



VI CONGRESSO PERNAMBUCANO
DE MEDICINA VETERINÁRIA
VII SEMINÁRIO NORDESTINO
DE CAPRINO-OVINOCULTURA

09 a 11 de setembro de 2015, Campus da UFRPE – Dois Irmãos, Recife

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO E ESTRATÉGIAS DE CONTROLE DO MORMO NO BRASIL

Diagnostic methods and control strategies of Glanders in Brazil

Roberto Soares CASTRO¹

Resumo: O Mormo é uma zoonose causada pela bactéria *Burkholderia mallei* que afeta equídeos. Após sua reemergência no Brasil a doença tem sido notificada em praticamente todo território nacional. A estratégia de controle instituída pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA) envolve o teste para controle de trânsito e de eventos de aglomeração de equídeos, bem como interdição e saneamento dos focos detectados. Essas medidas são baseadas nos resultados de testes sorológicos realizados por laboratórios privados credenciados pelo MAPA ou por laboratórios oficiais do MAPA. A fixação do complemento (FC) é o teste prescrito como triagem e o western blotting (WB) como prova confirmatória. Os principais gargalos para o diagnóstico do mormo no Brasil são a dependência tecnológica, a qualidade de certos antígenos, bem como as limitações do teste de triagem (FC), com baixa sensibilidade (Se) e especificidade (Sp), além da subjetividade do WB. Como alternativa, desenvolvemos um ELISA indireto (ELISAI) empregando antígeno de amostras de *B. mallei* isoladas no Brasil (Kit diagnóstico Mormo ELISAI; MAPA Licença nº: 10.080/2015). O teste apresentou Se e Sp de 98,76% e 99,65%, respectivamente. O Kit será submetido à validação internacional (OIE-Tender ref. AD/SR/2015/1885). A próxima etapa para concluir a validação no Brasil é a realização de provas de reprodutibilidade. Espera-se que, cumprida essa etapa, o ELISAI seja incluído no Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos como teste oficial para diagnóstico sorológico do mormo.

Termos para indexação: ELISA, Fixação do complemento, western blotting, MAPA, OIE.

¹ Médico Veterinário, Professor Associado do Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE. Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos. CEP: 52171-900, Recife, PE. Acadêmico titular da Academia Pernambucana de Medicina Veterinária. robertosoarescastro@gmail.com

Abstract

Glanders is a zoonotic disease caused by *Burkholderia mallei* that affects equidae. After its re-emergence in Brazil the disease has been reported in almost all country. The control strategy established by the Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (MAPA) involves statutory testing for equidae traffic control, movement restrictions and culling of positive animals from the detected outbreaks. These measures are based on the results of serological tests performed by private laboratories accredited by MAPA or by official MAPA laboratories. The complement fixation (CF) test is prescribed as screening and western blotting (WB) as a confirmatory test. The major problems for the diagnosis of glanders in Brazil are technological dependence, the quality of certain antigens, as well as the limitations of the screening test (CF), with low sensitivity (Se) and specificity (Sp), and the subjectivity of the WB. Alternatively, we have developed an indirect ELISA (ELISAI) employing antigens of *B. mallei* isolated in Brazil (Diagnostic kit – Glanders iELISA; MAPA License n: 10.080/2015). The ELISAI showed Se and Sp of 98.76% and 99.65%, respectively. The Kit will be submitted to international validation (OIE-Tender ref. AD/SR/2015/1885). The next step to complete the validation in Brazil is the conduction of reproductibility assay. Then it is expected that the ELISAI will be included in the Equidae National Health Program as official test for serological diagnosis of glanders.

Index terms: ELISA, complemente fixation, western blotting, MAPA, OIE.

O Mormo é uma zoonose causada pela bactéria *Burkholderia mallei* que afeta principalmente equídeos causando hipertermia, sinais respiratórios e lesões cutâneas. A doença geralmente é de evolução aguda em asininos e muares, porém crônica em equinos, com evolução em poucos dias a anos. O mormo é conhecido há vários séculos e foi considerada extinta do Brasil em 1968. Em 2000 o Prof. Rinaldo Aparecido Mota da UFRPE e sua equipe relataram a reemergência da doença ao isolarem *B. mallei* e descreverem os aspectos epidemiológicos, sorológicos e clínico-patológicos do mormo em focos nos Estados de Pernambuco e Alagoas (MOTA et al, 2000). A classificação das amostras de *B. mallei* isoladas no Brasil foi confirmada em um amplo estudo com marcadores genéticos, envolvendo 44 cepas de *B. mallei* e 32 de *B. pseudomallei* isoladas em mais de 20 países (SCHMOOCK et al., 2009). Atualmente o mormo está distribuído em praticamente todo território nacional.

As fontes mais comuns de infecção por *B. mallei* são alimentos ou água contaminados por exsudatos eliminados do trato respiratório ou de lesões cutâneas ulceradas de animais infectados. A

transmissão da bactéria entre os animais ocorre por contato direto ou indireto, principalmente pela ingestão de água e alimentos contaminados e inalação de partículas em suspensão. A transmissão é facilitada pela alta densidade populacional, inadequadas condições de higiene e estresse dos animais. O fluxo de portadores assintomáticos para comercialização, reprodução e práticas esportivas é a mais importante forma de disseminação da doença entre as criações (KHAN et al., 2013).

A prevenção e o controle do Mormo dependem de programas sanitários específicos, com detecção precoce dos animais infectados, eliminação humanitária dos positivos, rigoroso controle de trânsito animal, isolamento e higienização das instalações e utensílios da criação afetada.

No Brasil as ações de vigilância e defesa sanitária dos equídeos são coordenadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, por meio do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos – PNSE, instituído pela INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 17, DE 8 DE MAIO DE 2008 (MAPA, 2008). O PNSE visa ao fortalecimento do complexo agropecuário dos equídeos, por meio de ações de vigilância e defesa sanitária animal, através das seguintes atividades: I - educação sanitária; II - estudos epidemiológicos; III - controle do trânsito; IV - cadastramento, fiscalização e certificação sanitária; e V - intervenção imediata quando da suspeita ou ocorrência de doença de notificação obrigatória. As ações previstas no PNSE em cada unidade da federação são de responsabilidade das respectivas Secretarias de Agricultura ou agências de defesa agropecuária.

Como a principal forma de propagação do mormo entre as criações é o fluxo de animais infectados, o controle de trânsito dos equídeos é fundamental para sua prevenção. De acordo com a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 24, DE 5 DE ABRIL DE 2004 (MAPA, 2004), que estabelece as normas para controle e erradicação do Mormo no Brasil, as principais medidas são o controle de trânsito e de eventos de aglomeração de equídeos, bem como o saneamento dos focos detectados. Todas as medidas são baseadas nos resultados de testes sorológicos realizados por laboratórios privados credenciados pelo MAPA ou por laboratórios oficiais do MAPA.

O período de incubação do Mormo varia de alguns dias a vários meses, dependendo da via de infecção, intensidade da exposição e fatores intrínsecos do hospedeiro. Por isso, o diagnóstico laboratorial é essencial para dar apoio às medidas preventivas e de controle da doença. Os testes sorológicos são os mais práticos para diagnóstico em larga escala. O teste sorológico para diagnóstico do Mormo preconizado para trânsito internacional de equídeos é a Fixação do Complemento (FC), porém os ensaios imunoenzimáticos (*Western Blotting*-WB e ELISA), também são considerados adequados para dar suporte às medidas de controle e para a realização de inquéritos epidemiológicos (OIE, 2013).

A prova sorológica de FC, realizada em laboratório oficial ou credenciado pelo MAPA, conforme a referida Instrução Normativa, é o teste prescrito para o diagnóstico do mormo no Brasil.

Mais recentemente o WB passou a ser adotada como prova confirmatória. O WB empregado foi desenvolvido na Alemanha (ELSCHNER et al., 2011). Apesar de ser a FC o teste recomendado pela OIE (2013), sua sensibilidade (Se) e especificidade (Sp) têm sido questionadas, mesmo nos países que conseguiram erradicar a doença. Resultados de trabalhos recentes demonstram que há variação no desempenho da FC para diagnóstico do mormo, dependendo do antígeno utilizado, da situação epidemiológica da população onde as amostras são colhidas para o teste (endêmica x livre) e o laboratório onde os testes são realizados.

Para adequada avaliação de um teste de diagnóstico, com base na Se e na Sp, é fundamental a existência de critérios seguros de classificação dos indivíduos que compõem a amostra em verdadeiro-positivos e verdadeiro-negativos. No caso da avaliação de testes sorológicos para diagnóstico do mormo, a definição de verdadeiro-negativo mais frequentemente empregada, e bastante consistente, é animais originários de área livre da doença. Por outro lado, em todos estudos, há grande dificuldade de adotar um critério de classificação de verdadeiro-positivo que se aproxime da situação real, observada em condições naturais da infecção. No geral os critérios levam em consideração a presença de sinais clínicos e/ou sorologia positiva e/ou isolamento bacteriano. Isto resulta em um importante viés de seleção dos casos positivos com consequente superestimativa do cálculo da Se. Só para ilustrar, é bem sabido que, particularmente na infecção de equinos, predominam os casos crônicos assintomáticos, que deve ser a mais frequente em uma área endêmica. Infecção crônica pode resultar em baixos títulos de anticorpos, sobretudo em animais com bom equilíbrio orgânico e eficiente imunidade celular. Por ser de difícil caracterização/detecção com os recursos atuais de diagnóstico, esse tipo de animal não tem sido incluído nos trabalhos publicados de avaliação dos testes para diagnóstico do mormo, resultando em importante viés de seleção de amostras. Uma alternativa para compensar essa dificuldade é avaliar o teste considerando, adicionalmente, os resultados de testes seriados em rebanhos endêmicos.

Embora a prova de FC seja bastante antiga para diagnóstico do mormo, só recentemente foram feitos estudos comparando o desempenho do teste realizado com diferentes antígenos comercialmente disponíveis e em diferentes situações epidemiológicas. Testes de FC empregando antígenos CIDC (Holanda), c.c.pro (Alemanha) e USDA (USA) apresentaram, respectivamente, Se de 100%, 99,39% e 62,19%, e Sp de 97,5%, 96,5% e 100% (KHAN et al., 2011). Em outro estudo, empregando o WB como teste de referência, os testes de FC com antígenos c.c.pro e CIDC apresentaram 100% de Se; as Sp foram de 77,45% (antígeno CIDC) e 75,71% (antígeno c.c.pro) para os testes com soro de uma área endêmica, e 93,75% (CIDC) e 94,79% (c.c.pro) para os soros da área livre (KHAN et al., 2012). No Brasil, Silva (2014) comparou o desempenho da FC empregando os antígenos c.c.pro e USDA frente ao WB. Foram testadas no Lanagro-PE 456 amostras séricas de animais de propriedades dos Estados de Pernambuco, Ceará, Distrito Federal, São Paulo, Espírito

Santo e Paraná com histórico de mormo e/ou submetidas à vigilância através da abertura de foco pelas Secretarias de Defesa Animal (SDA). A Se da FC utilizando o antígeno USDA foi de 14,5%, enquanto que utilizando o antígeno c.c.pro foi de 28,3%, em relação ao WB. A Sp da FC com o antígeno c.c.pro foi de 93,1% e a do antígeno USDA foi de 94,1%.

Como é bem conhecido, resultados falso-negativos no teste podem levar à introdução do agente infeccioso em áreas ou rebanhos livres; resultados falso-positivos podem levar ao sacrifício de animais sadios e a restrições desnecessárias ao comércio e trânsito de animais, com perdas financeiras para os criadores.

Com base na análise do desempenho dos testes sorológicos não é difícil inferir que o uso de um teste de baixa Se como a FC realizada no Brasil, não pode contribuir consistentemente para o controle do mormo. Ao contrário disso, pode até facilitar a propagação da doença, pois causa nos criadores a falsa ideia de que estão lidando com animais verdadeiro-negativos para a doença, levando-os a relaxar com as medidas de biossegurança, como a quarentena de animais recém-adquiridos, ou a ter maior permissividade do contato entre animais durante eventos com aglomeração de equídeos. Além disso, apenas parte dos animais verdadeiro-positivos são eliminados durante o saneamento dos focos do mormo. Os falso-negativos permanecem no rebanho mantendo o agente endêmico e transmitindo-o para os animais sadios. A principal consequência do protocolo usado para definição de caso (positivos na FC e confirmados no WB) é a grande dificuldade de sanear um rebanho afetado pelo mormo. Infelizmente, esta é a realidade de muitos rebanhos brasileiros que estão interditados há meses ou anos, sem sucesso no processo de saneamento.

Alternativamente à FC outros testes mais sensíveis e específicos seriam altamente desejáveis para o diagnóstico do mormo. Atualmente três ELISAs indiretos (ELISAI) estão em fases variadas de validação. A seguir estão descritos, resumidamente, os ELISAs que farão parte de um projeto de validação internacional para diagnóstico sorológico do mormo, aprovado pela OIE (OIE - INTERNATIONAL CALL FOR TENDER - Tender ref.: AD/SR/2015/1885) sob a coordenação do Laboratório de Referência da OIE para o mormo (Reference Laboratory for Glanders – Friedrich Loeffler Institute, Germany):

1) ELISAI desenvolvido a partir de uma fração antigênica de *B. mallei* (LAROUCAU et al., 2014).

Os resultados preliminares mostram uma boa Sp e Se do teste. A Sp, calculada com 485 soros de áreas livres de mormo, foi de 98,8%. Uma ligeira adaptação do ponto de corte pode melhorar a Sp para 99,6%. Não foi feita avaliação da Sp analítica.

2) ELISAI usando proteínas recombinantes de *B. mallei* expressas em *Escherichia coli* (SINGHA et al, 2014).

Para avaliação do teste foram empregadas amostras positivas (n=40), negativas (n=30) e de campo (n=1.811). O teste apresentou Se de 100% e Sp de 99,7% em comparação com a FC. A Sp analítica foi avaliada com base no teste de soros de humanos afetados por melioidose (n=6) e de 14 soros de equinos infectados por *Streptococcus equi* subspécies *equi* (n=5), *Streptococcus equi* subspécie *zooepidemicus* (n=5) e *Pseudomonas aeruginosa* (n=5). Todos soros reagiram negativamente no ELISAI.

3) ELISAI para diagnóstico do mormo empregando antígeno semi-purificado de amostras de *B. mallei* isoladas no Brasil (Kit diagnóstico Mormo ELISAI; MAPA Licença nº: 10.080/2015).

Para avaliação do ELISAI foram empregadas amostras positivas (n=162), negativas (n=1.115), de animais de trânsito (n=3.096), de um inquérito soro-epidemiológico (n=4.499) e de dois rebanhos endêmicos monitorados por mais de um ano (n=394). O teste apresentou Se e Sp de 98,76% e 99,65%, respectivamente. A Sp analítica foi avaliada por meio do teste de 32 equinos vacinados contra Encefalomielite Equina Leste e Oeste, Influenza Equina (3 cepas), Herpesvírus equino tipos 1 e 4, tétano e 13 serovares de *Leptospira interrogans*. Todos apresentaram resultado negativo.

O Kit diagnóstico Mormo ELISAI apresenta as seguintes características: plataforma tecnológica internacionalmente aceita – ELISA; possibilidade de automação parcial ou total (robotização); disponibilidade de insumos nacionais; uso de cepas de *B. mallei* de origem brasileira; e teste das principais espécies susceptíveis.

Desde a descrição da reemergência do mormo no Brasil (MOTA et al., 2000), a doença vem sendo notificada de forma progressiva nas diversas unidades federativas. Atualmente afeta quase todo território nacional. Como a estratégia adotada pelo MAPA prevê apenas a vigilância passiva, com teste de animais de trânsito interestadual ou participantes de aglomeração, a detecção de focos fica condicionada a esse grupo de animais, resultando em subestimativa da real situação epidemiológica do mormo no país. Assim, a dimensão do problema parece ser muito maior do que os dados oficiais indicam.

Seja qual for a estratégia adotada em um programa sanitário para controle do mormo, um ponto crucial para o sucesso é o diagnóstico laboratorial, inclusive para realizar inquéritos sorológicos para conhecer a real prevalência da doença no território nacional. Atualmente o país conta com uma rede para diagnóstico do mormo, formada por laboratórios privados credenciados pelo MAPA e oficiais.

Os principais gargalos para o diagnóstico do mormo no Brasil são a dependência tecnológica, a qualidade de certos insumos, bem como as limitações do teste de triagem (FC), com baixa sensibilidade e especificidade, além da subjetividade do WB, de difícil repetibilidade e

reprodutibilidade. Outro ponto importante que pode afetar o desempenho dos testes sorológicos é a similaridade, ou não, das cepas usadas na produção dos antígenos com as cepas circulantes na população. As cepas usadas para produção dos antígenos empregados na FC e WB no Brasil são as seguintes:

- 1) Antígeno FC USDA, Estados Unidos – *B. mallei* (cepa chinesa, isolada na II Guerra mundial).
- 2) Antígeno FC cc-pro GmbH, Alemanha – *B. mallei* (cepas Borgor – Indonésia, Mukteswar – Índia, e Zagreb - Iugoslávia).
- 3) Antígeno WB cc-pro GmbH, Alemanha – *B. mallei* (mesmas cepas FC).

Será que essas cepas são homólogas às que circulam no Brasil?

Considerando que a composição antigênica dos insumos para diagnóstico sorológico é determinante para a especificidade e a sensibilidade dos testes, cabe uma questão: porque o MAPA tem prescrito testes com esses antígenos? Adicionalmente, outra questão relevante: porque só recentemente foi desenvolvido um produto nacional - ELISAI?

Há de se considerar que o MAPA nos diversos momentos de decisão para enfrentamento do problema da reemergência do mormo não tinha alternativas a não ser dispor dos meios diagnósticos disponíveis em outros países, como USA e Alemanha, que, mesmo livres da doença mantiveram suas pesquisas e desenvolveram os insumos acima descritos. Por outro lado, a falta de demandas claras de pesquisa em cooperação entre o MAPA, universidades, institutos de pesquisa e empresas resultaram no desenvolvimento de pesquisas que não foram convertidas em solução objetiva do problema central – falta de um produto nacional para diagnóstico do mormo. Assim, permanecemos todos esses anos dependentes dos países produtores dos insumos, característica típica dos países de economia periférica.

A base para o desenvolvimento do Kit diagnóstico Mormo ELISAI foi o projeto “Desenvolvimento de kits de diagnóstico do Mormo: Teste imuno-alérgico (PPD-Maleína) e sorológico rápido” (Proc APS-0065-5.05/08/CHAMADA PÚBLICA FACEPE Nº 04/2008), do Programa de Apoio a Pesquisa em Empresas (PAPPE) financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pela Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI). A empresa proponente foi a Indústria e Comércio de Produtos Biotecnológicos LTDA (Biovetch). A execução foi feita em colaboração com o Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, laboratório de Bacterioses animais, coordenado pelo Prof. Rinaldo Aparecido Mota.

Apesar do projeto ser concluído em 2010, os resultados só foram publicados em 2012. O ELISAI mostrou praticamente 100% de concordância com a FC (Teles et al., 2012). O

desenvolvimento do produto foi suspenso pela empresa, pois na época a OIE não preconizava o ELISA como teste para diagnóstico do mormo, o que só foi feito na edição de 2013 do “Terrestrial Manual” (OIE, 2013). A retomada do desenvolvimento do produto ocorreu por uma demanda feita pelo Dr Jorge Caetano Junior, da CGAL/MAPA, durante o Simpósio Nacional de Integração em Ciência, Tecnologia e Gestão Pública (30 anos do Lanagro-MG), em 12 de agosto de 2013, organizado pelo INCT Pecuária (CNPq) e Lanagro-MG (MAPA), coordenado pelo Prof. Rômulo Cerqueira Leite, da UFMG.

Como já estava implantado o WB no Lanagro-PE foi feito um estudo comparando o ELISAI (Teles et al., 2012) com o WB, que mostrou desempenho ligeiramente superior à FC realizada com antígeno cc-pro GmbH, com Se de 35,5% e Sp de 97,6%, porém muito inferior ao WB (SILVA, 2014). Diante desses resultados a empresa revisou o processo de produção dos antígenos e elaborou novas formulações antigênicas que resultaram na obtenção de um ELISAI altamente sensível (98,76%) e específico (99,65%), licenciado pelo MAPA como “Kit diagnóstico Mormo ELISAI” (MAPA Licença nº: 10.080/2015).

O Kit diagnóstico Mormo ELISAI será submetido à validação internacional (OIE - INTERNATIONAL CALL FOR TENDER - Tender ref.: AD/SR/2015/1885). A próxima etapa para finalização da validação no Brasil é a realização de provas de reprodutibilidade entre laboratórios credenciados pelo MAPA e laboratórios oficiais. Espera-se que, cumprida essa etapa, o ELISAI seja incluído no PNSE como teste oficial para diagnóstico sorológico do mormo.

Referências bibliográficas

Elschner MC, Scholz HC, Melzer F, Saqib M, Marten P, Rassbach A, Dietzsch M, Schmoock G, de Assis Santana VL, de Souza MM et al: Use of a Western blot technique for the serodiagnosis of glanders. *BMC Vet Res*, 7:4, 2011.

Khan, I. L. H. Wieler, F. Melzer, M. Gwida, V. L. de. A. Santana, M. M. A. de Souza, M. Saqib, M. C. Elschner, H. Neubauer. Comparative evaluation of three commercially available complement fixation test antigens for the diagnosis of glanders. *Veterinary Record* published online September 6., doi: 10.1136/vr.d5410. 2011.

Khan, Iahtasham; Mandy C. Elschner, Falk Melzer, Mayada Gwida, Lothar H. Wieler, Riasat Ali, Muhammad Saqib, Heinrich Neubauer. Performance of complement fixation test and confirmatory immunoblot as two-cascade testing approach for serodiagnosis of glanders in an endemic region of South East Asia. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 125, Heft ¾, Seiten 10–14. 2012.

Khan, I.; Wieler, L. H.; Melzer, F.; Elschner, M. C.; Muhammad, G.; Ali, S.; Sprague, L. D.; Neubauer, H.; Saqib, M. Glanders in Animals: A Review on Epidemiology, Clinical Presentation, Diagnosis and Countermeasures. *Transboundary and Emerging Diseases*. v. 60, p. 204–221, 2013.

Laroucau K BC, Roche M, Donnet F, Colaneri C, Dias Falcão M, Madani N, Zientara S, Pourquier P, Lucia Santana V, Saqib M, Comtet L. A new ELISA assay for Glanders diagnosis. III Pan - American Congress of Zoonoses, 4-6/06/014, La Plata, Argentina 2014, Poster.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 24, DE 5 DE ABRIL DE 2004. Aprova as normas para controle e erradicação do Mormo.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 17, DE 8 DE MAIO DE 2008. Institui o Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos, no âmbito do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Mota R.A., Brito M.F., Castro F.J.C. & Massa M. Mormo em equídeos nos Estados de Pernambuco e Alagoas. *Pesq. Vet. Bras.* v.20, n.4, p.155-159, 2000.

OIE – World Animal Health Organization. *Terrestrial Manual*. Chapter 2.5.11. — Glanders. 2013.

Schmoock, G., Ralf Ehricht, Falk Melzer, Astrid Rassbach, Holger C. Scholz, Heinrich Neubauer, Konrad Sachse, Rinaldo Aparecido Mota, Muhammad Saqib, Mandy Elschner. DNA microarray-based detection and identification of *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia spp.* *Molecular and Cellular Probes*, v. 23, p. 178–187, 2009.

Singha H, Malik P, Goyal SK, Khurana SK, Mukhopadhyay C, Eshwara VK, Singh RK. Optimization and validation of indirect ELISA using truncated TssB protein for the serodiagnosis of glanders amongst equines. *Scientific World Journal*, 2014:469407. 2014.

SILVA, CECÍLIA MARIA de SOUZA LEÃO. **Avaliação da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e ELISA indireto para o Diagnóstico do Mormo**. 2014. Mestrado em Ciência Animal Tropical. Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE. Orientador: Manoel Adrião Gomes Filho. Coorientador: Vania Lucia de Assis Santana.

Teles J.A.A., Campos A.C., Silva K.P.C., Santos A.S., Santana V.L.A., Castro R.S., Mota R.A. Desenvolvimento e avaliação de um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, n.9, p. 838-842, 2012.