

**FACULDADE DE ENFERMAGEM NOVA ESPERANÇA
CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

PEDRO HENRIQUE DE FREITAS BRAZ

**MASTITE CLÍNICA EM CAPRINO CAUSADA PELA *BURKHOLDERIA*
THAILANDENSIS: RELATO DE CASO**

**JOAO PESSOA
2024**

PEDRO HENRIQUE DE FREITAS BRAZ

MASTITE CLÍNICA EM CAPRINO CAUSADA PELA *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS*: RELATO DE CASO

Trabalho de Conclusão de Curso – TCC,
apresentado à Coordenação do Curso de
Graduação em Medicina Veterinária da
Faculdade de Enfermagem Nova Esperança
como exigência parcial para obtenção do
título de Bacharel em Medicina Veterinária.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Guilherme Santana de Moura

**JOAO PESSOA
2024**

PEDRO HENRIQUE DE FREITAS BRAZ

MASTITE CLÍNICA EM CAPRINO CAUSADA PELA *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS*: RELATO DE CASO

Trabalho de Conclusão de Curso - TCC apresentado pelo aluno **Pedro Henrique De Freitas Braz** do Curso de Bacharelado em Medicina Veterinária, tendo obtido o conceito Aprovado, conforme a apreciação da Banca Examinadora.

Aprovado em 31 de Maio de 2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Santana de Moura- Orientador

Prof. Dra. Sandra Batista dos Santos - Membro

Prof. Dra. Maiza Araújo Cordão - Membro

B839m

Braz, Pedro Henrique de Freitas

Mastite clínica em caprino causada pela *burkholderia thailandensis*: relato de caso / Pedro Henrique de Freitas Braz. – João Pessoa, 2024.
20f.; il.

Orientador: Prof^o. D^o. Guilherme Santana de Moura.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Faculdade Nova Esperança – FACENE

1. Mastite. 2. Caprinocultura. 3. Antimicrobianos. I. Título.

CDU: 619

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me dado a oportunidade e a força de chegar até o fim, e de sempre me lembrar todos os dias que tudo é possível naquele que acredita. Agradeço também aos meus pais e irmão pelo esforço que fizeram para eu chegar até aqui, me apoiaram em tudo e em todas as minhas escolhas, me dando a oportunidade de seguir e realizar esse sonho de criança.

Agradeço também a minha namorada Giselle que trilhou esse caminho junto de mim, sempre ao meu lado, me mostrando que para cada parede existem outras várias portas e janelas que chegam na mesma oportunidade.

Agradeço ao meu primeiro pet, meu Poodle Mamão, que foi com o intuito de ajudá-lo que iniciei esse caminhada pela veterinária, mesmo não estando mais aqui, continuarei ajudando aos outros para que não sintam de forma tão rápida a passagem de seus animais de estimação, seguindo o dilema de que, farei pelos outros aquilo que não consegui fazer por você. Em nome de todos, salvarei muitas vidas.

Por fim, agradeço aos meus professores e orientadores, Dr: Guilherme Moura e Dra: Maiza Cordão, por todo apoio e carinho que colocaram na minha caminhada, por todo conhecimento que se dispuseram a ensinar e por toda paciência com seus alunos.

RESUMO

A caprinocultura é um dos meios de criação animal que mais cresce no Brasil, principalmente em regiões do semiárido, por ser de fácil acesso e baixo custo de manutenção. Mesmo com o avanço na criação, ainda se têm dúvidas sobre a compressão do manejo higiênico em caprinos leiteiros e suas consequências clínicas. A mastite, é umas das afecções que mais acometem animais leiteiros no país, sendo caracterizado por uma inflamação localizada ou generalizada da glândula mamária, causada por possíveis erros de manejo e tratamento errôneos não acompanhados por profissionais da área, podendo ainda, identificar possíveis resistência futuras a antibióticos e consequentemente tratamentos mais complexos. Este estudo tem como objetivo relatar um caso de mastite clínica causada pela bactéria *Burkholderia thailandensis* em caprinos. Foram coletadas amostras de leite de caprinos da raça Saanen em um rebanho comercial no município do Conde, PB. O teste de caneca de fundo escuro foi usado para identificar grumos no leite antes da coleta, seguindo assim para a coleta manual após a antissepsia do óstio do teto, o leite foi armazenado e refrigerado para análise microbiológica. A semeadura foi feita em placas de Petri contendo Ágar-sangue, enriquecidas com 5% de sangue ovino, mantidas na incubação por um período de 48 horas em uma temperatura de 37,2°, sendo feitas leituras de 24 em 24 horas para a determinação morfológica das colônias. A avaliação inicial envolveu a técnica de Gram, para determinar o formato e estrutura da bactéria, logo mais o isolado foram transferidos para placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton, e enviados para a Clínica do Leite em Piracicaba – SP, onde foi feita a identificação pelo método de espectrofotometria de massa MALDI-TOF, paralelamente foi feito um perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, avaliado através de um antibiograma, testando 10 drogas. Os resultados foram positivos para *Burkholdeira thailandensis*. Ainda não sendo identificada essas bactérias em mastites ocasionadas no Brasil. Compreender a importância nas técnicas de identificação, assim como a similaridade do manejo sanitário e higiene de ordenha, é de suma importância para o controle de mastites e surgimento de resistência a antibióticos usados precocemente.

Palavras chave: Mastite, Caprinocultura, Antimicrobianos.

ABSTRACT

Goat farming is one of the fastest growing forms of animal husbandry in Brazil, especially in semi-arid regions, as it is easily accessible and has low maintenance costs. Even with advances in breeding, there are still doubts about the compression of hygienic management in dairy goats and its clinical consequences. Mastitis is one of the conditions that most affect dairy animals in the country, being characterized by a localized or generalized inflammation of the mammary gland, caused by possible errors in management and erroneous treatment not monitored by professionals in the field, and can also identify possible future resistance. antibiotics and consequently more complex treatments. This study aims to report a case of clinical mastitis caused by the bacterium *Burkholderia thailandensis* in a goat. Milk samples were collected from Saanen goats in a commercial herd in the municipality of Conde, PB. The dark bottom mug test was used to identify lumps in the milk before collection, followed by manual collection after antiseptic of the teat ostium, the milk was stored and refrigerated for microbiological analysis. The sowing was done in Petri dishes containing Bloodwater, enriched with 5% sheep blood, kept in incubation for a period of 48 hours at a temperature of 37.2°, with readings being taken every 24 hours for morphological determination. of the colonies. The initial evaluation involved the Gram technique, to determine the shape and structure of the bacteria, then the isolate was transferred to Petri dishes containing Mueller Hinton Agar, and sent to the Clínica do Leite in Piracicaba – SP, where identification was made. using the MALDI-TOF mass spectrophotometry method, an antimicrobial sensitivity profile was created in parallel, assessed through an antibiogram, testing 10 drugs. The results were positive for *Burkholdeira thailandensis*. This bacteria has not yet been identified in mastitis caused in Brazil. Understanding the importance of identification techniques as well as the similarity of sanitary management and milking hygiene is of paramount importance for the control of mastitis and the emergence of resistance to antibiotics used early.

Keywords: Mastitis, Goat farming, Antimicrobials.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** (A e B) Grumos presentes em amostras de leite caprino.....12
- Figura 2-** Colônias de bactérias em amostra de leite caprino após semeadura de 24 horas.....13
- Figura 3-** (A) Isolamento para envio de bactérias, (B) Bactérias em formato de bastonete.....14
- Figura 4-** Placa de antibiograma contendo *Bukholderia thailandensis* encontrada em amostra de leite caprino.....15

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
2	RELATO DE CASO.....	11
	2.1 Histórico e Exames Clínicos.....	11
	2.2 Diagnóstico.....	12
	2.3 Tratamento.....	12
	2.4 Exames Complementares.....	13
	2.5 Maldi-Tof.....	13
	2.6 Teste de Resistência.....	14
3	DISCUSSÃO.....	16
4	CONCLUSÃO.....	18
	REFERÊNCIAS.....	19

1 INTRODUÇÃO

Com o crescente interesse na criação de ovinos e caprinos, os estudos relacionados ao bem-estar animal principalmente da sua matéria-prima que é o leite e seu manejo adequado, vêm tomando grande rumo, em essencial nas regiões semiáridas do Brasil. A caprinocultura leiteira é uma das atividades mais praticadas na área, tendo noção de que é de boa rentabilidade e de baixo custo, não necessitando de altos investimentos e de grandes áreas para sua consolidação.¹

O crescimento destinado a caprinocultura, mesmo tendo grande importância em algumas regiões do Brasil, ainda se tem dúvidas sobre a alta frequência de problemas sanitários e manejos inadequados, proporcionando uma diminuição da produtividade e por fim, ocasionando perdas econômicas. A mastite, é um dos problemas que mais acometem animais leiteiros, e se caracteriza por uma inflamação da glândula mamária, ocasionado por traumas ou por processos infecciosos, causando alterações nas características físico-químicas do leite.²

A mastite, dependendo da causa e da gravidade, irá se fazer necessário o uso de anti-inflamatórios e sendo de caráter infeccioso, será indispensável a aplicação de antibióticos. Todas as recomendações para o uso de medicamentos, deve ser de responsabilidade do médico veterinário, que indicará a posologia correta. O uso indiscriminado e a automedicação dos animais acometido não só pela mastite, mas por qualquer outro quadro infeccioso, pode caracterizar a resistência bacteriana ao antibiótico, causando adversidades ao tratamento de alguns microrganismos.³

Os principais microrganismos causadores da mastite são divididos em agentes ambientais: *Streptococcus uberis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *Escherichia Coli*, e em agentes contagiosos, sendo eles: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Mycoplasma Sp*. A mastite pode ainda ser dividida em três graus dependendo da sua sintomatologia, o grau 1 apresenta apenas alterações no leite, como a formação de grumos, já o grau 2 é sintomático com presença moderada de fibrose na glândula mamária, e grau 3 quando o animal apresenta sinal sistêmico e perda funcional da glândula mamária. Embora a produção diária de leite caprino esteja em crescimento nas demais regiões do Brasil, principalmente no Nordeste, ainda se faz necessário o acompanhamento microbiológico do leite para se ter controle da qualidade da produção e para se evitar mastites tardias, assim como facilitar no tratamento do agente através de técnicas de identificação como o Maldi-Tof.⁴

A importância da identificação se dá pela facilidade da diferenciação de novas cepas causadoras de mastite, como é o caso da *Burkholderia thailandensis*. Se trata de uma bactéria Gram-Negativa em formato de bastonete, que pode ser encontrada principalmente em regiões tropicais e subtropicais, contaminando através do solo e água. Possui a morfologia parecida com a *Burkholderia pseudomallei*, porém se diferencia pela *Thailandensis* conseguir assimilar a L-Arabinose. Essa diferenciação é de suma importância para saber as causas e implementações de medicamentos específicos.^{5,7}

Esse trabalho teve como objetivo relatar um caso de mastite clínica em caprino causada por *Burkholderia thailandensis*, assim como destacar a importância da identificação de seus agentes causadores e dos impactos no tratamento de animais enfermos, além de ressaltar a importância do acompanhamento microbiológico do leite.

2 RELATO DE CASO

No dia 21 de agosto de 2023, no Conde, região metropolitana de João Pessoa na Paraíba, foi prestado atendimento a um produtor de caprinos que tem como foco a produção de leite, com destaque a alguns animais que apresentavam perca de produção de leite diária e sintomatologias semelhantes com a da mastite clínica. Logo, os animais foram separados em baias específicas para prosseguir com a anamnese. Se tratam de animais da raça Saanen, com idades entre 1,5 a 2 anos, com peso médio de 55kg e produção diária de 5 litros por dia, criadas em confinamento.

O produtor relatou que uma das cabras, durante a anamnese, apresentou aumento de volume mamário unilateral dos tetos, inapetência e relutância ao movimento. O mesmo ainda informou ter percebido o leite com aspecto grumoso e com cheiro forte, que o animal vivia confinado em baias estilo plataformas elevadas, com piso de madeira. A limpeza era feita 1 vez por dia, e não faziam o uso do pré-dipping e pós-dipping na ordenha.

2.1 Histórico e Exames Clínicos

Na inspeção do animal, pode-se identificar um comportamento alerta, ausência de lesões pela pele e no teto, sem sinais de dor em outras regiões do corpo, a não ser a sensibilidade nos tetos. No exame físico, os parâmetros fisiológicos estavam alterados, com frequência cardíaca e respiratória elevadas (FC: 108 e FR: 60), mucosas hipocoradas, famacha 4, e linfonodos não reativos a palpação. No exame clínico, específico, foi observado aumento considerável da mama direita do animal, além da sensibilidade ao toque com sinais característicos de dor e inflamação, já apresentando fibrose localizada. No final do exame clínico foi feita uma antisepsia do óstio do teto para a coleta de uma amostra de leite, onde foram colocadas em tubos de coleta e realocadas em caixas de isopor refrigeradas, para seguir com um exame microbiológico.

Figura 1 – (A e B) Grumos presentes em amostra de leite caprino.



2.2 Diagnóstico

Após o relato do produtor e os exames visuais e semiológicos feitos no animal enfermo, suspeitou-se de mastite clínica bacteriana, levando em consideração as informações repassadas pelo produtor, a clínica apresentada pelo animal e a ausência do uso do pré-dipping e pós-dipping. A mastite foi considerada de grau 3, com presença de fibrose da glândula mamária. Após a identificação da enfermidade, foram solicitados exames complementares para se avaliar de forma quantitativa as bactérias no leite da cabra com mastite, e de outras do mesmo lote, afim de se evitar mastites futuras, e identificar o agente causador.

2.3 Tratamento

Após o diagnóstico, foi recomendado um tratamento prévio para combater os sintomas apresentados pelo animal. O antibiótico recomendado foi da classe dos Aminoglicosídeos, e a Gentamicina foi o de escolha, sendo administrado por um período de 3 a 5 dias. Um dia após o início do tratamento, o animal veio a óbito, tendo em vista que estava muito debilitado, parando a ingestão de água e alimento.

Após o diagnóstico e a instrução do tratamento, o exame complementar foi ressaltado com o objetivo de ter a ciência do que estava acometendo aquele animal. Como exame complementar, foi indicado o perfil microbiológico do leite, onde inicialmente se faz a coleta do leite, e a posterior cultura, identificando a presença significativa ou não de bactérias na amostra.

2.4 Exames Complementares

O exame microbiológico avalia de forma quantitativa a presença de microrganismo no leite, mas também avalia o risco que o produto pode apresentar para a saúde do consumidor. Para fazer a avaliação utilizou-se placas contendo Ágar Sangue, após a semeadura do leite na placa, a mesma é colocada na estufa por um período de até 48 horas numa temperatura constante de 37.2°C, a leitura é feita a partir de 24 horas após a entrada da placa na estufa, avaliando o desenvolvimento do microrganismo na placa, assim como seu formato e tipo de hemólise.

Figura 2 – Colônias de bactérias em amostra de leite caprino após semeadura de 24 horas.



2.5 Maldi-Tof

Após a comprovação da existência de potenciais microrganismos no leite do animal, foi então recomendado a identificação do agente causador através da técnica de MALDI-TOF.

O MALDI-TOF é uma técnica de ionização branda utilizada em espectrometria de massa, permitindo a análise de biomoléculas e grandes moléculas orgânicas, constatando a identificação do agente.

O microrganismo foi isolado em placas contendo Ágar Mueller Hinton, e enviadas para a clínica do leite em Piracicaba, localizada no estado de São Paulo-SP.

Dias após a chegada do microrganismo, os resultados foram enviados, mostrando que a mastite foi causada por uma bactéria incomum, chamada de *Burkholderia thailandensis*.

Figura 3- (A) Isolamento para envio de bactérias, (B) Bactéria em formato de bastonete.



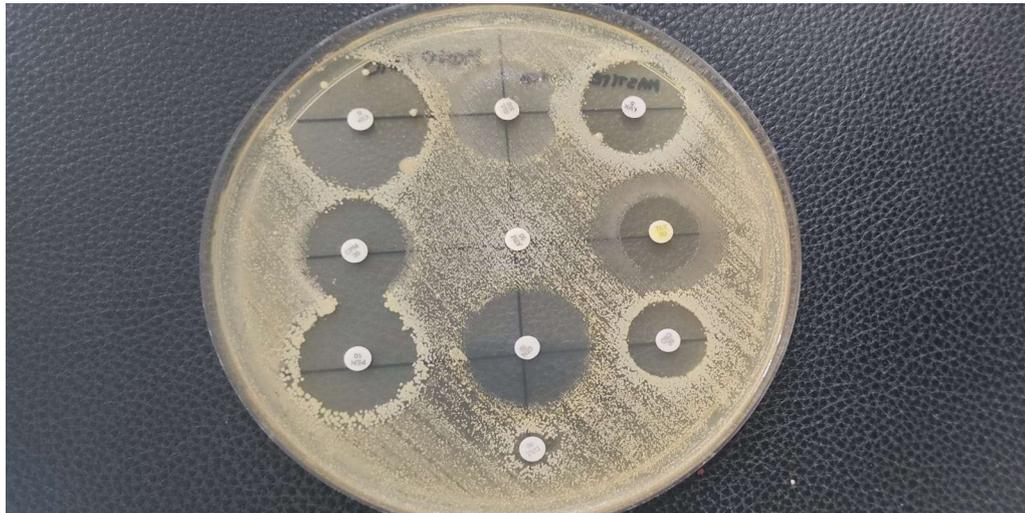
2.6 Teste de Resistência

Após a identificação do agente causador, iniciou-se um teste de antibiograma a alguns antibióticos selecionados, pois, como se tratava de uma bactéria desconhecida em relação a contaminações em animais, necessitou de uma avaliação de susceptibilidade a antibióticos.

Foram utilizados 10 antibióticos, sendo eles: Penicilina, Azetronam, Ceftazidima, Ceftriaxona Levofloxacino, Tetraciclina, Ciprofloxacino, Sulfonamidas, Cefepima e Gentamicina. Esses antibióticos foram usados levando em consideração por fazerem parte de uma gama de antimicrobianos usados de forma rotineira, como também, fazem parte do grupo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), usado em estudos de resistência.

O Antibiograma foi feito em uma placa de Mueller Hinton, usando os 10 antibióticos já citados, após a confecção da placa e a semeadura com o agente *Burkholderia thailandensis*, a mesma foi posta na estufa bacteriológica, sendo feitas leituras em 24 e 48 horas.

Figura 4 – Placa de antibiograma contendo *Burkholderia Thailandensis* encontrada em amostra de leite caprino.



3 DISCUSSÃO

A *Burkholderia thailandensis* é uma bactéria do complexo *Burkholderia*, onde se encontram exemplares bem conhecidos, como é o caso da *Burkholderia mallei*, causadora do Mormo em equinos, e a *Burkholderia pseudomallei*, causadora da Melioidose. Essa bactéria é um bacilo Gram-negativo, móvel, não fermentador, que comumente pode ser encontrado no solo e na água, estando associada a climas tropicais ou subtropicais, se trata de uma bactéria descoberta recentemente nos anos de 1998, fazendo com que seus estudos relacionados a infecções em animais sejam recentes.⁵

Essa bactéria pode ser facilmente confundida com a *Pseudomallei*, visto que compartilha de características parecidas, como sua forma, tipo de replicação intracelular e também são causadoras de fusão celular, fazendo com que células hospedadas por esse complexo fiquem multinucleadas e de tamanho avantajado, uma das características que a diferenciam é a mortalidade, sendo a *Pseudomallei* mais periculosa, e a capacidade da *Thailandensis* de assimilar a L-Arabinose.^{5,6}

As infecções envolvendo a *Burkholderia thailandensis*, são de caráter accidental, a maioria dos casos foi em humanos que estavam propícios a alguma porta de entrada, sendo assim, relacionada a uma infecção traumática e oportunista. As formas de diagnóstico estão associadas ao PCR, porém, por ter características semelhantes à *Pseudomallei*, o diagnóstico pode ser errôneo e ter um desvio de medicamentos para o tratamento devido à quantidade de cepas existentes. Para um diagnóstico mais preciso, é recomendado a identificação por técnica de MALDI-TOF, se tratando de um equipamento de espectrometria de massa, sendo facilmente diferenciadas as cepas e grupos dessa família.⁷

Infecções causadoras de mastite, associado a *Burkholderia thailandensis*, até então não foram computadas, devido à baixa quantidade de informações de contaminação em animais. Segundo os estudos, a *Burkholderia thailandensis* é uma bactéria considerada não patogênica, desde que a exposição a mesma seja baixa, altas cargas destes microrganismos podem causar reações adversas envolvendo principalmente o sistema respiratório.⁸

Já foram relatados casos em humanos no Brasil, Estados Unidos e China. Os pacientes apresentavam tosse, pneumonia e nos piores casos, sepse, podendo até vir a óbito. Os tratamentos são feitos com Meropenem e em alguns casos a Cefotaxima. Na China, em 2013, um paciente veio a óbito 6 dias após o início do tratamento, sendo o diagnóstico positivo para *Burkholderia pseudomallei*, alguns dias após a correção dos

testes, foram encontradas cepas de *Burkholderia thailandensis*, mostrando a importância do uso da técnica de MALDI-TOF, sendo vantajoso para identificação e diferenciação das cepas.⁹

Após a identificação de microrganismos, a técnica de antibiograma se faz apta para o sucesso de um tratamento, principalmente envolvendo bactérias de descobertas recentes, ou de novas cepas. Após a identificação da bactéria envolvendo mastite no caprino, um antibiograma foi feito, com antibióticos usados na rotina médica de ruminantes, assim como também no tratamento de mastites. Antibióticos CLSI também foram selecionados de acordo com.¹⁰ Os antibióticos usados foram: Penicilina, Azetronam, Ceftazidima, Ceftriaxona, Levofloxacino, Tetraciclina, Ciprofloxacino, Sulfonamidas, Cefepima e Gentamicina.

Os resultados mostraram a sensibilidade a 8 antibióticos usados, sendo eles: Penicilina, Ceftriaxona, Levofloxacino, Tetraciclina, Ciprofloxacino, Sulfonamidas, Cefepima e Gentamicina. E sendo resistente aos seguintes antibióticos: Azetronam e Ceftazidima.

Vale ressaltar que não foram relatados casos de *Burkholderia thailandensis* causando mastite em animais de produção, sendo esse o primeiro caso relatado de mastite clínica em caprinos causada por essa bactéria. Os estudos acerca da epidemiologia de infecções intramamárias por bactérias emergentes são de muita importância, principalmente por ser facilmente confundida com outra das mesmas famílias, assim como usar técnicas de maior sensibilidade para sua identificação. O antibiograma também é muito relevante, visto que as bactérias são moldáveis a estresses ambientais e podem criar formas de resistência a medicamentos, tornando-os inviáveis em infecções causadas pela *Burkholdeira thailandensis*.

4 CONCLUSÃO

Este trabalho relata o primeiro caso de mastite clínica causada pelo complexo *Burkholderia*, sendo identificada e diferenciada pelo teste de espectrometria de massa, mostrando a importância do uso do MALDI-TOF na diferenciação e identificação de bactérias que possuem características análogas ao de sua família, facilitando a escolha de antibióticos específicos e ajudando no tratamento de animais enfermos, evitando o aparecimento de resistência bacteriana por usos incorretos de antimicrobianos.

Compreender as diferentes técnicas de identificação acerca de novos microrganismos, é de suma importância para a diferenciação de novas espécies causadoras de mastite. Assim como a associação com o manejo sanitário, biossegurança dos ordenadores e o uso do pré-dipping e pós-dipping na ordenha.

REFERÊNCIAS

- 1- Aragão BB, Trajano SC, Mota RA. Staphylococcus spp. Multirresistente em leite cabra: um sério problema de saúde única. Medicina Veterinária (UFRPE) Recife, v.16, n.2 (abr-jun), p.136-151, 2022. DOI: <https://doi.gov/10.26605/medvet-v16n2-5224>.
- 2- Santos júnior. DA, Matos RAT, Melo DB, Garino júnior F, Simões SVD, Miranda neto EG. Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de cabras com mastite no sertão e cariri paraibano. Cienc. Anim. Bras., Goiânia, v.20, 1-11, 2019. DOI:10.1590/1089-6891v20e-44848
- 3- Speroni G, Santos EM, Cezar AS. Agentes etiológicos mais comumente envolvidos nas mastites ovinas: uma revisão. In: XXIX SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2021.
- 4- Souza AS, Carvalho TS, Santos IOS, Pereira KAS, Silva VB. Mastite em caprinos leiteiros. Research, Society and Development, v.12, 2023. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v12i12.43999>
- 5- Garcia EC, Cotter PA. Burkholderia thailandensis: Growth and laboratory maintenance. Curr. Protoc. Microbiol.2016; 1.1-4C.1.7 doi: 10.1002/cpmc.15
- 6- Miralles IS, Maciel MCA, Angelo MRF, Gondini MM, Frota LHF, Reis CMF. & Hofer E. - Burkholderia pseudomallei: a case report on a human infection in Ceará, Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 51-54, 2004.
- 7- Gee JE, Elrod MG, Gulvik CA, Haselow DT, Waters C, Liu L, Hoffmaster, AR. Burkholderia thailandensis Isolated from Infected Wound, Arkansas, USA. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • V.24, N.11, November 2018. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2411.180821>

- 8- Pilátova M, Dionne MS. *Burkholderia thailandensis* Is Virulent in *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0049745

- 9- Chang K, Luo J, Xu H, Li M, Zhang F, Li J, Gu D, Deng S, Chen M, Lu W. Human Infection with *Burkholderia thailandensis*, China, 2013. Emerging Infectious Diseases • www.cdc.gov/eid • V.23, N.8, August 2017. doi: <https://doi.org/10.3201/eid2308.170048>

- 10- Johnson WM, Clark JÁ, Olney K, Burgess DR, Burgess DS. Changing times: The impact of gram-negative breakpoint changes over the previous decade. Antimicrobial Stewardship & Healthcare Epidemiology, 2, e165, 1–4. 2022. DOI:10.1017/ash.2022.301.