. (2005). Avian mycoplasmosis update. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 7(1), 1-9.

Razin, S. (2006). The genus *Mycoplasma* and related genera (class Mollicutes). *The prokaryotes*, 4, 836-904.

Sprygin, A. V., Andreychuk, D. B., Elatkin, N. P., Zinyakov, N. G., Kolosov, S. N., Mudrak, N. S., ... & Perevozchikova, N. A. (2010). Genetic diversity of *Mycoplasma gallisepticum* field isolates using partial sequencing of the pvpA gene fragment in Russia. *Avian diseases*, 54(2), 899-904.

## **II.23 *Paenibacillus larvae***

### **Classificação taxonômica:**

Domínio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Classe: Bacilli  
Ordem: Bacilales  
Família: Paenibacillaceae  
Gênero: *Paenibacillus*  
Espécie: *Paenibacillus larvae*

### **Motivo da inclusão na lista:**

*Paenibacillus larvae* é o agente causador de uma doença que acomete as ninhadas de abelhas, chamada de “American foulbrood”. Esse patógeno infecta as abelhas em seu estágio inicial de desenvolvimento podendo matar a ninhada pela secreção de metabólitos secundários com propriedades antimicrobianas e pela liberação de enzimas degradadoras de quitina, o que causa o rompimento do epitélio intestinal da larva da abelha, resultando numa massa pegajosa (Poppinga & Genersch, 2015). Essa é uma doença que abrange uma ampla faixa de locais, variando desde Austrália, Nova Zelândia, China, Japão, mais de 30 países europeus, como Alemanha, Itália, Espanha, Croácia, além dos Estados Unidos, Canadá, Cuba, México e na América do Sul, foi relatada no Brasil, além da Argentina, Uruguai e Chile (CABI/EPPO, 2020). No Brasil, a primeira detecção de *P. larvae* ocorreu em 2003, mas o primeiro grave surto foi em 2006 no estado do Paraná. Sua principal forma de disseminação é através dos esporos bacterianos que podem ser carreados pelas próprias abelhas ou pelo intercâmbio de mel, favos, rainhas ou mesmo equipamentos entre os apicultores (OIE, 2013). É importante ressaltar que esta bactéria também é considerada uma cepa invasiva, o que dificulta mais ainda o seu controle. Portanto, a notificação dessa doença é obrigatória em vários países e as colmeias infectadas precisam ser completamente destruídas para evitar a disseminação do patógeno. Assim, tendo em vista que as abelhas constituem um grupo muito importante para o equilíbrio ambiental dada a sua atuação como polinizadoras, tanto de ambientes naturais, como nos espaços agricultáveis e levando em consideração a existência de toda uma cadeia de apicultores que geram renda fazendo o manejo desses organismos, a importância de se ter uma vigilância para o controle da referida doença passa a ter significativos impactos positivos na economia e, principalmente, no meio ambiente.

### **Método de identificação:**

Dentro do gênero *Paenibacillus* a restrição de uso se aplica apenas à espécie *P. larvae*, dessa maneira sempre que houver o pedido de utilização de microrganismos desse gênero é preciso determinar com confiabilidade de que não se trata dessa espécie em questão. Há uma grande diversidade de métodos moleculares como PCR convencional, rep-PCRs, qPCR, RFLP, dentre outros, a partir principalmente do gene rDNA 16S, que permitem a identificação de *P. larvae* (de Graaf et al., 2013; Rossi et al., 2018). Outra possibilidade é a utilização de abordagens moleculares mais complexas utilizando uma grande diversidade de genes distintos em conjunto (Versalovic et al., 1994). Dentre os métodos disponíveis sugere-se a utilização da abordagem contida do trabalho de Dobbelaere e colaboradores (2001), que se mostrou muito robusta nos trabalhos em que foi utilizada e que consiste na amplificação de um fragmento de 1106 pb do gene rDNA 16S a partir dos primers AFB-F e AFB-R. A reação demonstra alta sensibilidade e especificidade, possibilitando a identificação confiável de *P. larvae*. A descrição dos primers se encontra na tabela abaixo.

<i>Primers</i>	<i>Sequências</i>
AFB-F	5'- CTTGTGTTCTTCGGGAGACGCCA - 3'
AFB-R	5'- TCTTAGAGTGCCCACCTCTGCG - 3'

### **Referências:**

CABI Dataset: *Paenibacillus larvae*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/109548#REF-DDB-150811>. Acesso em: 03 de janeiro de 2021.

De Graaf, D. C., Alippi, A. M., Antúnez, K., Aronstein, K. A., Budge, G., De Koker, D., ... & Fünfhaus, A. (2013). Standard methods for American foulbrood research. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1-28.

Dobbelaere, W., de Graaf, D. C., & Peeters, J. E. (2001). Development of a fast and reliable diagnostic method for American foulbrood disease (*Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*) using a 16S rRNA gene based PCR. *Apidologie*, 32(4), 363-370.

MAPA. (2006). Nota técnica DSA nº52/2006. Ocorrência de “Cria Pútrida Americana” no município de Quatro Barras, estado do Paraná-Brasil. Ministério da Agricultura do Brasil, Brasília.

OIE (World Organisation for Animal Health) (2013). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. Paris, France: World Organisation for Animal Health.

Poppinga, L., & Genersch, E. (2015). Molecular pathogenesis of American Foulbrood: how *Paenibacillus larvae* kills honeybee larvae. *Current opinion in insect science*, 10, 29-36.

Rossi, F., Amadoro, C., Ruberto, A., & Ricchiuti, L. (2018). Evaluation of quantitative PCR (qPCR) *Paenibacillus larvae* targeted assays and definition of optimal conditions for its detection/quantification in honey and hive debris. *Insects*, 9(4), 165.

Versalovic, J., Schneider, M., De Bruijn, F. J., & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in molecular and cellular biology*, 5(1), 25-40.

## **II.24 *Pseudomonas cichorii***

### **Classificação taxonômica:**

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Gammaproteobacteria  
Ordem: Pseudomonadales  
Família: Pseudomonadaceae  
Gênero: *Pseudomonas*  
Espécie: *Pseudomonas cichorii*

### **Motivo da inclusão na lista:**

A espécie *Pseudomonas cichorii* é responsável pela doença da ferrugem bacteriana principalmente em vegetais da família Asteraceae, mas também outras, causando lesões que aumentam, tornam-se marrom-escuras ou pretas e às vezes podem coalescer para formar áreas necróticas grandes que podem afetar toda a folha, caules (aipo, crisântemo, girassol, café, berinjela, gerânio e tomate) e botões de flores (crisântemo, berinjela e gerânio) (Cottyn et al., 2011). Apresenta relatos de ocorrência mundial. No Brasil, *P. cichorii* é um patógeno de grande importância econômica, sua ocorrência foi descrita em culturas de diferentes espécies botânicas, tais como almeirão, açafrão, berinjela, beterraba, brócolis, calêndula, cebola, cenoura, couve, corda de viola, crisântemo, dália, escarola, eucalipto, falsa-serralha, feijão, fumo, gérbera, inhame, mamona, manjericão, pimentão, quiabo, rabanete, salsa, salsão e violeta. (Malavolta Junior et al., 2008). Devido à ampla gama de hospedeiros, infecções por este fitopatógeno têm potencial de causar desequilíbrio ambiental, pois representantes das famílias citadas possuem importância não apenas econômica, mas como alimento e forrageio para diversas espécies em diferentes nichos. Além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu alto potencial de invasibilidade, microrganismos desta espécie são descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Dada a gravidade da doença causada pela espécie *Pseudomonas cichorii*, podendo levar os vegetais de diversas famílias com representantes nativos da flora brasileira (Asteraceae, Solanaceae) à morte, acrescida de sua conhecida capacidade de invasibilidade, recomenda-se a sua não utilização sob quaisquer condições.

### **Método de identificação:**

O gênero *Pseudomonas* é formado por um grupo diverso de microrganismos, os quais apresentam muitos nichos e funções ambientais, sendo comumente utilizados, seja como agentes de biocontrole ou em processos de biorremediação. Sendo assim e, devido à restrição de uso ser especificamente da espécie *P. cichorii*, é preciso garantir que, quando ocorrer a solicitação de utilização de bactérias desse gênero, ela seguramente não se trate de *P. cichorii*. Vários ensaios de PCR propõem possíveis genes, primers e abordagens para a identificação das diferentes espécies que constituem o gênero, incluindo os genes rDNA 16S, rpoB (subunidade β da RNA polimerase) e gyrB (DNA girase, subunidade β) e outros, sendo possível encontrar uma grande diversidade de opções (Tayeb et al., 2005; Jubrael et al., 2018). Além de técnicas mais complexas como qPCR, nested-PCR, Rep-PCR, multiplex e outras, quando houver necessidade. Entretanto, como é necessário a identificação específica da espécie *P. cichorii*, sugere-se a utilização do protocolo descrito no trabalho de Cottyn e colaboradores (2011), que desenham os primers hrp1a e hrp2a direcionados para a identificação da espécie, os quais foram otimizados a partir dos primers degenerados HRCR8092 e HRCT8986, descritos originalmente por Mazurier e colaboradores (2004). Os primers sugeridos estão descritos na tabela abaixo:

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
hrp1a	5'- CCGTTCATCGTCATCGACCT - 3'
hrp2a	5'- CTGTCCCACATGATCTGGGT - 3'

### **Referências Biliográficas**

CABI Dataset: *Pseudomonas cichorii* (bacterial blight of endive). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44942>. Acesso em: 03 de janeiro de 2021.

Cottyn, B.; Baeyena, S.; Pauwelynbc, E.; Verbaendertd, I.; Vosd, P. de.; Bleyaertb, P.; Höftec, M.; Maesa, M. (2011). Development of a real-time PCR assay for *Pseudomonascichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant Pathology*, 60, 453–461.

Jubrael, J. M., Qader, M. K., Khalid, H. M., Hanoon, R. A., & Merza, N. S. (2018). Molecular differentiation and determination of multi-drug resistant isolates of *Pseudomonas* species collected from burn patients in Kurdistan Region, Iraq. *Zanco Journal of Medical Sciences*, 22(3), 394-400.

Malavolta Júnior, V.A.; Beriam, L.O.S.; Almeida, I.M.G.; Rodrigues Neto, J.; Robbs, C.F. (2008). Bactérias fitopatogênicas assinaladas no Brasil: uma atualização. *Summa Phytopathologica*, v.34, n.1-87.

Mazurier, S.; Lemunier, M.; Siblot, S.; Mougel, C.; Lemanceau, P. (2004). Distribution and diversity of type III secretion system-like genes in saprophytic and phytopathogenic fluorescent pseudomonads. *FEMS Microbiology Ecology*, 49, 455–467.

Tayeb, L. A., Ageron, E., Grimont, F., & Grimont, P. A. D. (2005). Molecular phylogeny of the genus *Pseudomonas* based on rpoB sequences and application for the identification of isolates. *Research in Microbiology*, 156(5-6), 763-773.

## II.25 *Pseudomonas savastanoi*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: GammaProteobacteria  
Ordem: Pseudomonadales  
Família: Pseudomonadaceae  
Gênero: *Pseudomonas*  
Espécie: *Pseudomonas savastanoi*

### Motivo da inclusão na lista:

A espécie *Pseudomonas savastanoi* é o agente da doença do nó da azeitona, presente em todas as regiões olivícolas no mundo. Os sintomas são caracterizados pela formação de tecido neoplásico (nós, galhas) principalmente em caules e ramos jovens, podendo ocorrer também em folhas, raízes e outros órgãos, ocasionalmente (CABI, 2020). *P. savastanoi* pertence ao PG3 do complexo *P. syringae*, sendo o único filogrupo que inclui bactérias que causam supercrescimentos tumorais (nós) em hospedeiros lenhosos (Moreno-Pérez, et al., 2020). Sua distribuição ocorre mundialmente. No Brasil, a dispersão não sintomática da bactéria no campo é maior que o aparecimento da doença. A bactéria é categorizada como praga presente para campos de diversos cultivares (Marques e Samson, 2016). De acordo com a Embrapa (2003), no Brasil o fitopatógeno acomete diversas espécies leguminosas (Fabaceae), tendo como principal representante o feijão, mas não se limitando a ele. Além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu alto potencial de invasibilidade, microrganismos desta espécie são também descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Devido à variedade de leguminosas que o fitopatógeno pode infectar, há o potencial risco para as espécies nativas e a biodiversidade brasileira, uma vez que esta família é integrante de diversos nichos estando diretamente ligada à cadeia alimentar, abrigo e relações ecológicas. Por isso, dada a gravidade da doença causada pela espécie *Pseudomonas savastanoi* e a sua conhecida capacidade de invasibilidade, recomenda-se a sua não utilização sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

Dentro do gênero *Pseudomonas*, além de *P. cichorii*, pelo fato da restrição de uso também se estender à espécie *Pseudomonas savastanoi*, é preciso garantir, em qualquer solicitação de utilização de bactérias do gênero, que ela também seguramente não se trate de qualquer subespécie de *Pseudomonas savastanoi*. Assim como para *P. cichorii*, para a identificação específica de *P. savastanoi*, é mais comum e eficaz a utilização de abordagens de PCR convencional a partir de genes e primers direcionados para a identificação da espécie. Dessa maneira, sugere-se utilizar a metodologia descrita no trabalho de Penyalver e colaboradores (2000), que desenharam um par de primers, IAALF e IAALR, a partir do gene *iaaL*, responsável por codificar uma proteína IAA- lisina sintetase que é específica da espécie, gerando um fragmento de 454 pb. A reação se mostrou específica e sensível, amplificando todos os isolados da espécie testados. Os primers utilizados se encontram descritos abaixo.

Primers	Sequências
IAALF	5 - 'GGGACCAGCGGCAACATCAA - 3'
IAALR	5' - CGCCCTCGGAAGTGCCATAC - 3'

## **Referências Bibliográficas**

CABI Dataset: *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* (oleander knot). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/45004>. Acesso em: 03 de janeiro de 2021.

Caballo-Ponce E, Meng X, Uzelac G, Halliday N, Câmara M, Licastro D, Passos da Silva D, Ramos C, Venturi V. (2018). Quorum sensing in *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* and *Erwinia toletana*: role in virulence and interspecies interactions in the olive knot. *Appl Environ Microbiol*, 84:e00950-18.

EMBRAPA (2003). Trindade, L.C.; Coelho, M.V.S.; Marques, A.S.A. Comunicado Técnico 100: Crestamento bacteriano do feijoeiro: praga quarentenária para o Brasil com alto risco de disseminação no país. Brasília.

Marques, A.S. A. e Samson, R. Population dynamics of *Pseudomonas savastanoi* pv. *phaseolicola* in bean, throughout the epiphytic and pathogenic phases. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.51, n.5, p.623-630.

Moreno-Perez A, Pintado A, Murillo J, Caballo-Ponce E, Tegli S, Moretti C, Rodríguez-Palenzuela P and Ramos C. (2020). Host Range Determinants of *Pseudomonas savastanoi* Pathovars of Woody Hosts Revealed by Comparative Genomics and Cross-Pathogenicity Tests. *Front. Plant Sci.* 11:973.

Penyalver, R., García, A., Ferrer, A., Bertolini, E., & López, M. M. (2000). Detection of *Pseudomonas savastanoi* pv. *savastanoi* in olive plants by enrichment and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(6), 2673-2677.

Tsuji, M.; Ohta, K.; Tanaka, K.; Takikawa, Y. (2017). Comparison among Japanese isolates of *Pseudomonassavastanoi* pv. *savastanoi*, causal agent of olive knot disease. *J Gen Plant Pathol.*, 83:152–161.

## **II.26 *Ralstonia solanacearum***

### **Classificação taxonômica:**

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Betaproteobacteria  
Ordem: Burkholderiales  
Família: Ralstoniaceae  
Gênero: *Ralstonia*  
Espécie: *Ralstonia solanacearum*

### **Motivo da inclusão na lista:**

A espécie *Ralstonia solanacearum* causa a murcha bacteriana e infecta principalmente batata, tomate, pimentão, berinjela, jiló e bananeira. Genin e Denny (2012) destacam que esta bactéria é patogênica para mais de 200 espécies de plantas pertencentes a mais de 50 famílias botânicas diferentes, abrangendo não só espécies de cultivares como também arbustos e árvores em outras famílias de dicotiledôneas e monocotiledôneas. Khokhani e colaboradores (2017) destacam que *R. solanacearum* pode sobreviver por anos no solo ou na água como um saprófita ou nos sistemas vasculares das plantas como um patógeno agressivo em feridas, zonas de alongamento, colonizando o córtex da raiz (vasos do xilema que transportam água), onde se multiplica sistematicamente resultando em sintomas de murchamento e, eventualmente, morte da planta. Esta característica de transição é possível porque esta espécie utiliza-se de uma rede sensorial e regulatória para fazer a transição entre seus modos saprofítico e parasita (Clough et al., 1997). Sua distribuição ocorre mundialmente. No Brasil, os ataques são principalmente pela raça 1 (biovaras 1 e 3), referentes aos filotipos 2 e 1, respectivamente, da bactéria, embora haja também relatos da raça 3 (biovar 2 e 2T), referente ao filotipo 2 (EMBRAPA, 2013). Além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu alto potencial de invasibilidade, microrganismos desta espécie são descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Dada a gravidade da doença causada pela espécie *R. solanacearum* podendo levar os vegetais à morte, por sua capacidade regulatória de virulência, o seu potencial de invasibilidade e ampla gama de famílias que afeta, o que pode representar risco potencial às espécies nativas e a biodiversidade brasileira, recomenda-se a sua não utilização sob quaisquer condições.

### **Método de identificação:**

Pelo fato de *R. solanacearum* ser a única espécie do gênero *Ralstonia* que apresenta restrições de uso, é preciso apenas garantir que quando houver pedidos de utilização de outras espécies do gênero, ela realmente não se trate de *R. solanacearum*. Para a identificação da espécie por meio de técnicas moleculares baseadas em PCR vários genes podem ser utilizados, mas principalmente genes *housekeeping* representativos de *R. solanacearum* como *fliC* (subunidade de flagelos) e genes relacionados à patogenicidade, como *hrp* (sistema de secreção) não sendo encontrados trabalhos que comumente utilizam o rDNA 16S (Schonfeld et al., 2003; Fouché-Weich et al., 2005). Sugere-se utilizar a abordagem descrita no trabalho de Castillo e Greenberg (2007), que desenharam *primers* a partir dos genes *housekeepinggdhA* (glutamato desidrogenase oxidoredutase), *adk* (adenilato quinase), *gyrB* (DNA girase, subunidade  $\beta$ ), genes *gapA* (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase oxidoredutase), *ppsA* (fosfoenolpiruvato sintase) e *egl* (precursor da endoglucanase), os quais foram explorados em muitos trabalhos subsequentes. Todos os conjuntos de *primers* desenhados para cada gene foram considerados eficazes para a identificação da espécie, sendo assim qualquer um deles poderia ser selecionado para uso na sua identificação. Esses conjuntos de *primers* estão listados abaixo:

Gene	Sequências dos primers (forward/reverse)
<i>gdhA</i>	GdhAF: 5'- GATGGATGACGGCCGCATCG - 3' GdhAR: 5'- TGAACGCCGCCGTCCGCAG - 3'
<i>adk</i>	AdkF: 5'- TCTGTTGGCGCACCCGGC - 3' AdkR: 5'- CCCAGCCGGAGTAGTACTTC - 3'
<i>gyrB</i>	GyrBF: 5'- AGGGCTTCGTCGAGTACATCAA - 3' GyrBR: 5'- GTTCCGCCGAGGCTCCACG - 3'
<i>gapA</i>	GapAF: 5'- ATGACCATCAAGATCGGCAT - 3' GapAR: 5'- GGGCCATTCCAGCACCT - 3'
<i>ppsA</i>	PpsAF: 5'- CTGTACAACGACCGCGCTAT - 3' PpsAR: 5'- GTTGGTCAGGCCATCTCTT - 3'
<i>egl</i>	EglF: 5'-AAATCCAGATATCGAATTGCCAA - 3' EglR: 5'-GCGTGCCGTACCAGTTCTG - 3'

## Referências Bibliográficas

CABI Dataset: *Ralstonia solanacearum* race 1 (bacterial wilt of solanaceous crops). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/44998>. Acesso em: 03 de janeiro de 2021.

Castillo, J.A.; e Greenberg, J.T. (2007). Evolutionary Dynamics of *Ralstonia solanacearum*. *Applied and Environmental Microbiology*, Feb., p. 1225–1238.

Clough, S.J.; Lee, K-E.; Schell, M.A.; Denny, T.P. (1997). A Two-Component System in *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* Modulates Production of PhcA-Regulated Virulence Factors in Response to 3-Hydroxypalmitic Acid Methyl Ester. *Journal of Bacteriology*, p. 3639–3648.

EMBRAPA (2013). Lopes, C.A. e Rossato, M. Comunicado Técnico 92: Diagnóstico de *Ralstonia solanacearum* em tomateiro.

Fouché-Weich, J., Poussier, S., Trigalet-Demery, D., Berger, D., & Coutinho, T. (2006). Molecular identification of some African strains of *Ralstonia solanacearum* from eucalypt and potato. *Journal of General Plant Pathology*, 72(6), 369-373.

Genin, S.; Denny, T.P. Pathogenomics of the *Ralstonia Solanacearum* Species Complex. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2012. 50:4.1–4.23.

Khokhani, D, Lowe-Power, TM, Tran, TM, Allen C. (2017). A single regulator mediates strategic switching between attachment/spread and growth/virulence in the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *mBio* 8:e00895-17.

Schönfeld, J., Heuer, H., Van Elsas, J. D., & Smalla, K. (2003). Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of fliC fragments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(12), 7248-7256.

## II.27 *Spiroplasma kunkelii*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Firmicutes  
Classe: Mollicutes  
Ordem: Entomoplasmatales  
Família: Spiroplasmataceae  
Gênero: *Spiroplasma*  
Espécie: *Spiroplasma kunkelii*

### Motivo da inclusão na lista:

A bactéria *Spiroplasma kunkelii* é um microrganismo que pertence à classe Mollicutes devido à ausência de parede celular externa e à família Spiroplasmataceae, devido à sua morfologia helicoidal e motilidade (Gussie et al., 1995; CABI, 2021). Esse microrganismo, transmitido principalmente pelas cigarrinhas, é um patógeno responsável por causar a doença de “enfezamento” do milho (*Zea Mays*), considerada uma das mais relevantes doenças do milho, podendo afetar também *Euchleana mexicana* e *E. perennis* e mais de 300 espécies de plantas importantes para a agricultura e meio ambiente, principalmente da família Poaceae (Gussie et al., 1995; Ozbek et al., 2003; CABI, 2021). A clorose das margens das folhas é o primeiro sintoma da infecção por *S. kunkelii* seguida pelo avermelhamento das pontas das folhas mais velhas e em folhas sucessivas acima das que apresentam os primeiros sintomas, as manchas cloróticas coalescem formando faixas que se estendem em direção às pontas das folhas até que a folha inteira esteja afetada (CABI, 2021). As plantas doentes apresentam redução de crescimento e desenvolvimento, entrenós curtos, proliferação e má formação das espigas, espigas improdutivas e enfraquecimento dos colmos (Cota et al., 2018). A ocorrência dessa bactéria é restrita ao continente americano, tendo causado surtos da doença em países como Estados Unidos, Panamá, Nicarágua, México, Jamaica, Honduras, Guatemala, El Salvador, Belize, Argentina, Colômbia, Bolívia, Paraguai, Peru, Venezuela e Brasil, onde surtos ocorreram em alguns estados, mas atualmente a presença do microrganismo só é confirmada no Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (CABI, 2021; EPPO, 2020). *S. kunkelii* é considerada uma bactéria invasiva e os principais riscos considerados de sua introdução estão relacionados tanto às perdas econômicas, quanto a ameaças à biodiversidade de espécies nativas brasileiras, principalmente da família Poaceae, e desequilíbrios ambientais. Por isso ela é listada pela Embrapa no sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) como um risco de quarentena A1, que são pragas exóticas que não estão presentes no país importador.

### Método de identificação:

Sempre que houver pedidos de utilização de microrganismos do gênero *Spiroplasma*, é preciso garantir que não se trate especificamente de *S. kunkelii*, única espécie do gênero que possui restrições de uso. Uma das principais características dos microrganismos da classe Mollicutes, incluindo *S. kunkelii*, além da ausência de parede celular, é o tamanho diminuto do genoma devido a eventos extensos de perda de genes (Bai et al., 2004). Sendo assim, para sua identificação por meio de técnicas de PCR, os trabalhos geralmente buscam utilizar genes específicos presentes nesses organismos. Sugere-se utilizar, para a identificação deste agente, a abordagem presente no trabalho de Barros e colaboradores (2001), um dos principais estudos de identificação da espécie e utilizado em trabalhos subsequentes. Neste trabalho, visando desenvolver um ensaio de PCR específico para a detecção de *S. kunkelii*, seis primers foram projetados considerando regiões únicas da sequência de nucleotídeos do gene da espiralina encontrado em *S. kunkelii*. Várias combinações dos primers desenhados foram realizadas, sendo as mais eficientes aquelas formadas pelos primers CSSF1/CSSR1, CSSF1/CSSR3 e CSSF2/CSSR6. Todas essas reações se mostraram sensíveis e muito específicas, não sendo observada nenhuma amplificação a partir do DNA de outras espécies do gênero *Spiroplasma* ou a partir de plantas de milho contaminadas com outros patógenos, e o sequenciamento dos amplicons obtidos compartilhou 100% de similaridade de sequência

com a região comparável do gene da espiralina de *S. kunkelii*. Assim, qualquer uma das três combinações de *primers*, os quais estão descritos na tabela abaixo, pode ser utilizada para a identificação eficiente da espécie.

<b>Primers</b>	<b>Sequências dos <i>primers</i> (foward/reverse)</b>
Conjunto A	CSSF1: 5'- CTGTAGCGGCAAAAGATGTA - 3' CSSR1: 5'- AGTAGTTGGCTGAATAGTT - 3'
Conjunto B	CSSF1: 5' - CTGTAGCGGCAAAAGATGTA - 3' CSSR3: 5'- AATAGTTCCCTCTACACCC - 3'
Conjunto C	CSSF2: 5'- GGCAAAAGATGTAACAAAAGT - 3' CSSR6: 5'- GTTACTTCAACAGTAGTTGCG - 3'

### **Referências Bibliográficas:**

Bai, X., Fazzolari, T., & Hogenhout, S. A. (2004). Identification and characterization of *traE* genes of *Spiroplasma kunkelii*. *Gene*, 336(1), 81-91.

Barros, T. S., Davis, R. E., Resende, R. O., & Dally, E. L. (2001). Design of a polymerase chain reaction for specific detection of corn stunt spiroplasma. *Plant Disease*, 85(5), 475-480.

CABI *Spiroplasma kunkelii* (corn stunt spiroplasma). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/50978>. Acesso em: 08 de janeiro de 2021.

Cota, L. V., da SILVA, D. D., Aguiar, F. M., & da COSTA, R. V. (2018). Resistência de genótipos de milho aos enfezamentos. *Embrapa Milho e Sorgo-Circular Técnica (INFOTECA-E)*.

Gussie, J. S., Fletcher, J., & Claypool, P. L. (1995). Movement and multiplication of *Spiroplasma kunkelii* in corn. *Phytopathology*, 85(10), 1093-1098.

Özbek, E., Miller, S. A., Meulia, T., & Hogenhout, S. A. (2003). Infection and replication sites of *Spiroplasma kunkelii* (Class: Mollicutes) in midgut and Malpighian tubules of the leafhopper *Dalbulus maidis*. *Journal of invertebrate pathology*, 82(3), 167-175.

## II.28 *Taylorella equigenitalis*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Betaproteobacteria  
Ordem: Burkholderiales  
Família: Alcaligenaceae  
Gênero: *Taylorella*  
Espécie: *Taylorella equigenitalis*

### Motivo da inclusão na lista:

*Taylorella equigenitalis* é o agente causador da Metrite Equina Contagiosa, uma doença sexualmente transmissível que acomete o trato genital de cavalos e raramente de burros (OIE, 2021). A infecção é assintomática em machos, mas em fêmeas é frequentemente caracterizada por um corrimento vaginal abundante e infertilidade aguda, no entanto, os sintomas variam de graves a indetectáveis (Erdman et al., 2011). Essa doença tem sido a causa de perdas econômicas substanciais relatadas em várias indústrias de equinos em todo o mundo e devido ao caráter invasivo de *T. equigenitalis* sua notificação à OIE é obrigatória. Com base nessas notificações, considera-se que atualmente o microrganismo *T. equigenitalis* e a doença estão, relativamente, contida em alguns países como: Finlândia, França, Alemanha, Holanda, Noruega, Eslovênia e Suécia (CABI/EPPO, 2021). No Brasil, essa doença não vem sendo relatada. Desta forma, apesar de não serem registrados casos em animais nativos brasileiros, um maior controle para evitar possíveis contaminações é necessário, pois sua introdução poderia trazer graves prejuízos econômicos, como os que têm acontecido nos países onde a presença da doença vem sendo registrada, além dos danos ambientais que a entrada e o uso de bactérias patogênicas podem causar, com grande potencial de disseminação e invasibilidade no Brasil.

### Método de identificação:

Pelo fato de *T. equigenitalis* ser apenas uma das espécies do gênero *Taylorella*, sempre que houver pedidos de utilização de microrganismos que pertençam a esse gênero é preciso garantir, devido à restrição de uso, de que não se trate especificamente de *T. equigenitalis*. Vários métodos moleculares para a identificação dessa espécie têm sido realizados usando principalmente PCR convencional, PCR multiplex e qPCR (OIE, 2018). Além de técnicas adicionais, como o uso da tipagem de sequência multilocus (MLST) para vários genes *housekeeping* (Hwang & Cho, 2018). Nos trabalhos com PCR convencional uma série de genes vêm sendo sugeridos e estudados para promover a identificação específica dessa espécie, dentre os quais principalmente o rDNA 16S, além de genes como *gltA* (citrato sintase), *gyrB* ( $\beta$  subunidade da DNA girase), *hf* (fumarato hidratase), *shmt* (serina hidroximetiltransferase), *tyrB* (tirosina aminotransferase) e *txn* (tireodoxina), dentre outros (Hwang & Cho, 2018). Dentre os trabalhos disponíveis, sugere-se a utilização da metodologia proposta em Duquesne e colaboradores (2008), por se tratar de uma reação de PCR convencional simples, a partir do rDNA 16S e que se mostrou sensível e específica, amplificando de forma confiável todos os DNAs de *T. equigenitalis* testados e sem ocorrência de amplificação em nenhuma das demais espécies usadas, inclusive outras do gênero *Taylorella*. Essa abordagem consiste na utilização de *primers*, um deles proposto em um trabalho anterior, e um segundo no referido trabalho, capazes de amplificar um fragmento de 413 pB do gene rDNA 16S da espécie e a descrição desses *primers* se encontra na tabela abaixo:

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>	<b>Referências</b>
Te1	5' - CAGCATAAGGAGAGCTTGCTTTCT - 3'	Bleumink-Pluym et al., 1994
Te2	5' - GTCCATGGTATTAACACAAAC- 3'	Duquesne et al., 2008

### **Referências:**

Bleumink-Pluym, N. M., Werdler, M. E., Houwers, D. J., Parlevliet, J. M., Colenbrander, B., & van der Zeijst, B. A. (1994). Development and evaluation of PCR test for detection of *Taylorella equigenitalis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(4), 893-896.

CABI Dataset: *Taylorella equigenitalis*. Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/61809> Acesso em: 06 de janeiro de 2021.

Duquesne, F., Pronost, S., Laugier, C., & Petry, S. (2007). Identification of *Taylorella equigenitalis* responsible for contagious equine metritis in equine genital swabs by direct polymerase chain reaction. *Research in veterinary science*, 82(1), 47-49.

Erdman MM, Creekmore LH, Fox PE, Pelzel AM, Porter-Spalding BA, Aalsburg AM, et al. Diagnostic and epidemiologic analysis of the 2008–2010 investigation of a multi-year outbreak of contagious equine metritis in the United States. *Prev Vet Med*. 2011;101(3–4):219–28.

Hwang, J. Y., & Cho, G. J. (2018). First Identification of *Taylorella equigenitalis* From Genital Tracts of Thoroughbred Horses from the Inland Area of South Korea by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Equine Veterinary Science*, 60, 16-22.

OIE (2018) Terrestrial Manual for Contagious equine metritis.

OIE (2021) Animal Health in the World – Overview. Disponível em <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/oie-listed-diseases-2019/>. Acesso em 06 de janeiro de 2021

## II.29 *Xanthomonas* sp.

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Gammaproteobacteria  
Ordem: Xanthomonadales  
Família: Xanthomonadaceae  
Gênero: *Xanthomonas*

### Motivo da inclusão na lista:

O gênero *Xanthomonas* é responsável pela doença da estria bacteriana nos grãos, lesões de cancro, murcha da banana e a mancha angular da folha (CABI, 2020). São descritas infecções em monocotiledôneas da família Poaceae (ex.: cevada, centeio, trigo, arroz), causando murcha das sementes, que, geralmente, têm seu peso de teste reduzido (Khojasteh et al., 2019); em espécies da família Rutaceae (ex.: *Citrus*) causando erupções esponjosas em relevo amarelo claro na superfície das folhas, galhos e frutos (Davis et al, 2015); em espécies da família Musaceae (ex.: Banana), causando perda de turgor e murchamento das folhas, seguido de necrose e quebra das bases. Internamente, os feixes vasculares mostram uma descoloração creme, amarela ou rosada que pode se estender por toda a planta (Tushemereirwe et al., 2004); e, em um representante da família Rosaceae, o morango, causando manchas angulares, brilhantes e encharcadas de água, que aumentam e coalescem (Maas et al., 2000). O gênero apresenta relatos de ocorrência mundial. Várias espécies são descritas no Brasil, e Araújo e colaboradores (2019) destacam um estudo de caso ocorrido em São Paulo, com sintomas severos em cultivares de manga, com danos à vegetação, superiores a 70%. Não foram encontrados relatos de casos em representantes diretos da biodiversidade nativa brasileira. Porém, além de sua reconhecida ação fitopatogênica, microrganismos desta espécie são descritos como altamente invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Por isso, dada a gravidade das doenças causadas em ampla gama de hospedeiros pelo gênero *Xanthomonas*, acrescida de sua conhecida capacidade de invasibilidade, e neste caso, entendendo a possibilidade de infecção em representantes nativos das famílias citadas, recomenda-se a sua não utilização sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

Vários trabalhos têm realizado ensaios visando promover identificação molecular sensível e específica de diferentes espécies do gênero *Xanthomonas*, tais como *X. oryzae*, *X. vasicola*, *X. fragariae*, *X. citri*, *X. campestris*, dentre outras, a partir de genes e com o uso de primers específicos, não sendo comum para esse gênero, de acordo com os trabalhos levantados, a utilização do rDNA 16S(Opgenorth et al., 1996; Zaccardelli et al., 2007; Lang et al., 2010; Lang et al., 2017). Entretanto, como a restrição de uso se estende a todas as espécies do gênero, não há necessidade de identificação específica nesse nível, apenas é preciso garantir, quando houver pedidos de utilização de bactérias da família Xanthomonadaceae, de que não se trate de organismos de nenhuma das espécies do gênero *Xanthomonas*. Para a identificação desses microrganismos, no nível taxonômico de gênero, sugere-se utilizar a abordagem presente no trabalho de Adriko e colaboradores (2014), que desenvolveram um sistema de PCR para identificar de forma robusta os membros do gênero *Xanthomonas* utilizando conjuntos de primers desenvolvidos a partir de três genes alvos, *fyuA* (gene receptor dependente de TonB), ITS(espaçador transcrito interno) e *gumD* (síntese de goma xantana). Dentre os conjuntos de primers testados, aquele desenvolvido para amplificar fragmentos de 254 pb da região ITS foi o que demonstrou maior sensibilidade e especificidade, pois foi capaz de amplificar todas as espécies do gênero e não mostrou amplificação para nenhum dos outros organismos de diferentes gêneros testados. Por isso sugere, especificamente, a sua utilização, a qual se baseia na realização de 4 diferentes reações convencionais, a partir de 4 primers forward (*X-ITS-F3j*, *X-*

ITS-F3 k, X-ITS-F3c, X-ITS-F3d) e o mesmo *primerreverse* (X-ITS-R2). A descrição desses *primers* pode ser visualizada na tabela abaixo.

<b>Primers</b>	<b>Sequências</b>
X-ITS-F3j	5'- GGCGGGGACTTCGAGTCCCTAA - 3'
X-ITS-F3k	5' - GGCGGGGACTTCGAGTCCCTAA - 3'
X-ITS-F3c	5' - CGGGGACCTCGAGTCCCTA - 3'
X-ITS-F3d	5' - GCAGGGACTTAGAGTCCCTA - 3'
X-ITS-R2	5' - CTGCAGGATACTGCCGAAGCA - 3'

### **Referências Bibliográficas**

Adriko, J., Mbega, E. R., Mortensen, C. N., Wulff, E. G., Tushemereirwe, W. K., Kubiriba, J., & Lund, O. S. (2014). Improved PCR for identification of members of the genus *Xanthomonas*. *European journal of plant pathology*, 138(2), 293-306.

Araújo, M.R.; Leão, G.M.A.; Silva, R.C.A.; Oliveira, A.I.T.; Silva, J.F.O. (2019). Mancha-Bacteriana da Mangueira (*Xanthomonas campestris* pv. *cangiferaeindicae*): Etiologia e Estratégias de Controle. *Revista Desafios* – v. 6, Especial.DOI: <http://dx.doi.org/10.20873/uft.2359365220196Especialp31>.

CABI Dataset: *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* (banana xanthomonas wilt (BXW)). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/56917>. Acesso em: 06 de janeiro de 2021.

\_\_\_\_\_ : *Xanthomonas fragariae* (angular leaf spot). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/56934>. Acesso em: 06 de janeiro de 2021.

\_\_\_\_\_ : *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (bacterial leaf streak of corn). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/36777909>. Acesso em: 06 de janeiro de 2021.

\_\_\_\_\_ : *Xanthomonas citri* (citrus canker). Disponível em: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/56921>. Acesso em: 06 de janeiro de 2021.

Davis, R.I.; Taylor, R.K.; Rouse, D.; Flack, M.; Tsatsia, F.; Tsatsia, H. (2015). First record of citrus canker, caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in Solomon Islands. *Australasian Plant Dis. Notes*, 10:9. DOI 10.1007/s13314-014-0156-8.

Khojasteh M, Taghavi SM, Khodaygan P, Hamzehzarghani H, Chen G, Bragard C, Koebnik R, Osdaghi E. (2019). Molecular typing reveals high genetic diversity of *Xanthomonas translucens* strains infecting small-grain cereals in Iran. *Appl Environ Microbiol* 85:e01518-19.

Lang, J. M., Hamilton, J. P., Diaz, M. G. Q., Van Sluys, M. A., Burgos, M. R. G., Vera Cruz, C. M., Buell, C. R., Tisserat, N. A., and Leach, J. E. (2010). Genomics-based diagnostic marker development for *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*. *Plant Dis.* 94:311-319.

Lang, J.M.; DuCharme, E.; Ibarra Caballero, J.; Luna, E.; Hartman, T.; Ortiz-Castro, M.; Korus, K.; Rascoe, J.; Jackson-Ziems, T.A.; Broders, K.; Leach, J.E. (2017). Detection and Characterization of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Cobb, 1894) comb. nov. Causing Bacterial Leaf Streak of corn in the United States. *Phytopathology*, 107:1312-1321.

Maas, J.L.; Gouin-Behe, C.; Hartung, J.S.; Hokanson, S.C. (2000). Sources of Resistance for Two Differentially Pathogenic Strains of *Xanthomonas fragariae* in *Fragaria* Genotypes. *Hortscience*, 35(1):128–131.

Ngoc, B.T.L.; Verniere, C.; Vital, K.; Guerin, F.; Gagnevin, L.; Brisse, S.; Ah-You, N.; Pruvost, O. (2009). Development of 14 minisatellite markers for the citrus canker bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *citri*. *Molecular Ecology Resources*, 9, 125–127.

Opogenorth, D.C.; Smart, C.D.; Louws, F.J.; Bruijn, F. J. de.; Kirkpatrick, B.C. (1996). Identification of *Xanthomonas fragariae* Field Isolates by rep-PCR Genomic Fingerprint. *Plant Disease*, 80:868-873.

Tushemereirwe, W.; Kangire, A.; Ssekiwoko, F.; Offord, L. C.; Crozier, J.; Boa, E.; Rutherford, M.; Smith, J.J. (2004). First report of *Xanthomonas campestris* pv. *musacearum* on banana in Uganda. *Plant Pathology*, 53. 802. Doi: 10.1111/j.1365-3059.2004.01090.x.

Vauterin, L., Rademaker, J., and Swings, J. (2000). Synopsis on the taxonomy of the genus *Xanthomonas*. *Phytopathology* 90:677-682.

Zaccardelli, M.; Campanile, F.; Spasiano, A.; Merighi, M. (2007). Detection and identification of the crucifer pathogen, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, by PCR amplification of the conserved Hrp/type III secretion system gene *hrcC*. *Eur. J. Plant Pathol.*, 118:299–306.

## II.30 *Xylella fastidiosa*

### Classificação taxonômica:

Domínio: Bacteria  
Filo: Proteobacteria  
Classe: Gammaproteobacteria  
Ordem: Xanthomonadales  
Família: Xanthomonadaceae  
Gênero: *Xylella*  
Espécie: *Xylella fastidiosa*

### Motivo da inclusão na lista:

*Xylella fastidiosa* é uma bactéria responsável pela doença do Mal-de-Pierce em videiras (Ingel et al., 2019). Mas a espécie também causa a doença da escaldadura em plantações de pêssego e ameixas (Chen et al., 2019); a clorose em espécies de *Citrus*, a síndrome do declínio rápido da azeitona, bem como outras doenças em diversos vegetais como o café, o hibisco e a ameixa (Pierry et al, 2020). Possui uma ampla gama de hospedeiros de plantas e espectro de espécies de insetos capazes de servir como vetores, que aumentam a invasividade da bactéria (CABI, 2020). As plantas cronicamente infectadas podem ter folhas pequenas e distorcidas com clorose interinal e brotos com entrenós encurtados e raramente sobrevivem mais de 2-3 anos, apesar de quaisquer sinais de recuperação (Goodwin e Zhang, 1997). Esta espécie apresenta relatos de ocorrência na Europa, Ásia, América do Norte e do Sul e na África (Marrocos). No Brasil, a doença foi inicialmente detectada em São Paulo, em 1987; na Bahia, em 1996, na região do Litoral Norte, e, posteriormente, em 2009, na região do Recôncavo Sul (Casais et al, 2014). Segundo Marques e Garrido (2018), a bactéria *X. fastidiosa* ocorre em amplos tipos de cultivares, árvores, plantas ornamentais e inclusive, plantas silvestres. No capítulo, os autores descrevem que, de acordo com a European Food Safety Authority (EFSA), em 2016, a lista de espécies de plantas hospedeiras para *X. fastidiosa* consistia de 359 espécies de plantas incluindo 75 diferentes famílias botânicas. Por este fato, é destacado que, no Brasil, o risco de introdução de diversas subespécies patogênicas, especialmente na forma latente, não deve ser subestimado. Além de sua reconhecida ação fitopatogênica, devido ao seu alto potencial de invasibilidade, microrganismos desta espécie são descritos como invasivos pela EPPO e pelo CABI no Compendium de Espécies Invasivas. Assim, além de ser uma preocupação econômica por afetar espécies de importantes cultivares, essa fitobactéria apresenta potencial dano a espécies nativas pertencentes a inúmeras famílias botânicas, representando um alto risco à biodiversidade brasileira. Por isso, tendo em vista a gama de doenças causadas e de hospedeiros possíveis para a espécie *X. fastidiosa* e sendo conhecida sua capacidade de invasibilidade, recomenda-se a sua não utilização sob quaisquer condições.

### Método de identificação:

*X. fastidiosa* é a única espécie do gênero *Xylella* que possui restrição de uso, dessa maneira sempre que houver solicitação de utilização de bactérias desse gênero é preciso que fique comprovado não se tratar especificamente da espécie *X. fastidiosa*. Vários estudos têm desenvolvido e proposto ensaios moleculares baseados em PCR visando promover a identificação eficiente e confiável da espécie. Esses trabalhos são baseados na utilização de uma grande diversidade de genes e regiões gênicas individualmente ou em conjunto para obter essa identificação, com destaque para as sequências localizadas entre os genes que codificam o rRNA 16S, *holC* (subunidade chi, DNA polimerase III), *gyrB* ( $\beta$  subunidade da DNA girase), *petC* (subunidade complexa de ferro-enxofre do citocromo b6-f), *leuA* (2-isopropilmalato sintase), *bamA* (fator de montagem de proteína de membrana externa BamA), *rpoH* (fator RpoH sigma da RNA polimerase), *GIF1* (fator de interação 1 de GRF), e *F-BOX* (proteínas F-box), dentre outros (Chen et al., 2019). Dentre os trabalhos levantados sugere-se, pela simplicidade e confiabilidade demonstrada, a utilização da abordagem presente no trabalho de Rodrigues e colaboradores (2003), que propõem, para a

identificação do microrganismo, a amplificação de fragmentos do gene rRNA 16S de tamanhos e com o uso de *primers* diferentes, projetados especificamente para a espécie. Todas as combinações de *primers* testadas apresentaram 100% de eficiência e, portanto, qualquer uma delas pode ser utilizada. Os *primers* elaborados se encontram descritos na tabela abaixo

<b>Primers</b>	<b>Sequências dos primers (foward/reverse)</b>	<b>Tamanho do amplicon (pb)</b>
Set A	S-S-X.fas-0067-a-S-19: 5' - CGGCAGCACATTGGTAGTA - 3' S-S-X.fas-1439-a-A-19: 5' - CTCCTCGCGGTTAAGCTAC - 3'	1348
Set B	S-S-X.fas-0067-a-S-19: 5' - CGGCAGCACATTGGTAGTA - 3' S-S-X.fas-0838-a-A-21: 5' - CGATACTGAGTGCCAATTGC - 3'	745
Set C	S-S-X.fas-0838-a-S-21: 5' - GCAAATTGGCACTCAGTATCG - 3' S-S-X.fas-1439-a-A-19: 5' - CTCCTCGCGGTTAAGCTAC - 3'	603

### Referências Bibliográficas

Casais, V.O.; Patrocínio, E.; Oliveira, S.A.S.; Schnadelbach, A.S.; Barbosa, C.J.; Barbosa, L.V. Diversidade genética de *Xylella fastidiosa* em regiões produtoras de citros na Bahia. *Pesq. Agropec. Bras.*, Brasília, v.49, n.1, p.26-33.

Chen, C.; Bock, C.H.; Brannen, P.M. (2019). Novel Primers and Sampling for PCR Detection of *Xylella fastidiosa* in Peach. *Phytopathology*, 109:307-317.

Goodwin, P.H. e Zhang, S. (1997). Distribution of *Xylella fastidiosa* in southern Ontario as determined by the polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology* 19:13-18.

Ingel, B.; Jeske, D.R.; Sun, Q.; Grosskopf, J.; Roper, M.C. (2019). *Xylella fastidiosa* Endoglucanases Mediate the rate of Pierce's Disease development in *Vitis vinifera* in a Cultivar-Dependent Manner. *MPMI*, Vol. 32, No.10, pp. 1402-1414.

Marques, A.S. dos A.; Garrido, L da R. (2018). Capítulo 23: *Xylella fastidiosa* subsp. *fastidiosa* (Xanthomonadales: Xanthomonadaceae). In: Morais, E. G. F.; Lohmann, T. R.; Silva, M. L. Da; Parizzi, P.; Laranjeira, F. F. (Ed.). Priorização de pragas quarentenárias ausentes no Brasil. Brasília, DF: Embrapa, 2018.

Pierry, P.M.; Santana, W.O.; Kitajima, J.P.; Martins-Júnior, J.; Zaini, P.A.; Uceda-Campos, G.; Feitosa-Júnior, O.R. et al. (2020). High-Quality draft genome sequence resource of eight *Xylella fastidiosa* strains isolated from *Citrus*, Coffee, Plum and Hibiscus in South America. *Phytopathology*, 110:1751-1755.

Rodrigues, J.L.M.; Silva-Stenico, M. E.; Gomes, J. E.; Lopes, J.R.S.; Tsai1, S.M. Detection and Diversity Assessment of *Xylella fastidiosa* in Field-Collected Plant and Insect Samples by Using 16S rRNA and *gyrB* Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 4249–4255.