

# Padronização de teste de ELISA indireto para diagnóstico de mormo utilizando antígeno dialisado de *Pseudomonas aeruginosa*\*

## Standardization of indirect ELISA test for diagnosis of glanders using dialyzed antigen of *Pseudomonas aeruginosa*

Caroline Pereira Correia,\*\* Robson Bahia Cerqueira\*\*\*

### Resumo

O mormo é uma zoonose grave e altamente contagiosa, causada pela bactéria gram-negativa *Burkholderia mallei*, afetando diversos mamíferos, principalmente equídeos, com implicações significativas na saúde animal e humana. No Brasil, é uma doença de notificação obrigatória, sendo transmitida principalmente por água, alimentos e fômites contaminados. Com o maior rebanho equino da América Latina, o país enfrenta desafios econômicos consideráveis devido aos impactos do mormo na área de esportes, lazer, exportação de animais e produção de carne. Após um longo período sem registros, novos casos surgiram no país no início do século XXI, gerando preocupações crescentes em todos os estados brasileiros. Diante desse cenário, pesquisas e padronização de novos testes diagnósticos são de suma importância na saúde única para contribuir na identificação, controle e erradicação da doença no país. Este estudo teve como objetivo a padronização de um teste imunoenzimático indireto utilizando o antígeno dialisado de *Pseudomonas aeruginosa* para detecção de infecção por *Burkholderia mallei*. Inicialmente, cultivou-se *Pseudomonas aeruginosa* para produção do antígeno dialisado, seguido pela realização do ELISA indireto com amostras negativas e positivas para mormo, permitindo definir a sensibilidade, especificidade, valores preditivos negativo e positivo. Os resultados demonstraram uma sensibilidade de 95% e especificidade de 50%, indicando a possibilidade no uso diagnóstico. Assim, o ELISA indireto padronizado com antígeno dialisado de *Pseudomonas aeruginosa* pode ser considerado uma ferramenta eficaz na identificação de casos de mormo.

**Palavras-chave:** *Burkholderia mallei*, sorodiagnóstico, saúde única.

### Abstract

Glanders is a serious and highly contagious zoonosis, caused by the gram-negative bacterium *Burkholderia mallei*, affecting several mammals, mainly equids, with significant implications for animal and human health. In Brazil, it is a notifiable disease, transmitted mainly by contaminated water, food and fomites. With the largest equine herd in Latin America, the country faces considerable economic challenges due to the impacts of glanders on the sports industry, leisure, animal exports and meat production. After a long period without records, new cases emerged in the country at the beginning of the 21st century, generating growing concerns in all Brazilian states. Given this scenario, research and standardization of new diagnostic tests are of paramount importance in single health to contribute to the identification, control and eradication of the disease in the country. This study aimed to standardize an indirect immunoenzymatic test using dialyzed *Pseudomonas aeruginosa* antigen to detect *Burkholderia mallei* infection. Initially, *Pseudomonas aeruginosa* was cultivated to produce the dialyzed antigen, followed by indirect ELISA with negative and positive samples for glanders, allowing the definition of sensitivity, specificity and negative and positive predictive values. The results demonstrated a sensitivity of 95% and specificity of 50%, indicating the possibility of diagnostic use. Thus, the standardized indirect ELISA with dialyzed *Pseudomonas aeruginosa* antigen can be considered an effective tool in identifying glanders cases.

**Keywords:** *Burkholderia mallei*, serodiagnosis, one health.

\*Recebido em 7 de março de 2024 e aceito em 27 de novembro de 2024.

\*\*Mestre em defesa agropecuária pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB), campus Cruz das Almas, Bahia, Brasil. Autor para correspondência: carolinecorreia@gmail.com.

\*\*\*Professor Doutor no curso graduação e pós-graduação em medicina veterinária na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB), campus Cruz das Almas, Bahia, Brasil. E-mail: robsonba@ufrb.edu.br.

## Introdução

O mormo é uma doença conhecida desde a antiguidade e representa uma ameaça significativa a saúde, causando prejuízos sociais, econômicos e sanitários. Sua prevalência entre as espécies animais é mais proeminente em equídeos, embora também possa afetar acidentalmente outros animais, incluindo carnívoros, pequenos ruminantes e seres humanos, principalmente através do contato com água, alimentos e objetos contaminados (ROCHA, 2018).

No Brasil a doença é conhecida por vários nomes regionais como lamparão, garrotilho atípico e catarro-de-mormo cujo agente etiológico é a bactéria gram-negativa *Burkholderia mallei* (SILVA, 2014; CARVALHO, 2019).

As manifestações clínicas do mormo podem variar, apresentando-se isoladamente ou em conjunto e envolvendo alterações respiratórias, linfáticas e cutâneas. A forma da doença geralmente difere entre asininos, muare e equinos, sendo aguda nos primeiros e crônica nos últimos. Apesar dos avanços na pesquisa, as vacinas desenvolvidas mostraram-se ineficazes para os animais suscetíveis, e nenhum tratamento específico está disponível (RADOSTITS *et al.*, 2002; VERMA *et al.*, 2014; TITBALL *et al.*, 2017; PORTO, 2020).

No contexto regulatório, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem desempenhado um papel importante no estabelecimento de diretrizes para prevenção, controle e erradicação do mormo no país. Entretanto, a mudança recente na legislação com a Portaria N° 593 de 30 de junho de 2023, podem ter impactos significativos nos esforços de controle da doença.

A interação entre animais e seres humanos é um fator agravante, uma vez que o mormo é uma zoonose, o que significa que há potencial de disseminação do microrganismo pelo contato entre espécies (SILVA, 2014; CARVALHO, 2019). Isso ressalta a importância da intervenção e responsabilidade do médico veterinário não apenas na gestão, mas também na promoção da saúde coletiva.

Salientando seu caráter zoonótico e as exigências laboratoriais nível NB-3 para manipulação da *Burkholderia mallei*, a intenção de desenvolver testes com antígenos de similaridade antigênica, fenotípica, nutricionais e bioquímicas nas análises laboratoriais representam uma nova possibilidade na abordagem diagnóstica (EBERL; TUMMLER, 2004; SILVA, 2018).

Nesse contexto, novos métodos diagnósticos são essenciais para fortalecer as medidas de controle, prevenção e vigilância epidemiológica do mormo. O presente trabalho teve como objetivo padronizar um teste de ELISA indireto utilizando um antígeno dialisado de *Pseudomonas aeruginosa* para detecção de mormo.

## Material e métodos

**Local do experimento:** O experimento foi realizado no Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (HUMV), pertencente à Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), localizado no município de Cruz das Almas, Bahia (12°39'35.755"S 39°5'26.023"W).

**Amostras:** As 44 amostras de soro negativas foram obtidas de um banco de soro sanguíneo de equídeos, todas sem relato

clínico de síndromes respiratórias e outras patologias. Essas amostras foram testadas e confirmadas como negativas para Anemia Infecciosa Equina, pois haviam sido previamente utilizadas em outra pesquisa. As amostras foram coletadas entre janeiro de 2009 e dezembro de 2013 e são provenientes da região de Bom Jesus da Lapa, na Bahia (protocolos CEUA 23007016893-2013-73 e 57/2016/CEUA-UFBA).

As 20 amostras de soro positivas foram obtidas por doação de um laboratório privado que realiza sorologia oficial para mormo com o teste de ELISA indireto recomendado pelo MAPA. As alíquotas foram fornecidas sem identificação, por se tratar de uma doença de notificação e necessidade de manutenção do sigilo pelo o laboratório prestador do serviço. Os animais apresentaram sinais clínicos respiratórios, caquexia, piroxia, hiporexia, linfadenopatia de submandibulares e ulceração no septo nasal, com descarga mucopurulenta inicial. Em alguns casos, as lesões no septo nasal evoluíram para úlceras que cicatrizaram em formato de estrela, considerada uma lesão sugestiva de mormo.

**Produção do antígeno:** A *Burkholderia mallei* apresenta riscos significativos para a saúde humana e animal, sendo permitida sua manipulação apenas em laboratórios com nível de segurança 3 (NB3) (SILVA, 2018). No entanto, o Laboratório de Doenças Infecciosas do Hospital Universitário de Medicina Veterinária (LDI-HUMV) não possui essa classificação, o que limita a utilização da *Burkholderia sp.* em projetos de pesquisa. A revisão bibliográfica revelou similaridades nutricionais, bioquímicas e na interação patógeno-hospedeiro entre *B. mallei* e *Pseudomonas aeruginosa* (WEAVER; KOLTER, 2004; SYED; WOOTEN, 2021). Com base nessas semelhanças, foi desenvolvido um antígeno para a standardização do ELISA indireto para *Burkholderia mallei*, utilizando *Pseudomonas aeruginosa* para a produção do antígeno.

**Expansão bacteriana:** Encontrava-se no acervo interno do laboratório um cultivo de *P. aeruginosa* em placa de Petri, cultivado em meio ágar nutriente. Amostras das colônias foram transferidas para tubos de 15 ml contendo meio ágar BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) e colocadas em estufa a 37°C para crescimento subsequente. Após 48 horas de crescimento, o conteúdo total foi transferido para um Erlenmeyer contendo aproximadamente 500 ml de caldo BHI para expansão da massa bacteriana.

**Obtenção do antígeno:** Após expansão da massa bacteriana em meio BHI por 48 horas a 37°C, o conteúdo foi centrifugado para separar a massa bacteriana do sobrenadante. Em seguida, a massa foi lavada com solução salina para purificação do antígeno, realizando-se a diluição e centrifugação sucedente. Para inativação bacteriana e posterior dialise, a massa foi submetida a banhos-maria a 60°C durante três horas, alternados com períodos de congelamento, durante três dias consecutivos. Ao final desse processo o sobrenadante foi coletado e a massa bacteriana descartada.

**Dialise:** Foram esterilizadas em fluxo laminar, com luz UV, durante dez minutos: ponteiras, Becker de 25 ml, suporte, pipeta de vidro de 10 ml, barbante, luvas de procedimento e membrana de diálise de 10 micrômetros. A membrana foi acondicionada no Becker de 25 ml e preenchida com o último sobrenadante da etapa anterior, sendo amarrada com barbante. Em seguida, a bolsa resultante foi amarrada a uma pipeta de vidro e imerso em um Becker de 1000 ml preenchido com PBS, contendo uma barra magnética, sobre um agitador magnético. O

PBS foi substituído a cada 12 horas durante três dias, resultando na obtenção do antígeno dialisado, que foi armazenado em seis tubos Eppendorf (Figura 1).

**Figura 1:** Diálise do antígeno em meio PBS (arquivo pessoal).

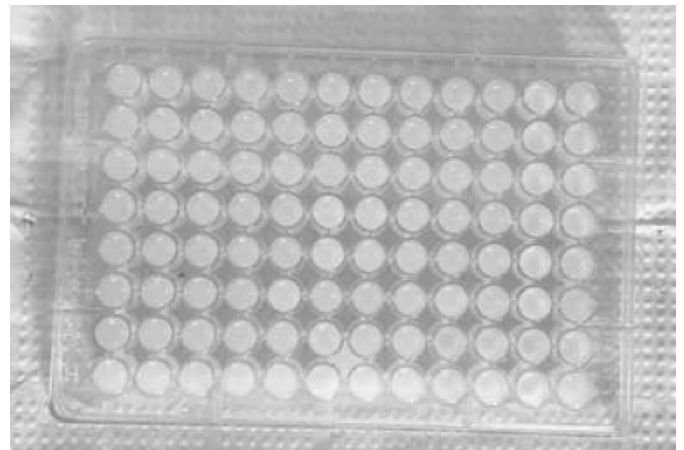


**Protocolo do ELISA indireto:** Na fase inicial, realizou-se diluições do antígeno para identificar a titulação mais adequada

na padronização do ELISA indireto. Para isso, foi utilizado uma placa de polietileno de 96 poços, que foi sensibilizada utilizando 50 e 100 µL por poço do antígeno diluído em tampão carbonato bicarbonato nas diluições de 1 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 e 1:3200 (Tabela 1).

Após sensibilização, a placa foi mantida *overnight* durante 24 horas em câmara úmida na geladeira. Em seguida a placa foi lavada duas vezes com tampão fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline*) acrescido de 0,05% de Tween-20 (PBS-T). O próximo passo foi bloquear as reações na placa (Figura 2) usando solução de PBS-T com 5% de leite em pó desnatado (LPD), 200µl por poço e colocado na estufa a 37°C, por 2 horas. Após a retirada, a placa foi lavada 1 vez com PBS-T e mantida armazenada na câmara úmida, em geladeira.

**Figura 2:** Bloqueio das reações em placa de ELISA com PBS+LPD (arquivo pessoal).



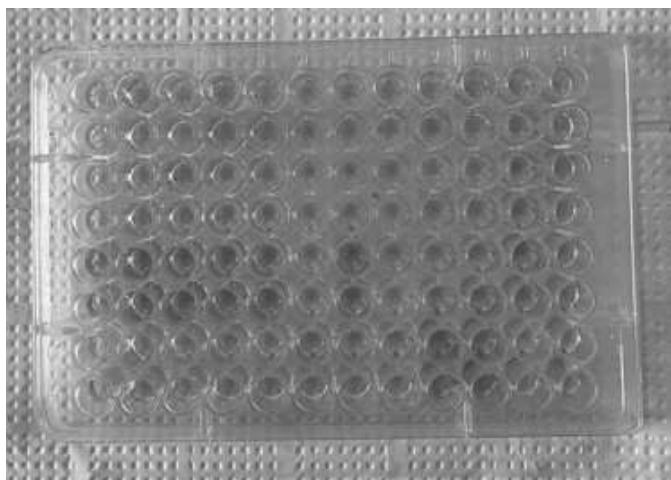
**Tabela 1:** Mapa referente a padronização para titulação do teste ELISA indireto no diagnóstico de *Burkholderia mallei*.

	1:100		1:200		1:400		1:800		1:1600		1:3200	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	Branco 50 µL	Branco 100 µL	Branco 50 µL	Branco 100 µL	Branco 50 µL	Branco 100 µL	Branco 50 µL	Branco 100 µL	Branco 50 µL	Branco 100 µL	Branco 50 µL	Branco 100 µL
<b>B</b>	Branco 50 µL	Branco 100 µL	Branco 50 µL	Branco 100 µL	Branco 50 µL	Branco 100 µL	Branco 50 µL	Branco 100 µL	Branco 50 µL	Branco 100 µL	Branco 50 µL	Branco 100 µL
<b>C</b>	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL
<b>D</b>	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL	Negativo 50 µL	Negativo 100 µL
<b>E</b>	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL
<b>F</b>	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL	Positivo 50 µL	Positivo 100 µL
<b>G</b>	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL
<b>H</b>	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL	Soro teste 50 µL	Soro teste 100 µL

Para realizar as diluições dos soros positivos e negativos, utilizou-se 0,1 grama de LPD a 2% em 5 mL de PBS-T, adicionando-se 12 µL das alíquotas positivas e negativas, separadamente e em duplicata, em cada placa. A partir dessa solução, 50 µL foram distribuídos nos poços ímpares e 100 µL nos poços pares, sendo que os poços brancos foram preenchidos apenas com a solução de PBS-T+LPD. A placa foi incubada em câmara úmida e posteriormente transferida para uma estufa a 37 °C por 1 hora e 30 minutos.

Na etapa seguinte, 50 µL de conjugado foi adicionado a todos os poços e a placa foi novamente colocada na câmara úmida e incubada por mais uma hora a 37 °C. Ao final do tempo de incubação, foram adicionados 50 µL da solução reveladora (composta por 4,16 g de OPD, 10 mL de tampão cítrico e 60 µL de água oxigenada a 30%) em cada poço. Após duas horas de reação, a reação foi interrompida com a adição de 25 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada utilizando um leitor de microplacas com filtro ajustado (Figura 3).

**Figura 3:** Imagem da placa de padronização do ELISA (arquivo pessoal).



Em seguida, os soros comprovadamente positivos (20 amostras) e negativos (44 amostras) foram testados com 12 µL do antígeno na diluição de 1:200, que proporcionou a melhor escala de colorimetria na placa de padronização. Todas as etapas descritas anteriormente foram realizadas em ambas as placas, tanto negativas quanto positivas, desde a sensibilização até a revelação e leitura da densidade óptica (DO).

**Análise estatística:** Os resultados das placas foram tabulados no Excel® através dos valores obtidos pela avaliação da densidade óptica e aplicação de fórmulas.

Estudo da sensibilidade, especificidade, cut-of e valores preditivos negativo e positivo: Os testes estatísticos seguiram as diretrizes de Soares *et al.* (2012), analisando sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. A sensibilidade e a especificidade foram calculadas como porcentagens, representando a probabilidade de indivíduos doentes testarem positivo e de não doentes testarem negativo, respectivamente. Os valores preditivos positivo e

negativo foram calculados como a probabilidade da presença ou ausência da doença quando o teste é positivo ou negativo. O cut-off foi determinado através do cálculo da média de animais não reagente acrescido de quatro vezes o desvio padrão populacional. A Tabela 2 facilita a compreensão desses conceitos.

**Tabela 2:** Esquematização dos cálculos de sensibilidade e especificidade.

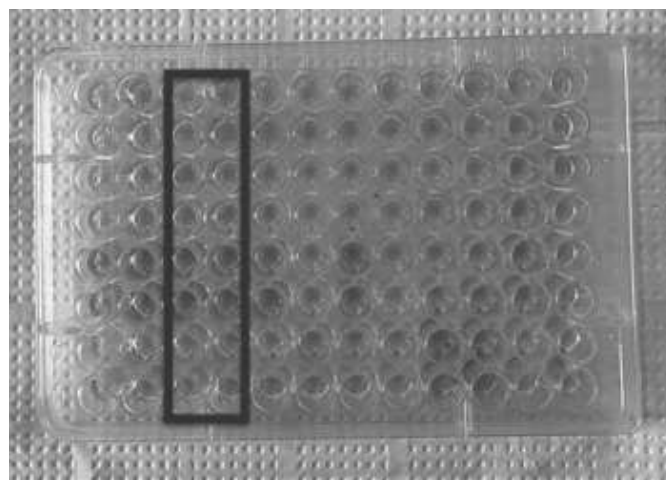
Condição do animal	Doente	Não-doente	Total
Positivo	A	B	A+B
Negativo	C	D	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D(N)

FONTE: Soares *et al.*, 2012.

## Resultados e discussão

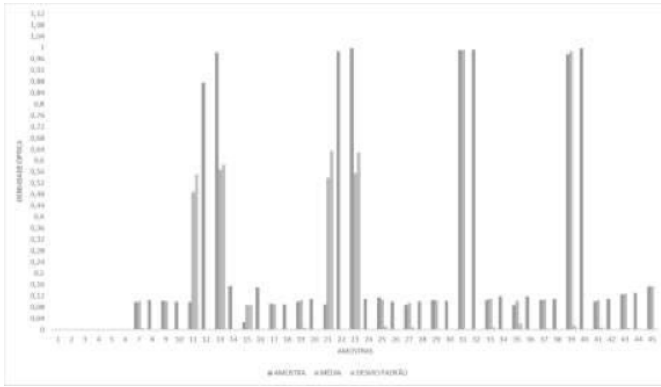
Após a realização dos ensaios e titulação do antígeno, verificou-se que a diluição de 1:200 proporcionou o melhor resultado, com a intensidade da cor sendo avaliada colorimetricamente (Figura 4), utilizando 100 µL de antígeno por poço. Entretanto, observou-se uma alteração na coloração dos soros na diluição 1:1600, possivelmente devido ao processo manual de lavagem ou à possível positividade na amostra. A definição dos critérios considerou a coloração obtida e os valores de densidade óptica, indicando a viabilidade do uso do antígeno em testes de ELISA indireto para detecção de *Burkholderia mallei*.

**Figura 4:** Gradiente de cor referente ao resultado obtido do ELISA indireto para a titulação do antígeno (arquivo pessoal).



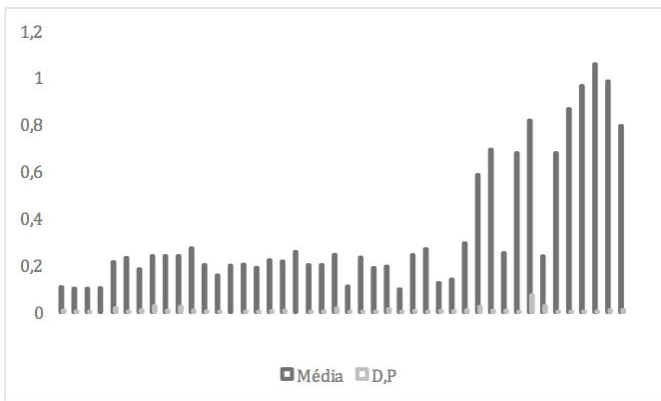
Quanto à placa de padronização para a titulação antigênica, a média geral das amostras foi de 0,273, com um Desvio Padrão (DP) de 0,058 e um Coeficiente de Variação (CV) de 21%. No Gráfico 1, são apresentados os valores médios de cada amostra analisada juntamente com seus respectivos DP. As amostras numeradas de 1 a 6 correspondem aos poços associados às amostras positivas, negativas e controle branco, portanto, não são incluídas nos cálculos do Gráfico 1.

**Gráfico 1:** Padronização de ELISA indireto com amostras de soro equino para mormo.



O cut-off foi determinado pela média dos valores de densidade óptica de 44 amostras de soro equino negativas, resultando em um ponto de corte de 0,028 (Gráfico 2).

**Gráfico 2:** Amostras de soro equino negativo para mormo.



Em seguida, 20 amostras positivas e 44 amostras negativas foram analisadas para calcular a sensibilidade e a especificidade do teste. Das 20 amostras positivas, 19 apresentaram valores de densidade óptica acima do ponto de corte (0,241), sendo consideradas positivas no teste, enquanto 1 amostra teve um valor inferior a 0,028, classificada como negativa. Das 44 amostras negativas no teste ELISA, a especificidade do teste foi calculada, revelando que 22 amostras foram corretamente classificadas como negativas, enquanto 22 amostras foram classificadas como falso-positivas.

**FÓRMULA SENSIBILIDADE:  $a/(a+c) \times 100$**

Sensibilidade:  $(19/(19+1)) \times 100 = 95\%$

**FÓRMULA ESPECIFICIDADE:  $d/(b+d) \times 100$**

Especificidade:  $22/(22+22) \times 100 = 50\%$

Quanto aos valores preditivos positivo e negativo obtemos:

Preditivo positivo:  $19/19+22 = 0,46$

Preditivo negativo:  $22/1+22 = 0,95$

Os achados revelaram que, em uma amostra de 100 animais, o teste apresentou uma taxa de detecção correta de 95% para casos positivos, demonstrando um desempenho satisfatório.

Adicionalmente, o teste sorológico confirmou corretamente 50% dos casos negativos, indicando uma promissora capacidade de identificação precisa dos animais expostos ao patógeno e daqueles verdadeiramente infectados. No entanto, é essencial conduzir novas investigações para aprimorar a especificidade do ELISA. Uma estratégia promissora seria aplicar o teste em amostras previamente confirmadas como negativas para *Burkholderia mallei*, por meio de testes de triagem seguidos de Western Blotting, visando reduzir a ocorrência de falsos-negativos.

Em concordância com os estudos de Syed; Wooten (2021), Eberl; Tümmler (2004), e Weaver; Kolter (2004), que abordaram a similaridade antigênica, nutricional e bioquímica entre *Pseudomonas aeruginosa* e *Burkholderia* sp., observou-se que 19 das 20 amostras positivas para *Burkholderia mallei* foram detectadas no ELISA indireto usando um antígeno de *P. aeruginosa*. Essas descobertas sugerem a viabilidade do antígeno dialisado como uma alternativa diagnóstica para o mormo, destacando características como a modulação da resposta imune, como a adaptação da LPS com o polissacarídeo O (LPS-O), que coincide com a cronicidade da doença (LOPES, 2012; SAIKH; MOTT, 2017).

Estudos anteriores, como o de PAL *et al.* (2012), que utilizou proteínas recombinantes 0375H e 0375TH, demonstraram uma sensibilidade e especificidade de 100% no ELISA indireto. Singha *et al.* (2014), ao empregar a proteína recombinante TssB, alcançaram uma sensibilidade diagnóstica de 99,7% e uma especificidade de 100%. Da mesma forma, Teles *et al.* (2012), ao desenvolverem e avaliarem um teste ELISA indireto para o diagnóstico sorológico do mormo em equídeos com a utilização de derivado proteico purificado de maleína, constataram uma sensibilidade de 100% em suas amostras. Esses estudos convergem para a alta capacidade de detecção de animais realmente doentes pelo ELISA indireto.

Ao avaliar o desempenho da especificidade do teste, é importante ressaltar que as amostras foram negativadas para Anemia Infecciosa Equina, sem passar por testes de triagem ou confirmatórios para mormo. Entretanto, é relevante considerar que, na fase crônica, os equinos podem estar infectados sem apresentar sinais clínicos aparentes, o que levanta a possibilidade de que amostras negativas para AIE possam ser positivas para *B. mallei* (Radostits *et al.*, 2002; Verma *et al.*, 2014; Silva, 2018; Porto, 2020). A relação entre a intensidade da cor gerada e a leitura da densidade óptica também deve ser considerada, pois valores próximos ao ponto de corte podem resultar em colorações semelhantes, dificultando a distinção entre resultados positivos e negativos. Adicionalmente, o fato da técnica ter sido realizada manualmente pode interferir no resultado final do teste.

## Conclusão

Como conclusão, o antígeno desenvolvido demonstrou eficácia na indução de reações de cor e densidade óptica após a sensibilização das placas para testes de ELISA indireto. Apesar da sensibilidade satisfatória, recomenda-se a realização de novos testes utilizando amostras reconhecidamente negativas

para *Burkholderia mallei*, a fim de aprimorar a especificidade do teste e reduzir o risco de falsos negativos. Além disso, sugere-se a realização de análises complementares, como Western

## Referências

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

**Portaria MAPA Nº 593, de 30 de junho de 2023.** Altera a Instrução Normativa nº 6, de 16 de janeiro de 2018, que aprova as Diretrizes Gerais para Prevenção, Controle e Erradicação do Mormo no Território Nacional, no âmbito do Programa Nacional de Sanidade dos Equídeos (PNSE) – Diário Oficial da União, DF, 2023.

CARVALHO, J. C. S. **Frequência de casos de mormo em asininos no Brasil no período de janeiro de 2018 a abril de 2019.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação), Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2019.

EBERL, L.; TÜMMLER, B. *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis: genome evolution, interactions and adaptation. *International Journal of Medical Microbiology*, 2004.

LOPES, A. R. J. **Avaliação de mecanismo de escape imunológico do complexo *Burkholderia cepacia*.** Dissertação. Faculdade de ciências e tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

PAL, V.; KUMAR, S.; MALIK, P.; RAI, G. P. Evaluation of recombinant proteins of *Burkholderia mallei* for serodiagnosis of glanders. *Clinical and vaccine immunology*. v. 19, n. 8, 2012.

PORTO, M. B. R. **Estudo epidemiológico do mormo em Sergipe: 2019.** EMDAGRO, Aracaju, 2020.

RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G.; HOUSTON, D. M. **Exame clínico e diagnóstico em veterinária.** Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2002.

ROCHA, L. O. **Infecção por *Burkholderia mallei* em equídeos e cobaias (*Cavia porcellus*): avaliação da resposta humoral e estudo clínico.** Dissertação (mestrado em inovação e tecnologia integradas a medicina veterinária), Universidade Federal de Alagoas, Viçosa, 2018.

Blotting, PCR ou eletroforese para aprofundar o entendimento das características antigênicas da *Pseudomonas aeruginosa* e melhorar a precisão diagnóstica.

SAIKH, K. U; MOTT, T. M. Innate immune response to *Burkholderia mallei*, current opinion in infectious diseases. *Journal Infectious Diseases*. V. 30, n. 3, 2017.

SILVA, C. M. S. L. **Avaliação da reação em cadeia de polimerase (PCR) e ELISA indireto como método de diagnóstico da *Burkholderia mallei* (mormo).** Dissertação (mestrado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2014.

SILVA, C. M. S. L. **Avaliação do diagnóstico do mormo.** Tese (doutorado). Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2018.

SINGHA, H.; MALIK, P.; GOYAL, S. K.; KHURANA, S. K.; MUKHOPADHYAY, C.; ESHWARA, V. K.; SINGH, R. K. Optimization and validation of indirect ELISA using truncated TssB protein for the serodiagnosis of glanders amongst equines. *The Scientific World Journal*, 2014.

SYED, I.; WOOTEN, R.M. Interactions between pathogenic *Burkholderia* and the complement system: A review of potential immune evasion mechanisms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. v. 11, 2021.

TELES, J. A. A.; CAMPOS, A. C.; DA SILVA, K. P. C.; SANTOS, A. S.; SANTANA, V. L. A.; DE 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*, 2012.

TITBALL, R. R.; BURTNICK, M. N.; BANCROFT, G. J.; BRETT, P. *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* vaccines: Are we close to clinical trials? *Vaccine*. v. 35, 2017.

VERMA, A. K.; SAMINATHAN, M.; NEHA; TIWARI, R.; DHAMA, K.; SINGH, S. V. Glanders - A reemerge zoonotic disease: A review. *Journal of Biological Sciences*, 2014.

WEAVER, V.; KOLTER, R. *Burkholderia* spp. alter *Pseudomonas aeruginosa* physiology through iron sequestration. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n 8, 2004.